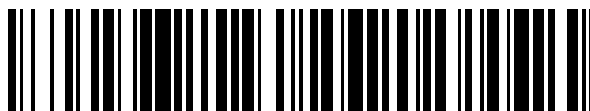


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 132**

51 Int. Cl.:
C12N 15/54 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
A23L 1/03 (2006.01)
A23L 1/035 (2006.01)
A21D 8/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06014353 .4**
96 Fecha de presentación: **15.01.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1762622**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.03.2007**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA PRODUCCIÓN IN SITU DE UN EMULSIONANTE EN UN ALIMENTO.**

30 Prioridad:
17.01.2003 GB 0301121 17.01.2003 GB 0301122
17.01.2003 GB 0301117 17.01.2003 GB 0301120
17.01.2003 GB 0301119 17.01.2003 GB 0301118
23.07.2003 US 489441 P 24.12.2003 GB 0330016

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
14.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
14.02.2012

73 Titular/es:
DANISCO A/S
LANGEBROGADE 1, P.O. BOX 17
1001 COPENHAGEN K., DK

72 Inventor/es:
de Kreij, Arno;
Madrid, Susan Mampusti;
Mikkelsen, Jørn Dalgaard y
Søe, Jørn Borch

74 Agente: **Curell Aguilá, Mireya**

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

ES 2 374 132 T3

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción *in situ* de un emulsionante en un alimento.

5 Referencia a las solicitudes relacionadas

Campo de la invención

10 La presente invención se refiere a la utilización de una lipasa para preparar a partir de un material alimenticio que contiene agua que comprende 10 a 98% de agua un producto de masa o un producto horneado que comprende un emulsionante.

15 La presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de un producto de masa o un producto horneado que comprende un emulsionante, y un producto horneado o de masa que comprende agua que puede obtenerse mediante dicho procedimiento que comprende una lipasa y un emulsionante.

Antecedentes de la técnica

20 La utilización provechosa de las fosfolipasas y de las lipasas (denominadas enzimas lipolíticas, (EC.3.1.1.x) utilizadas en aplicaciones industriales en alimentos y/o en piensos es conocida desde hace muchos años.

25 Por ejemplo, en la patente EP 0 585 988 se reivindica que la adición de lipasa a la masa producía una mejora en el efecto antiendurecimiento. Se sugiere que una lipasa obtenida a partir de *Rhizopus arrhizus* cuando se añade a la masa puede mejorar la calidad del pan resultante cuando se utiliza combinada con manteca/grasa. El documento WO 94/04035 da a conocer que puede obtenerse blandura mejorada añadiendo una lipasa a la masa sin añadir grasa/aceite a la masa. Castello, P.ESEGP 89-10 Dic. 1999. Helsinki, demuestra que las lipasas exógenas pueden modificar el volumen del pan.

30 Las enzimas lipolíticas hidrolizan uno o más de los ácidos grasos procedentes de los lípidos presentes en el alimento lo que puede producir la formación de potentes moléculas emulsionantes en alimento lo que proporciona funcionalidad comercialmente valiosa. Las moléculas que contribuyen a las características emulsionantes más significativas son los productos de la hidrólisis parcial, tales como las moléculas de liso-fosfolípidos, liso-glucolípidos y monoglicéridos. Los productos polares de la hidrólisis de los lípidos, tales como liso-fosfolípidos y liso-glucolípidos presentan ventajas particularmente. En la elaboración del pan, dichos emulsionantes modificados *in situ* pueden proporcionar funcionalidad equivalente como emulsionantes, tal como DATEM.

35 Sin embargo, la actividad de las enzimas lipolíticas puede producir la acumulación de ácidos grasos libres que pueden conducir a funcionalidad perjudicial en el alimento. Esta actividad propia de las enzimas lipolíticas limita su funcionalidad.

40 Se han intentado numerosas soluciones a este problema en la técnica. Sin embargo, éstas producen un aumento significativo en los ácidos grasos libres en el alimento, particularmente alimentos con un alto contenido en agua, incluyendo, pero sin limitarse, masas de pan y yema de huevo.

45 Las fosfolipasas, particularmente la fosfolipasa A2 (E.C.3.1.1.4), se han utilizado durante muchos años para el tratamiento de los productos de huevo o a base de huevo (véanse por ejemplo el documento US nº 4.034.124 y Dutihl & Groger 1981 *J. Sci. Food Agric.* 32, 451-458). La actividad de la fosfolipasa durante el tratamiento de los productos de huevo o a base de huevo, produce la acumulación de lisolecitina polar, que puede actuar como emulsionante. El tratamiento de fosfolipasa de huevo o de productos a base de huevo puede mejorar la estabilidad, la estabilidad térmica bajo tratamiento térmico tal como la pasteurización y da como resultado sustancial engrosamiento. Los productos a base de huevo pueden incluir, pero no se limitan a pasteles, mayonesa, aliños para ensaladas, salsas, helados y similares. La utilización de fosfolipasas produce la acumulación de ácidos grasos libres. La acumulación de los ácidos grasos libres puede producir una significativa falta de sabor. Además, la acumulación de los ácidos grasos libres puede producir un aumento de sensibilidad a la oxidación, y por lo tanto producir poca estabilidad al almacenaje, decoloración del producto y alteración de otras características críticas del alimento tal como sabor y textura. Recientemente, se han comercializado enzimas lipolíticas con más amplia especificidad para el sustrato para el tratamiento de productos alimenticios como yema de huevo y afines. Éstas, tienen la ventaja de que, a diferencia de la mayoría de las fosfolipasas A2 no proceden de ningún mamífero. Sin embargo producen una significativa acumulación de los ácidos grasos libres no solamente debida a la hidrólisis de fosfolípidos sino también de triglicéridos.

60 Como se mencionó anteriormente, otra área donde se han utilizado extensamente las lipasas es la industria panadera. La utilización de fosfolipasas en panificación data del comienzo de 1980.

65 El sustrato para las lipasas en la harina de trigo es 1,5 a 3% de lípidos de trigo endógenos, que son una mezcla compleja de lípidos polares y apolares. Los lípidos polares pueden dividirse en glucolípidos y fosfolípidos. Estos

lípidos están constituidos por glicerol esterificado con dos ácidos grasos y un grupo polar. El grupo polar contribuye a la actividad superficial de estos lípidos. La escisión enzimática de uno de los ácidos grasos en estos lípidos conduce a lípidos con actividad superficial mucho mayor. Es bien sabido que los emulsionantes, tal como DATEM, con gran actividad superficial son muy funcionales cuando se añaden a la masa.

Sin embargo, la utilización de las lipasas (E.C. 3.1.1.X) en productos de masa puede tener un impacto perjudicial sobre la actividad de la levadura y/o un efecto negativo sobre el volumen del pan. Un efecto negativo sobre el volumen del pan se explica con frecuencia por sobredosis. La sobredosis puede conducir a una disminución en la elasticidad del gluten que produce una masa que es demasiado rígida y por tanto produce volúmenes de pan reducidos. Además, o alternativamente las lipasas pueden degradar la manteca, el aceite o la grasa de la leche añadidos a la masa, produciendo falta de sabor en la masa y el producto horneado. La sobredosis y falta de sabor se han atribuido a la acumulación de ácidos grasos libres en la masa.

En los documentos EP 1 193 314, EP 0 977 869 y también en WO 01/39602, se publicó que la utilización de enzimas lipolíticas activas en glucolípidos era particularmente provechosa en la aplicación de la elaboración del pan ya que los productos de la hidrólisis parcial de los lisoglucolípidos se descubrió que tenían una muy alta funcionalidad de emulsionante, lo que produce aparentemente una proporción mayor de funcionalidad de emulsionante positiva en contraposición con la acumulación perjudicial de ácidos grasos libres. Sin embargo, se descubrió además que las enzimas tienen significativa actividad no selectiva sobre los triglicéridos lo que produce innecesariamente muchos ácidos grasos libres.

El mismo descubrimiento se publicó en el documento WO 00/32758, que dio a conocer variantes de la enzima lipolítica con actividad mejorada sobre fosfolípidos y/o glucolípidos, además variantes que tenían preferencia por ácidos grasos de cadena larga sobre los de corta. Esta última propiedad, dada a conocer también en el documento WO 01/39602, se estimó de particular importancia para prevenir la falta de sabores asociada a la acumulación de ácidos grasos libres de cadena corta. Sin embargo, se producen significativos ácidos grasos libres.

El problema de la alta actividad de triglicéridos se estudió en el documento WO 02/094123, en el que se da a conocer la utilización de enzimas lipolíticas activas en los lípidos polares (es decir, glucolípidos y fosfolípidos) en una masa, pero sustancialmente inactiva sobre triglicéridos o 1-monoglicéridos. Sin embargo, se producen ácidos grasos libres significativos.

Algunas enzimas lipolíticas tienen poca o ninguna actividad sobre la forma liso de lípidos polares (por ejemplo, glucolípidos/fosfolípidos). La utilización de dichas enzimas, se ha estimado preferible, ya que garantizan la acumulación de lisolípidos polares, produciendo óptima funcionalidad. Sin embargo los ácidos grasos libres se acumulan. Esta funcionalidad selectiva es característica de las enzimas fosfolipasa A2 y de las glucolipasas dadas a conocer en los documentos EP 0 977 869, EP 1 193 314 y WO 01/39602. Se han producido enzimas variantes de enzimas lipolíticas menos selectivas las cuales tienen una actividad enzimática inferior sobre los lisolípidos polares en comparación con la enzima original (documento WO 03/060112). Sin embargo, se producen ácidos grasos libres significativos.

El documento WO 00/05396 da a conocer un procedimiento para la preparación de un alimento que comprende un emulsionante, en el que el material alimenticio está en contacto con una enzima tal que la enzima genera un emulsionante a partir de un éster de ácido graso y un segundo constituyente genera un segundo ingrediente funcional. El documento WO 00/05396 da a conocer la utilización de en particular una enzima lipasa o esterasa. En ninguna parte del documento WO 00/05396 se da a conocer la utilización específica de un lípido aciltransferasa. Además, en los alimentos con alto contenido en agua, la utilización de las esterases y lipasas como se da a conocer en el documento WO 00/05396 produciría acumulación significativa de ácidos grasos libres.

Un inconveniente asociado a la utilización de las lipasas, incluyendo las fosfolipasas y las glucolipasas, puede producirse por la construcción de ácidos grasos libres liberados de los lípidos. Durante las pasadas dos décadas la utilización de enzimas lipolíticas en alimentos se ha limitado debido que el equilibrio entre la acumulación perjudicial de ácidos grasos libres y la producción de lisolípidos proporciona funcionalidad positiva. Aunque se han intentado numerosas estrategias en la materia, alguna de las cuales proporcionaron mejoras significativas en la funcionalidad, en ninguna se ha estudiado completamente el problema fundamental en la técnica, es decir, la acumulación significativa de ácidos grasos libres en los alimentos preparados utilizando enzimas lipolíticas *in situ*.

La presencia de grandes cantidades de ácidos grasos libres (FFA) en las materias primas o los productos alimenticios es reconocida generalmente como un defecto de calidad y los procesadores y clientes de alimentos normalmente incluyen una cantidad máxima de FFA en las especificaciones de los alimentos. Los efectos resultantes de cantidades de FFA en exceso pueden ser defectos organolépticos y/o funcionales.

Un resultado de la lipólisis es el enranciamiento hidrolítico, con formación del característico sabor "a jabón". Este sabor "a jabón" es especialmente agudo con ácidos grasos de longitud de cadena intermedia (C8-C12), que, aunque no presentes en altas concentraciones, pueden ser constituyentes importantes, por ejemplo, de productos lácteos o aceites vegetales. Un defecto organoléptico más frecuente se debe al efecto combinado de las enzimas lipolíticas y

los procesos de oxidación. Los ácidos grasos insaturados son más sensibles a la oxidación enzimática cuando están sin esterificar que cuando están esterificados en lípidos de acilo.

Los defectos funcionales en alimentos debido a grandes concentraciones de FFA se reconocen pero son menos fáciles de explicar. Sin desear estar ligado por la teoría, la hidrólisis de lípidos inalterados a ácidos carboxílicos aumentará la $[H^+]$ y producirá grupos carbonilo que pueden combinarse con otros compuestos o iones metálicos. Los ácidos grasos libres también se combinan con proteínas por interacciones hidrófobas y pueden acomplejarse con almidón durante la cocción. Los FFA pueden interferir también con la acción de agentes tensoactivos, tales como lípidos polares y emulsionantes (*Lipid in Cereal Technology*, P. J. Barnes, Academic Press 1983).

El documento WO 03/10044 da a conocer una clase de aciltransferasas conocidas como PDAT (o ATWAX). Estas enzimas utilizan un monoglicérido o un diglicérido como molécula aceptadora, y fosfatidilcolina (PC) como molécula donante para producir los productos siguientes: liso-fosfatidilcolina y triacilglicerol y/o diacilglicerol.

En una forma de realización, la presente invención se refiere a mejoras en la incorporación de proteínas del suero en productos alimenticios, proporcionando mejores rendimientos sin alterar las calidades (tal como la textura) de las composiciones y productos alimenticios.

Las composiciones con queso se preparan por lo general a partir de líquidos lácteos por procesos que incluyen el tratamiento del líquido con un agente coagulante o cuajante. El agente coagulante puede ser una enzima coagulante, un ácido o un cultivo bacteriano adecuado o puede incluir dicho cultivo. El coágulo que resulta por lo general incorpora caseína transformada, grasas que incluyen grasa de manteca natural y aderezos que aumentan especialmente cuando se utiliza un cultivo bacteriano. El coágulo puede separarse del suero líquido, que contiene proteínas solubles no afectadas por la coagulación y que por consiguiente no están incorporadas en el coágulo.

El suero es por tanto un subproducto de preparación en los procesos comerciales que producen productos alimenticios tales como quesos. Tradicionalmente, el suero está dispuesto de un residuo inutilizado o utilizado como fertilizante o pienso para animales o procesado en un ingrediente alimenticio.

La incapacidad de las proteínas del suero para mantenerse sustancialmente en el coágulo es un factor importante que contribuye a una falta de eficacia en la producción convencional de productos lácteos (tales como los coágulos de queso) y a una reducción en el rendimiento global en relación con la incorporación de todos los sólidos de proteínas que están presentes en los líquidos lácteos de partida en los coágulos de queso resultantes.

Se han realizado numerosos intentos para incluir las proteínas del suero en el queso por ejemplo, por tratamiento térmico de la leche, tratamiento térmico del queso o por filtración, tal como por ultrafiltración.

Existen además varias descripciones de la utilización de las proteasas específicas para provocar la acumulación de las proteínas del suero. Una serina proteasa procedente de *Bacillus licheniformis* se ha demostrado que tiene capacidad para provocar la acumulación de las proteínas del suero (documento US nº 5.523.237).

Sin embargo, sigue habiendo muchas dificultades asociadas a la adición de las proteínas del suero en procesos tales como el sabor y la sensación en la boca del producto, y además tiende a interferir con la coagulación y posterior tratamiento del producto. Las proteasas que se han descrito anteriormente que pueden añadirse a la leche del queso para la hidrólisis de las proteínas del suero producen hidrólisis significativa de las caseínas tal como describe Madsen, J. S. & Qvist, K. B. (1997) Hidrolysis of milk protein by *Bacillus licheniformis* protease specific for acidic amino acid residues. *J. Food Sci.* 62, 579-582.

Por tanto, existe una necesidad en esta materia de procedimientos y composiciones que proporcionen la incorporación mejorada de la proteína del suero en los productos alimenticios a la vez que se mantienen las propiedades organolépticas y otras deseables. Dicha optimización daría como resultado aumento de eficacia, mayores rendimientos de productos alimenticios y costes reducidos de material total.

Las lipasa:colesterol aciltransferasas se conocen desde hace tiempo (véase por ejemplo Buckley-Biochemistry 1983, 22, 5490-5493). En particular, se han descubierto que las glicerofosfolípido:colesterol aciltransferasas (GCAT), como las lecitina:colesterol aciltransferasas (LCAT) vegetales y/o de mamíferos, catalizarán la transferencia de ácidos grasos entre la fosfatidilcolina y el colesterol.

Upton y Buckley (TIBS 20, mayo de 1995, págs. 178-179) y Brumlik y Buckley (*J. of Bacteriology*, abril de 1996, págs. 2060-2064) dan a conocer una lipasa/aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* que tiene la capacidad de llevar a cabo la transferencia de acilo a los receptores de alcohol en medio acuoso.

Milton et al (Biochemistry, 1990, 29, 9072-9078) dan a conocer asimismo la purificación de una acetiltransferasa grasa a partir de *Aeromonas salmonicida* que contiene el gen estructural de *A. hydrophila* clonado.

Además, la secuencia de aciltransferasa fue asimismo introducida en la base de datos EBI UNIPROT el 1 de marzo de 2001 con el número de registro Q9F7Y6.

Aspectos del sumario de la presente invención

Según un primer aspecto de la presente invención está prevista la utilización de una lípido aciltransferasa para preparar a partir de material alimenticio que contiene agua que comprende 10 a 98% de agua un producto de masa o un producto horneado que comprende un emulsionante, en la que el emulsionante es generado a partir de constituyentes del material alimenticio mediante una lípido aciltransferasa, en la que la lípido aciltransferasa es una que cuando es sometida a prueba utilizando el ensayo de transferasa en sustrato tamponado presenta por lo menos 2% de actividad de aciltransferasa; comprendiendo dicho ensayo de transferasa las etapas que consisten en:

i) disolver 450 mg de fosfatidilcolina y 50 mg de colesterol en cloroformo, evaporar hasta sequedad al vacío;

ii) transferir 300 mg de la mezcla de colesterol/fosfatidilcolina a un vaso de Wheaton, añadir 15 ml de tampón HEPES 50mM pH 7 y dispersar el lípido en el tampón durante la agitación;

iii) calentar el sustrato hasta 35°C durante la mezcla con una agitador magnético y añadir 0,25 ml de solución enzimática;

iv) tomar muestras de 2 ml en el tiempo de reacción de 0, 5, 10, 15, 25, 40 y 60 minutos e interrumpir inmediatamente la reacción enzimática mediante la adición de 25 µl de HCl 4M para acidificar el ácido graso libre;

v) añadir 3 ml de cloroformo y agitar vigorosamente durante 30 segundos, centrifugar y aislar 2 ml de la fase de cloroformo, filtrar a través de un filtro de 0,45 µl en un vaso Dram alquitranado de 10 ml;

vi) evaporar el cloroformo bajo una corriente de nitrógeno a 60°C, y pesar las muestras;

vii) analizar el lípido extraído mediante GLC.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de producción de un producto de masa o un producto horneado que comprende un emulsionante, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa a un producto de masa que contiene 10 a 98% de agua o un producto horneado, en el que la lípido aciltransferasa es una que cuando es sometida a prueba utilizando el ensayo de transferasa en sustrato tamponado presenta por lo menos 2% de actividad de aciltransferasa; comprendiendo dicho ensayo de transferasa las etapas que consisten en:

i) disolver 450 mg de fosfatidilcolina y 50 mg de colesterol en cloroformo, evaporar hasta sequedad al vacío;

ii) transferir 300 mg de la mezcla de colesterol/fosfatidilcolina a un vaso Wheaton, añadir 15 ml de tampón HEPES 50mM pH 7 y dispersar el lípido en el tampón durante la agitación;

iii) calentar el sustrato hasta 35°C durante la mezcla con una agitador magnético y añadir 0,25 ml de solución enzimática;

iv) tomar muestras de 2 ml en el tiempo de reacción de 0, 5, 10, 15, 25, 40 y 60 minutos e interrumpir inmediatamente la reacción enzimática mediante la adición de 25 µl de HCl 4M para acidificar el ácido graso libre;

v) añadir 3 ml de cloroformo y agitar vigorosamente durante 30 segundos, centrifugar y aislar 2 ml de la fase de cloroformo, filtrar a través de un filtro de 0,45 µl en un vaso Dram alquitranado de 10 ml;

vi) evaporar el cloroformo bajo una corriente de nitrógeno a 60°C, y pesar las muestras;

vii) analizar el lípido extraído mediante GLC.

Según otro aspecto, la presente invención proporciona un producto de masa u horneado que contiene agua, en el que el producto horneado o de masa comprende 10 a 98% de agua, que puede obtenerse mediante el procedimiento de la presente invención, en el que el alimento comprende una lípido aciltransferasa y un emulsionante, en el que la lípido aciltransferasa es una que cuando es sometida a prueba utilizando el ensayo de transferasa en sustrato tamponado presenta por lo menos 2% de actividad de aciltransferasa; comprendiendo dicho ensayo de transferasa las etapas que consisten en:

i) disolver 450 mg de fosfatidilcolina y 50 mg de colesterol en cloroformo, evaporar hasta sequedad al vacío;

ii) transferir 300 mg de la mezcla de colesterol/fosfatidilcolina a un vaso Wheaton, añadir 15 ml de tampón HEPES 50mM pH 7 y dispersar el lípido en el tampón durante la agitación;

iii) calentar el sustrato hasta 35°C durante la mezcla con un agitador magnético y añadir 0,25 ml de solución enzimática;

iv) tomar muestras de 2 ml en el tiempo de reacción de 0, 5, 10, 15, 25, 40 y 60 minutos e interrumpir inmediatamente la reacción enzimática mediante la adición de 25 µl de HCl 4M para acidificar el ácido graso libre;

5 v) añadir 3 ml de cloroformo y agitar vigorosamente durante 30 segundos, centrifugar y aislar 2 ml de la fase de cloroformo, filtrar a través de un filtro de 0,45 µl en un vaso Dram alquitranado de 10 ml;

vi) evaporar el cloroformo bajo una corriente de nitrógeno a 60°C, y pesar las muestras;

10 vii) analizar el lípido extraído mediante GLC.

Los procedimientos, utilizaciones, alimentos y lípido aciltransferasas siguientes se dan a conocer en la presente memoria.

15 Un procedimiento de producción *in situ* de un emulsionante en un alimento, en el que el procedimiento es tal que el emulsionante es producido sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en los alimentos, y en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa al alimento.

20 Un procedimiento de producción *in situ* de un emulsionante y un éster de esteroles y/o éster de estanol en un alimento, en el que el procedimiento es tal que el emulsionante es producido sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en el alimento, y en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa al alimento.

25 Un procedimiento de producción *in situ* de un emulsionante y un éster de esteroles y/o éster de estanol en un alimento, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa al alimento.

Un procedimiento de producción *in situ* de por o menos dos emulsionantes en un alimento, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir al alimento una lípido aciltransferasa.

30 Un procedimiento de producción *in situ* de por lo menos dos emulsionantes y un éster de esteroles y/o éster de estanol en un alimento, en el que el procedimiento es tal que los emulsionantes son producidos sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en el alimento, y en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa al alimento.

35 Un procedimiento de producción *in situ* de por lo menos dos emulsionantes y un éster de esteroles y/o éster de estanol en un alimento, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa al alimento.

40 Un procedimiento para la producción *in situ* de un éster de carbohidrato en un alimento, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa al alimento.

Un procedimiento para la producción *in situ* de un éster de carbohidrato con un emulsionante en un alimento, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa al alimento.

45 Un procedimiento de producción *in situ* de un emulsionante, y uno o más de entre un éster de carbohidrato, un éster de esteroles, un éster de etanol, un éster de proteína, un monoglicérido o un diglicérido en un alimento, y en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa al alimento.

50 Un procedimiento de producción de un alimento que comprende un emulsionante, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir al alimento una lípido aciltransferasa como se ha definido en la presente memoria.

55 Un procedimiento de producción de un alimento que comprende un emulsionante, en el que el procedimiento es tal que el emulsionante es producido sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en el alimento, y en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa al alimento.

60 Un procedimiento de producción de un alimento que comprende un emulsionante y un éster de esteroles y/o un éster de estanol, en el que el procedimiento es tal que el emulsionante es producido sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en el alimento, y en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa al alimento.

65 Un procedimiento de producción de un alimento que comprende un emulsionante y un éster de esteroles y/o un éster de estanol, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lípido aciltransferasa al alimento.

Un procedimiento para la producción de un alimento que comprende por lo menos dos emulsionantes, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir al alimento una lipido aciltransferasa.

5 Un procedimiento de producción de un alimento que comprende por lo menos dos emulsionantes y un éster de esteroles y/o un éster de estanol, en el que el procedimiento es tal que los emulsionantes son producidos sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en el alimento, y en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lipido aciltransferasa al alimento.

10 Un procedimiento de producción de un alimento que comprende por lo menos dos emulsionantes y un éster de esteroles y/o un éster de estanol, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lipido aciltransferasa al alimento.

15 Un procedimiento para la producción de un alimento que comprende un éster de carbohidrato, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lipido aciltransferasa al alimento.

Un procedimiento para la producción de un alimento que comprende un éster de carbohidrato y un emulsionante, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lipido aciltransferasa al alimento.

20 Un procedimiento de producción de un alimento que comprende un emulsionante y uno o más de entre un éster de carbohidrato, un éster de esteroles, un éster de estanol, un éster de proteína, un monoglicérido o un diglicérido, y en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lipido aciltransferasa al alimento.

25 La utilización de una lipido aciltransferasa para preparar a partir de un material alimenticio un alimento que comprende un emulsionante, en la que el emulsionante es generado a partir de constituyentes del material alimenticio mediante la lipido aciltransferasa.

30 La utilización de una lipido aciltransferasa para preparar a partir de un material alimenticio un alimento que comprende un emulsionante, en la que el emulsionante es producido sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en el alimento, y en la que el emulsionante es generado a partir de los constituyentes del material alimenticio mediante la lipido aciltransferasa.

35 La utilización de una lipido aciltransferasa para preparar a partir de un material alimenticio un alimento que comprende un emulsionante y un éster de esteroles y/o éster de estanol, en la que el emulsionante es producido sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en un alimento, y en la que el emulsionante y/o el éster de esteroles y/o éster de estanol es/son generado/s a partir de constituyentes del material alimenticio mediante la lipido aciltransferasa.

40 La utilización de una lipido aciltransferasa para preparar a partir de un material alimenticio un alimento que comprende un emulsionante y un éster de esteroles y/o éster de estanol, en la que el emulsionante y/o el éster de esteroles y/o el éster de estanol es/son generado/s a partir de los constituyentes del material alimenticio mediante la lipido aciltransferasa.

45 La utilización de una lipido aciltransferasa para preparar a partir de un material alimenticio un alimento que comprende por lo menos dos emulsionantes, en la que los dos son generados a partir de los constituyentes del material alimenticio mediante la lipido aciltransferasa.

50 La utilización de una lipido aciltransferasa para preparar a partir de un material alimenticio un alimento que comprende por lo menos dos emulsionantes y un éster de esteroles y/o un éster de estanol, en la que los emulsionantes son producidos sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en el alimento, y en la que uno o ambos de los emulsionantes y/o el éster de esteroles y/o el éster de estanol es/son generado/s a partir de los constituyentes del material alimenticio mediante la lipido aciltransferasa.

55 La utilización de una lipido aciltransferasa para preparar a partir de un material alimenticio un alimento que comprende por lo menos dos emulsionantes y un éster de esteroles y/o éster de estanol, en la que uno o ambos de los emulsionantes y/o el éster de esteroles y/o el éster de estanol es/son generado/s a partir de los constituyentes del material alimenticio mediante la lipido aciltransferasa.

60 La utilización de una lipido aciltransferasa para preparar a partir de un material alimenticio un alimento que comprende un éster de carbohidrato, en la que el éster de carbohidrato es generado a partir de los constituyentes del material alimenticio mediante la lipido aciltransferasa.

65 La utilización de una lipido aciltransferasa para preparar a partir de un material alimenticio un alimento que comprende por lo menos un éster de carbohidrato y un emulsionante adicional, en la que el éster de carbohidrato y el emulsionante son generados a partir de los constituyentes del material alimenticio mediante la lipido aciltransferasa.

La utilización de una lipido aciltransferasa para preparar a partir de un material alimenticio un alimento que comprende un emulsionante y uno o más de entre un éster de carbohidrato; un éster de estero; un éster de estanol; un éster de proteína; un monoglicérido o un diglicérido, y en la que el emulsionante y/o el éster de carbohidrato y/o el éster de estero y/o el éster de estanol y/o el éster de proteína y/o el monoglicérido y/o el diglicérido es/son generado/s a partir de los constituyentes del material alimenticio mediante la lipido aciltransferasa.

Un procedimiento de producción *in situ* de un emulsionante, preferentemente una lisolecitina y un éster de estero en un alimento a base de huevo, en el que el procedimiento es tal que el emulsionante es producido sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en el alimento, y en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lipido aciltransferasa al alimento.

Un procedimiento de producción *in situ* de un emulsionante, preferentemente una lisolecitina, y un éster de estero en un alimento a base de huevo, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lipido aciltransferasa al alimento.

Un procedimiento de producción de un alimento a base de huevo que comprende un emulsionante, preferentemente una lisolecitina, y un éster de estero en un alimento a base de huevo, en el que el emulsionante es producido sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en el alimento, y en el que el procedimiento la etapa que consiste en añadir una lipido aciltransferasa al alimento.

Un procedimiento de producción de un alimento a base de huevo que comprende un emulsionante, preferentemente una lisolecitina, y un éster de estero en un alimento a base de huevo, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lipido aciltransferasa al alimento.

Alimento que puede obtenerse mediante, que es preferentemente obtenido mediante, un procedimiento según la presente invención.

Una composición enzimática para alimentos y/o una composición enzimática para piensos, que contienen una lipido aciltransferasa, y la utilización de dicha composición en los procedimientos de la presente invención.

Un procedimiento de identificación de una lipido aciltransferasa adecuada para su utilización según la presente invención, que comprende las etapas que consisten en someter a prueba la enzima de interés utilizando uno o más de entre el "ensayo de transferasa en un medio con bajo contenido en agua", el "ensayo de transferasa en yema de huevo con alto contenido en agua", o el "ensayo de transferasa en sustrato tamponado", y seleccionar una lipido aciltransferasa si se trata de una que presenta una o más de las características siguientes: (a) cuando se somete a prueba utilizando el "ensayo de transferasa en un medio con bajo contenido en agua", medido tras un periodo de tiempo seleccionado de entre 30, 20 ó 120 minutos, presenta una actividad de transferasa relativa de por lo menos 1%; (b) cuando es sometida a prueba utilizando el "ensayo de transferasa en una yema de huevo con alto contenido en agua" en una yema de huevo con 54% de agua, presenta hasta 100% de actividad de transferasa relativa; o (c) cuando es sometida a prueba utilizando el "ensayo de transferasa en un sustrato tamponado" presenta una actividad de aciltransferasa de por lo menos 2%.

Una lipido aciltransferasa identificada utilizando un procedimiento dado a conocer en la presente memoria.

Una enzima lipido aciltransferasa inmovilizada como se ha definido en la presente memoria.

Aspectos detallados de la presente invención

La expresión "lipido aciltransferasa" tal como se utiliza en la presente memoria significa una enzima que asimismo tiene actividad de lipasa (generalmente clasificada como E.C.3.1.1.x según las Recomendaciones para Nomenclatura de Enzimas (1992) del Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular) además tiene actividad de aciltransferasa (generalmente clasificada como E.C.2.3.1.x) por lo que la enzima puede transferir un grupo acilo desde un lipido a uno o más sustratos receptores, tales como uno o más de los siguientes: un estero; un estanol; un carbohidrato; una proteína; una subunidad proteica; glicerol.

Preferentemente, la lipido aciltransferasa para su utilización en los procedimientos y/o utilizaciones de la presente invención puede transferir un grupo acilo desde un lipido (definido en la presente memoria) a uno o más de los siguientes sustratos de receptor acilo: un estero, un estanol; un carbohidrato; una proteína o subunidades de los mismos, o un glicerol.

Para algunos aspectos el "receptor de acilo" según la presente invención puede ser cualquier compuesto que comprenda un grupo hidroxilo (-OH), tal como por ejemplo, alcoholes polivalentes, incluyendo glicerol; estero; estanoles; carbohidratos; hidroxiácidos incluyendo ácidos de frutas, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico y ácido ascórbico; proteínas o una subunidad de las mismas, tales como aminoácidos, hidrolizados de proteínas y péptidos (proteínas parcialmente hidrolizadas) por ejemplo; y mezclas y derivados de los mismos. Preferentemente, el "receptor de acilo" según la presente invención no es el agua.

En una forma de realización, el receptor de acilo preferentemente no es un monoglicérido ni un diglicérido.

En otro aspecto, preferentemente la enzima puede transferir un grupo acilo desde un lípido a un esteroil y/o estanol.

En un aspecto, preferentemente la enzima puede transferir un grupo acilo desde un lípido a un carbohidrato.

En un aspecto, preferentemente la enzima puede transferir un grupo acilo desde un lípido a una proteína o una subunidad de la misma. Apropriadamente la subunidad proteica puede ser una o más de las siguientes: un aminoácido, un hidrolizado de proteína, un péptido, un dipéptido, un oligopéptido y un polipéptido.

Apropriadamente en la proteína o la subunidad proteica el receptor acilo puede ser uno o más de los siguientes constituyentes de la proteína o subunidad proteica: una serina, una treonina, una tirosina o una cisteína.

Cuando la subunidad proteica es un aminoácido, apropiadamente el aminoácido puede ser cualquier aminoácido adecuado. Apropriadamente el aminoácido puede ser por ejemplo uno o más de entre una serina, una treonina, una tirosina o una cisteína.

En un aspecto, preferentemente, la enzima puede transferir un grupo acilo desde un lípido a un glicerol.

En un aspecto, preferentemente, la enzima puede transferir un grupo acilo desde un lípido a un hidroxilácido.

En un aspecto, preferentemente, la enzima puede transferir un grupo acilo desde un lípido a un alcohol polivalente.

En un aspecto, la lípido aciltransferasa puede, asimismo ser capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido a un esteroil y/o un estanol, además puede ser capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido a uno o más de los siguientes: un carbohidrato, una proteína; una subunidad proteica, glicerol.

Preferentemente, el sustrato lipídico en el que actúa la lípido aciltransferasa según la presente invención, es uno o más de los lípidos siguientes: un fosfolípido, tal como una lecitina, por ejemplo, fosfatidilcolina, un triacilglicérido, una cardiolipina, un diglicérido o un glucolípido, tal como por ejemplo digalactosildiglicérido (DGDG). El sustrato lipídico puede denominarse en la presente memoria "donante acil lipídico". El término lecitina tal como se utiliza en la presente memoria comprende fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.

Para algunos aspectos, preferentemente el sustrato lipídico sobre el que actúa la lípido aciltransferasa es un fosfolípido, tal como lecitina, por ejemplo fosfatidilcolina.

Para algunos aspectos, preferentemente el sustrato lipídico es un glucolípido, tal como por ejemplo DGDG.

Preferentemente el sustrato lipídico es un lípido alimenticio, es decir un componente lipídico de un alimento.

Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa según la presente invención, es incapaz, o sustancialmente incapaz, de actuar sobre un triglicérido y/o un 1-monoglicérido y/o 2-monoglicérido.

Apropriadamente, el sustrato lipídico o donante acil lipídico puede ser uno o más lípidos presentes en uno o más de los sustratos siguientes: grasas, incluyendo manteca, cebo y grasa de mantequilla; aceites incluyendo los aceites extraídos o precedentes de aceite de palma, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semillas de algodón, aceite de nuez, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de coco y aceite de linaza. La lecitina de soja, la semilla de linaza o la yema de huevo es también un sustrato lipídico adecuado. Sustrato lipídico puede ser un lípido de avena o de otro material vegetal que contenga galactolípidos.

En un aspecto, el donante de acilo lipídico es preferentemente lecitina (tal como fosfatidilcolina) en la yema de huevo.

Para algunos aspectos de la presente invención, el lípido puede seleccionarse de entre los lípidos que tienen una longitud de cadena del ácido graso de 8 a 22 carbonos.

Para algunos aspectos de la presente invención, el lípido puede seleccionarse de entre los lípidos que tienen una longitud de cadena del ácido graso de 16 a 22 carbonos, más preferentemente de 16 a 20 carbonos.

Para algunos aspectos de la presente invención, el lípido puede seleccionarse de entre los lípidos que tienen una longitud de cadena del ácido graso no superior a 14 carbonos aproximadamente de lípidos que presentan una longitud de cadena de ácidos grasos de 4 a 14 carbonos, apropiadamente de 4 a 10 carbonos, apropiadamente de 4 a 8 carbonos.

Apropiadamente, la lípido aciltransferasa según la presente invención, puede presentar una o más de las siguientes actividades de lipasa: actividad de glucolipasa (E.C. 3.1.1.26), actividad de triacilglicerol lipasa (E.C. 3.1.1.3), actividad de fosfolipasa A2 (E.C.3.1.1.4) o actividad de fosfolipasa A1 (E.C.3.1.1.32). La expresión "actividad de glucolipasa" tal como se utiliza en la presente memoria comprende la "actividad de galactolipasa".

5 Apropiadamente, la lípido aciltransferasa según la presente invención, puede tener por lo menos una o más de las siguientes actividades: actividad de glucolipasa (E.C. 3.1.1.26) y/o actividad de fosfolipasa A1 (E.C.3.1.1.32) y/o actividad de fosfolipasa A2 (E.C.3.1.1.4).

10 Para algunos aspectos, la lípido aciltransferasa según la presente invención, puede tener al menos actividad de glucolipasa (E.C.3.1.1.26).

Apropiadamente, para algunos aspectos la lípido aciltransferasa según la presente invención, puede ser capaz de transferir un grupo acilo desde un glucolípido y/o un fosfolípido a uno o más de los siguientes sustratos receptores: un esterol, un estanol, un carbohidrato, una proteína y un glicerol.

15 Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa según la presente invención, puede transferir un grupo acilo desde un glucolípido y/o un fosfolípido a un esterol y/o un estanol para formar por lo menos un éster de esterol y/o un éster de estanol.

20 Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa según la presente invención, puede transferir un grupo acilo desde un glucolípido y/o un fosfolípido a un carbohidrato para formar por lo menos un éster de carbohidrato.

25 Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa según la presente invención, puede transferir un grupo acilo desde un glucolípido y/o un fosfolípido a una proteína para formar por lo menos una proteína éster (o un condensado proteína ácido graso).

30 Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa según la presente invención, puede transferir un grupo acilo desde un glucolípido y/o un fosfolípido a un glicerol para formar por lo menos un diglicérido y/o un monoglicérido.

35 Para algunos aspectos, preferentemente la lípido aciltransferasa según la presente invención no presenta actividad de triacilglicerol lipasa (E.C. 3.1.1.3).

En algunos aspectos, la lípido aciltransferasa puede ser capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido a un esterol o a un estanol o a una combinación de un esterol y un estanol. Por lo tanto, en una forma de realización el "receptor de acilo" según la presente invención puede ser un esterol o un estanol o una combinación de un esterol y un estanol.

40 En una forma de realización, apropiadamente el esterol y/o estanol puede comprender una o más de las siguientes propiedades estructurales:

- 45 i) un grupo 3-beta hidroxilo o un grupo 3-alfa hidroxilo, y/o
- ii) los anillos A:B en posición *cis* o los anillos A:B en la posición *trans* o C₅-C₆ está insaturado.

50 Los receptores de esterol acilo adecuados incluyen colesterol y fitosteroles, por ejemplo alfa-sitosterol, beta-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, campesterol, 5,6-di-hidrosterol, brasicasterol, alfa-espinasterol, beta-espinasterol, gamma-espinasterol, delta-espinasterol, fucosterol, dimosterol, ascosterol, serebisterol, episterol, anasterol, hiposterol, condrilasterol, desmosterol, chalinosterol, poriferasterol, clionasterol, glucósidos de esterol y otras formas y derivados isoméricos naturales o sintéticos.

55 En un aspecto de la presente invención apropiadamente más de un esterol y/o estanol puede actuar como receptor de acilo, apropiadamente más de dos esteroides y/o estanoles pueden actuar como receptor de acilo. En otras palabras en un aspecto de la presente invención, puede producirse apropiadamente más de un éster de esterol y/o de un éster de estanol. Apropiadamente cuando el colesterol es el receptor de acilo uno o más esteroides adicionales o uno o más estanoles pueden actuar como receptor de acilo. Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un método para la producción *in situ* tanto del éster de colesterol como al menos de un esterol o de un éster 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 tanto a un colesterol como al menos a un esterol adicional y/o al menos a un estanol.

65 En un aspecto, preferentemente el receptor de esterol acilo es uno más de los siguientes: alfa-sitosterol, beta-sitosterol, estigmasterol, ergosterol y campesterol.

En un aspecto, preferentemente el receptor de esterol acilo es el colesterol. Cuando el caso es que el colesterol es el receptor de acilo para la lípido aciltransferasa, la cantidad de colesterol libre en el alimento se reduce en comparación con el alimento antes de la exposición a la lípido aciltransferasa en comparación con un alimento equivalente que no ha sido tratado con la lípido aciltransferasa.

Los receptores adecuados de estanol acilo incluyen fitostanoles, por ejemplo beta-sitostanol o ss-sitostanol.

En un aspecto, preferentemente el receptor de esterol y/o estanol acilo es un esterol y/o un estanol distinto del colesterol.

En algunos aspectos, el alimento preparado según la presente invención puede utilizarse para reducir el colesterol del suero sanguíneo y/o para reducir la lipoproteína de baja densidad. El colesterol del suero sanguíneo y las lipoproteínas de baja densidad se han asociado ambos a determinadas enfermedades en seres humanos, tales como, por ejemplo, la aterosclerosis y/o cardiopatías. Por tanto, está previsto que los alimentos preparados según la presente invención pueden utilizarse para reducir el riesgo de dichas enfermedades.

Por tanto, en un aspecto la presente invención proporciona la utilización de un alimento según la presente invención para su utilización en el tratamiento y/o prevención de la aterosclerosis y/o cardiopatías.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un medicamento que comprende un alimento según la presente invención.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento y/o presentación de una enfermedad en un paciente humano o animal cuyo procedimiento comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de un alimento según la presente invención.

Apropiadamente, el esterol y/o el estanol "receptor de acilo" puede encontrarse de forma natural en el alimento. Alternativamente, el esterol y/o el estanol puede añadirse al alimento. Cuando es el caso que un esterol y/o un estanol se añade al alimento, el esterol y/o el estanol pueden añadirse antes, simultáneamente y/o después de la adición de la lípido aciltransferasa según la presente invención. Apropiadamente, la presente invención puede comprender la adición de esteroides/estanoles exógenos, particularmente sitosteroides/fitoestanoles al alimento antes o simultáneamente que la adición de la enzima según la presente invención.

Para algunos aspectos, uno o más esteroides presentes en el alimento pueden transformarse en uno o más estanoles antes o a la vez que se añade la lípido aciltransferasa según la presente invención. Puede emplearse cualquier procedimiento adecuado para convertir los esteroides en estanoles. Por ejemplo, puede llevarse a cabo la conversión por hidrogenación química. La conversión puede realizarse antes de la adición de la lípido aciltransferasa según la presente invención o a la vez que la adición de la lípido aciltransferasa según la presente invención. Apropiadamente las enzimas para la conversión de esterol en estanoles, se dan a conocer en el documento WO 00/061771.

Apropiadamente la presente invención puede emplearse para producir ésteres de fitoestanol *in situ* en un alimento. Los ésteres de fitoestanol han aumentado la solubilidad a través de las membranas lipídicas, la biodisponibilidad y aumentado la utilidad sanitaria (véase por ejemplo el documento WO 92/99640).

En algunas formas de realización de la presente invención el éster de estanol y/o el éster de esterol puede ser un aromatizante y/o un producto que da textura. En cuyos casos, la presente invención comprende la producción *in situ* de aromatizantes y/o productos que dan textura.

Para algunos aspectos de la presente invención, la lípido aciltransferasa según la presente invención, puede utilizar un carbohidrato como receptor de acilo. El carbohidrato receptor de acilo puede ser uno o más de entre los siguientes: un monosacárido, un disacárido, un oligosacárido o un polisacárido. Preferentemente, el carbohidrato es uno o más de los siguientes: glucosa, fructosa, anhidrofructosa, maltosa, lactosa, sacarosa, galactosa, xilosa, xilooligosacáridos, arabinosa, maltooligosacáridos, tagatosa, microteicina, ascopirona P, ascopirona T o cortalceroa.

Apropiadamente, el carbohidrato "receptor de acilo" puede encontrarse de forma natural en el alimento. Alternativamente, el carbohidrato puede añadirse al alimento. Cuando es el caso que el carbohidrato se añade al alimento, el carbohidrato puede añadirse antes, a la vez y/o después de la adición de la lípido aciltransferasa según la presente invención.

Los ésteres de carbohidrato pueden funcionar como emulsionantes valiosos en los alimentos. Por tanto, cuando se da el caso que la enzima funciona para transferir el grupo acilo a un azúcar, la invención comprende la producción de un segundo emulsiónate *in situ* en el alimento.

En algunas formas de realización, la lípido aciltransferasa puede utilizar tanto un esterol como un estanol y un carbohidrato como receptor de acilo.

La utilización de la lípido aciltransferasa que puede transferir a continuación un grupo acilo a un carbohidrato así como a un esteroles y/o un estanol es particularmente ventajosa para los alimentos que contienen huevo. En particular, la presencia de azúcares, en particular glucosa, en huevos y en productos de huevo se observa con frecuencia como desventajosa. La yema de huevo puede comprender hasta el 1% de glucosa. Por lo general, el huevo o los productos a base de huevo pueden tratarse con glucosa oxidasa para eliminar algo de glucosa o toda ella. Sin embargo, según la presente invención este azúcar indeseado puede eliminarse fácilmente "esterificando" el azúcar para formar un éster del azúcar.

Para algunos aspectos de la presente invención, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede utilizar una proteína componente receptor de acilo. Apropiadamente, la proteína puede ser una o más de las proteínas encontradas en un producto alimenticio, por ejemplo en un producto lácteo y/o un producto cárnico. A modo de ejemplo solamente, las proteínas adecuadas pueden ser las encontradas en la cuajada o en el suero de la leche, tal como la lactoglobulina. Otras proteínas adecuadas incluyen la ovoalbúmina del huevo, gliadina, glutenina, puroindolina, proteínas de granos de transferencia de lípidos y miosina de la carne.

Por tanto según la presente invención, pueden conseguirse una o más de las siguientes propiedades ventajosas: producción *in situ* de un emulsionante sin aumento de ácidos grasos libres; una reducción en la acumulación de ácidos grasos libres en el alimento, una reducción en las concentraciones de colesterol libre en el alimento; un aumento en los ésteres de esteroles y/o ésteres de estanol; una reducción en el colesterol del suero sanguíneo y/o de lipoproteínas de baja densidad; un aumento en los ésteres de carbohidrato; una reducción en los carbohidratos libres indeseados.

Una ventaja de la presente invención es que el/los emulsionante(s) se prepara(n) *in situ* en el alimento sin aumento, o aumento sustancial, en el contenido en ácido graso libre en el alimento. La producción de ácidos grasos libres puede ser perjudicial para los alimentos. En particular, los ácidos grasos libres han estado ligados a falta de olor y/o falta de aromas en los alimentos, así como otros efectos perjudiciales, incluyendo, por ejemplo, un sabor jabonoso en el queso. Preferentemente, el método según la presente invención da como resultado la preparación *in situ* de uno o unos emulsionante(s) en el/los que la acumulación de ácidos grasos libres se reduce y/o elimina. Sin desear estar ligado por la teoría, según la presente invención el ácido graso que es eliminado del lípido es transferido por la lípido aciltransferasa a un receptor de acilo, por ejemplo un esteroles y/o un estanol. De este modo, la concentración total de ácidos grasos libres en el alimento no aumentan o aumenta solamente en un grado insignificante. Esto está en contraposición tajante con la situación cuando se utilizan lipasas (E.C.3.1.1.x) para producir emulsionantes *in situ*. En particular, la utilización de lipasas puede producir un aumento de la cantidad de ácido graso libre en el alimento, que puede ser perjudicial. Según la presente invención, la acumulación de ácidos grasos libres se reduce y/o elimina en comparación con la cantidad de ácidos grasos libres que habrían sido acumulados si habría una enzima lipasa, en particular, se ha utilizado una enzima fosfolipasa A, en lugar de la lípido aciltransferasa según la presente invención.

La utilización de una lípido aciltransferasa que puede transferir el grupo acilo a un esteroles y/o estanol puede ser particularmente ventajosa para los alimentos que contienen huevos. En particular, se ha descubierto que puede obtenerse un producto a base de huevo con propiedades significativamente mejores siguiendo el tratamiento con una lípido aciltransferasa tal como se define en la presente memoria en comparación con los productos a base de huevo tratados con la fosfolipasa convencional, tal como, por ejemplo, Lipopan F[®] (Novozymes A/S, Dinamarca), Lecitase Ultra[®] (Novozymes A/S, Dinamarca) o Lipomod 22 L de Biocatalysts.

Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede caracterizarse utilizando los siguientes criterios:

(i) la enzima posee actividad de aciltransferasa que puede definirse como actividad de transferencia del éster por lo que la parte acilo de un enlace éster original de un donante de lípido acilo se transfiere a un receptor de acilo para formar un nuevo éster; y

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

Preferentemente, X del motivo GDSX es L. De este modo, preferentemente, la enzima según la presente invención comprende el motivo GSDL de la secuencia de aminoácidos.

El motivo GDSX se compone de cuatro aminoácidos conservados. Preferentemente, la serina dentro del motivo es una serina catalítica de la enzima lípido aciltransferasa. Apropiadamente, la serina del motivo GDSX puede estar en una posición correspondiente a Ser-16 en la enzima lipolítica *Aeromonas hydrophila* dada a conocer en Brumlik & Buckley (Journal of Bacteriology, abril de 1966, Vol.178, n° 7, págs.2060-2064).

Para determinar si una proteína tiene el motivo GDSX según la presente invención, la secuencia se compara preferentemente con los perfiles ocultos del modelo Marcov (perfiles HMM) de la base de datos pfam.

La Pfam es una base de datos de las familias de dominio proteico. Pfam contiene múltiples alineaciones de la secuencia curadas para cada familia así como modelos de perfil Markov ocultos (perfiles HMM) para identificar estos dominios en nuevas secuencias. Una introducción de Pfam puede encontrarse en Bateman A. *et al.* (2002) *Nucleic Acids Res.* 30, 276-280. Los modelos ocultos de Markov se utilizan en numerosas bases de datos que ayudan a clasificar proteínas, para estudios véase 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=12230032&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 informático Hammer puede adquirirse en la Universidad de Washington St. Louis, USA.

Alternativamente, el motivo GDSX puede identificarse utilizando el paquete informático Hammer, las instrucciones se proporcionan 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 las referencias en ésta, y el perfil HMMER2 proporcionado en esta memoria.

A la base de datos PFAM puede accederse, por ejemplo, mediante varios servidores que están situados actualmente en las siguientes páginas 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 una facilidad de búsqueda dónde se puede introducir una secuencia de proteínas. Utilizando los parámetros por defecto de la base de datos en la secuencia de proteínas se analizará a continuación la presencia de dominios Pfam. El dominio GDSX es un dominio creado en la base de datos y como tal se reconocerá su presencia en cualquier secuencia buscada. La base de datos volverá la alineación de la secuencia de consenso Pfam00657 a la secuencia de consulta.

Una alineación múltiple, que incluye *Aeromonas salmonicida* o *Aeromonas hydrophila* puede obtenerse:

a) en manual

se obtiene una alineación de la proteína de interés con la secuencia de consenso Pfam00657 y se obtiene una alineación de P10480 con la secuencia de consenso Pfam00657 siguiendo el procedimiento descrito anteriormente;

b) mediante la base de datos

Tras la identificación de la secuencia de consenso Pfam00657 la base de datos ofrece la opción de mostrar una alineación de la secuencia de consulta para la alineación sembrada de la secuencia de consenso Pfam00657. P10480 es una parte de esta alineación en ciernes y está indicada por GCAT_AERHY. Tanto la secuencia de consulta como P10480 se presentarán en el mismo intervalo.

Secuencia de referencia de *Aeromonas hydrophila*

Los restos de la GDSX lipasa de *Aeromonas hydrophila* están numerados en el archivo P10480 de NCBI, las cifras en este texto se refieren a los números dados en este archivo que se utiliza en la presente invención para determinar los restos de aminoácidos específicos que, en una forma de realización preferida están presentes en las enzimas lípido aciltransferasa de la invención.

Se llevó a cabo la alineación de Pfam (figuras 33 y 34):

Los restos conservados siguientes pueden ser reconocidos y en una forma de realización preferida pueden estar presentes en las enzimas para su utilización en las composiciones y procedimientos de la invención;

Bloque 1 - Bloque GDSX

```
hid hid hid hid Gly Asp Ser hid
28 29 30 31 32 33 34 35
```

Bloque 2 - Bloque GANDY

hid Gly hid Asn Asp hid
130 131 132 133 134 135

5

Bloque 3 - Bloque HPT

His
309

10 En los que "hid" significa un resto hidrófobo seleccionado de entre Met, Ile, Leu, Val, Ala, Gly, Cys, His, Lys, Trp, Tyr, Phe.

Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa para su utilización en las composiciones o procedimientos de la invención puede alinearse utilizando la secuencia de consenso Pfam00657.

15

Preferentemente, un emparejamiento positivo con el perfil (perfil HMM) oculto del modelo Markov de la familia del dominio pfam00657 indica la presencia del dominio GDSL o GDSX según la presente invención.

20 Preferentemente cuando se alinea con la secuencia de consenso Pfam00657 la lípido aciltransferasa para su utilización en las composiciones o procedimientos de la invención tiene por lo menos uno, preferentemente más de uno, preferentemente más de dos, de los bloques siguientes, un bloque GDSx, un bloque GANDY, un bloque HPT. Apropiadamente, la lípido aciltransferasa puede tener un bloque GDSx y un bloque GANDY. Alternativamente, la enzima puede tener un bloque GDSx y un bloque HPT. Preferentemente la enzima comprende por lo menos un bloque GDSx.

25

Preferentemente, cuando se alinean con la secuencia de consenso de Pfam00657 las enzimas para utilización en las composiciones o procedimientos de la invención tienen por lo menos uno, preferentemente más de uno, preferentemente más de dos, preferentemente más de tres, preferentemente más de cuatro, 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 de aminoácido en comparación con la secuencia polipeptídica de *A. hydrophila* de referencia, es decir la SEC. ID. nº 32: 28hid, 29hid, 30hid, 31hid, 32gly, 33Asp, 34Ser, 35hid, 130hid, 131Gly, 132Hid, 133Asn, 134Asp, 135hid, 309His.

30

35 El dominio GDSX de pfam00657 es un identificador exclusivo que distingue las proteínas que posee este dominio de otras enzimas.

La secuencia de consenso de Pfam00657 se presenta en la figura 1 como SEC. ID. nº 1. Ésta procede de la identificación de la familia 00657 de pfam, base de datos versión 6, que puede denominarse también pfam00657.6 en la presente memoria.

40

La secuencia de consenso puede actualizarse utilizando más ediciones de la base de datos pfam.

Por ejemplo, las figuras 33 y 34 presentan la alineación pfam de la familia 00657 de la base de datos versión 11, que puede denominarse también pfam 00657.11 en la presente memoria.

45

La presencia de los bloques GDSx, GANDY y HPT se descubrieron en la familia 00657 de pfam procedente de ambas ediciones de la base de datos. Pueden utilizarse ediciones futuras de la base de datos pfam para identificar la familia 00657 de pfam.

50

Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede caracterizarse utilizando los criterios siguientes:

(i) la enzima posee actividad de aciltransferasa que puede definirse como actividad para transferencia de éster por lo que la parte acilo del enlace éster original de un donante lípido de acilo se transfiere al receptor de acilo para formar un nuevo éster;

55

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

60

(iii) la enzima comprende His-309 o comprende un resto de histidina en una posición correspondiente a His-309 en la secuencia de aminoácidos de la enzima lipolítica de *Aeromonas hydrophila* mostrada en la figura 2 (SEC. ID. nº. 2 o SEC. ID. nº. 32).

Preferentemente, el resto de aminoácidos del motivo GDSX es L.

En la SEC. ID. nº. 2 o SEC. ID. nº. 32, los primeros 18 restos de aminoácidos forman una secuencia señal. His-309 de la secuencia completa, que es la proteína que incluye la secuencia señal, es igual a His-291 de la parte madura de la proteína, es decir la secuencia sin secuencia señal.

Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención comprende la siguiente triada catalítica: Ser-34, Asp-134 y His-309 o comprende un resto de serina, un resto de ácido aspártico y un resto de histidina, respectivamente, en las posiciones correspondientes a Ser-34, Asp-134 e His-309 en la enzima lipolítica de *Aeromonas hydrophila* mostrada en la figura 2 (SEC. ID. nº. 2) o en la figura 28 (SEC. ID. nº. 32). Como se indicó anteriormente, en la secuencia mostrada en SEC. ID. nº. 2 o SEC. ID. nº. 32 los primeros 18 restos de aminoácidos forman una secuencia señal. Ser-34, Asp-134 e His-309 de la secuencia completa, que es la proteína que incluye la secuencia final es igual a Ser-16, Asp-116 y His-291 de la parte madura de la proteína, es decir la secuencia sin la secuencia señal. En la secuencia de consenso Pfam00657, como se proporciona en la figura 1 (SEC. ID. nº. 1) los restos de la zona activa corresponden a Ser-7, Asp-157 y His-348.

Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede caracterizarse utilizando los criterios siguientes:

- (i) la enzima posee actividad de aciltransferasa que puede definirse como actividad para transferencia de éster por lo que la parte acilo del enlace éster original de un primer donante de lípido acilo se transfiere al receptor de acilo para formar un nuevo éster;
- (ii) la enzima comprende por lo 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 correspondientes a Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-134 e His-309, respectivamente, en la enzima lipolítica de *Aeromonas hydrophila* mostrada en la figura 2 (SEC. ID. nº. 2) o Fig. 28 (SEC. ID. nº. 32).

Apropiadamente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede obtenerse, preferentemente se obtiene, a partir de organismos de uno o más de los géneros siguientes: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Candida*.

Apropiadamente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede obtenerse, preferentemente se obtiene de uno o más de los organismos siguientes: *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces rimosus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus thermophilus*, *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* y *Candida parapsilosis*.

En un aspecto, preferentemente la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede obtenerse, preferentemente se obtiene, a partir de uno o más de entre *Aeromonas hydrophila* o *Aeromonas salmonicida*.

Apropiadamente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención, comprende uno o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- (i) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 2 (véase la figura 2)
- (ii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 3 (véase la figura 3)
- (iii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 4 (véase la figura 4)
- (iv) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 5 (véase la figura 5)
- (v) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 6 (véase la figura 6)
- (vi) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 12 (véase la figura 14)
- (vii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 20 (véase la figura 16)
- (viii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 22 (véase la figura 18)

(ix) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 24 (véase la figura 20)

(x) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 26 (véase la figura 22)

5 (xi) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 28 (véase la figura 24)

(xii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 30 (véase la figura 26)

(xiii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 32 (véase la figura 28)

10 (xiv) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 34 (véase la figura 30) o una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más de identidad con cualquiera de las secuencias mostradas como SEC. ID. nº 2, SEC. ID. nº 3, SEC. ID. nº 4, SEC. ID. nº 5, SEC. ID. nº 6, SEC. ID. nº 12, SEC. ID. nº 20, SEC. ID. nº 22, SEC. ID. nº 24, SEC. ID. nº 26, SEC. ID. nº 28, SEC. ID. nº 30, SEC. ID. nº 32 o SEC. ID. nº 34.

15 Apropriadamente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención, comprende ya sea la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 2 o como SEC. ID. nº 3, o SEC. ID. nº 32 o SEC. ID. nº 34 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más, preferentemente 80% o más, preferentemente 85% o más, preferentemente 90% o más, preferentemente 95% o más, de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 2 o la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 3 o la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 32 o la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC. ID. nº 34.

20 En aras de la presente invención, el grado de identidad se basa en el número de elementos de secuencia que son iguales. El grado de identidad según la presente invención puede determinarse adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la materia tal como GAP suministrado en el paquete del programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, versión 8, agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, US53711) (Needleman & Wunsch (1970), *J. of Molecular Biology* 48, 433-45) utilizando los siguientes conjuntos para comparación de la secuencia de polipéptidos: penalización por creación de GAP de 3,0 y penalización por ampliación de GAP de 0,1.

30 Apropriadamente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención, comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más, preferentemente 85% o más, más preferentemente 90% o más, y aún más preferentemente 95% o más identidad que cualquiera de las secuencias mostradas como SEC. ID. nº 2, SEC. ID. nº 3, SEC. ID. nº 4, SEC. ID. nº 5, SEC. ID. nº 6, SEC. ID. nº 12, SEC. ID. nº 20, SEC. ID. nº 22, SEC. ID. nº 24, SEC. ID. nº 26, SEC. ID. nº 28, SEC. ID. nº 30, SEC. ID. nº 32 o SEC. ID. nº 34.

35 Apropriadamente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención, comprende uno o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

40 (a) una secuencia de aminoácidos mostrada como los restos 1 a 100 de aminoácidos de la SEC. ID. nº 2 o la SEC. ID. nº 32;

(b) una secuencia de aminoácidos mostrada como los restos 101 a 200 de aminoácidos de la SEC. ID. nº 2 o la SEC. ID. nº 32;

45 (c) una secuencia de aminoácidos mostrada como los restos 201 a 300 de aminoácidos de la SEC. ID. nº 2 o la SEC. ID. nº 32; o

50 (d) una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más, preferentemente 85% o más, más preferentemente 90% o más, y aún más preferentemente 95% o más identidad que cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas en los apartados (a) a (c) anteriormente.

Apropriadamente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención, comprende uno o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

55 (a) una secuencia de aminoácidos mostrada como los restos 28 a 39 de aminoácidos de la SEC. ID. nº 2 o la SEC. ID. nº 32;

60 (b) una secuencia de aminoácidos mostrada como los restos 77 a 78 de aminoácidos de la SEC. ID. nº 2 o la SEC. ID. nº 32;

(c) una secuencia de aminoácidos mostrada como los restos 126 a 136 de aminoácidos de la SEC. ID. nº 2 o la SEC. ID. nº 32;

65 (d) una secuencia de aminoácidos mostrada como los restos 163 a 175 de aminoácidos de la SEC. ID. nº 2 o la SEC. ID. nº 32;

(e) una secuencia de aminoácidos mostrada como los restos 304 a 311 de aminoácidos de la SEC. ID. nº 2 o la SEC. ID. nº 32; o

5 (f) una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más, preferentemente 85% o más, más preferentemente 90% o más, y aún más preferentemente 95% o más identidad que cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas en los apartados (a) a (e) anteriormente.

10 Apropiadamente, la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención, puede comprender una secuencia de aminoácidos producida por la expresión de uno o más de las siguientes secuencias nucleotídicas:

- (a) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 7 (véase la figura 9);
- (b) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 8 (véase la figura 10);
- (c) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 9 (véase la figura 11);
- 15 (d) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 10 (véase la figura 12);
- (e) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 11 (véase la figura 13);
- (f) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 13 (véase la figura 15);
- (g) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 21 (véase la figura 17);
- (h) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 23 (véase la figura 19);
- 20 (i) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 25 (véase la figura 21);
- (j) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 27 (véase la figura 23);
- (k) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 29 (véase la figura 25);
- (l) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 31 (véase la figura 27);
- (m) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 33 (véase la figura 29);
- 25 (n) la secuencia nucleotídica mostrada como SEC. ID. nº 35 (véase la figura 31);
- (o) o

30 una secuencia nucleotídica que tiene 75% o más de identidad con cualquiera de las secuencias mostradas como SEC. ID. nº 7, SEC. ID. nº 8, SEC. ID. nº 9, SEC. ID. nº 10, SEC. ID. nº 11, SEC. ID. nº 13, SEC. ID. nº 21, SEC. ID. nº 23, SEC. ID. nº 25, SEC. ID. nº 27, SEC. ID. nº 29, SEC. ID. nº 31, SEC. ID. nº 33 o SEC. ID. nº 35.

35 Apropiadamente, la secuencia nucleotídica puede tener 80% o más, preferentemente 85% o más, más preferentemente 90% o más, y aún más preferentemente 95% o más identidad que cualquiera de las secuencias mostradas como SEC. ID. nº 7, SEC. ID. nº 8, SEC. ID. nº 9, SEC. ID. nº 10, SEC. ID. nº 11, SEC. ID. nº 13, SEC. ID. nº 21, SEC. ID. nº 23, SEC. ID. nº 25, SEC. ID. nº 27, SEC. ID. nº 29, SEC. ID. nº 31, SEC. ID. nº 33 o SEC. ID. nº 35.

40 En un aspecto, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede ser una lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT) o una variante de la misma (por ejemplo un variante construida por evolución molecular).

Las LCAT adecuadas son conocidas en la técnica y pueden obtenerse a partir de uno o más de los organismos siguientes, por ejemplo: mamíferos, ratas, ratones, pollos, *Drosophila melanogaster*, plantas, incluyendo *Arabidopsis* y *Oryza sativa*, nematodos, hongos y levaduras.

45 En una forma de realización de la invención la enzima lípido aciltransferasa según la presente invención puede ser la lípido aciltransferasa que puede obtenerse, se obtiene preferentemente, a partir de las cepas TOP 10 de *E. coli* que albergan pPet12aAhydro y pPet12aASalmo depositadas por Danisco A/S de Langebrogade 1, DK-1001, Copenhague, K, Dinamarca bajo el tratado de Budapest en Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para el Procedimiento de Patente en la National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria (NCIMB) 23 St. Machar Street, Aberdeen, Escocia, GB; el 22 de diciembre de 2003 con los números de registro NICMB 41204 y NCIMB 41205, respectivamente.

55 Preferentemente, al realizar un procedimiento según la presente invención el producto se produce sin aumentar o aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en el producto alimenticio.

El término "transferasa" tal como se utiliza en la presente memoria es intercambiable con la expresión "lípido aciltransferasa".

60 Apropiadamente, la lípido aciltransferasa definida en la presente memoria cataliza una o más de las reacciones siguientes: interesterificación, transesterificación, alcoholisis e hidrólisis.

El término "interesterificación" se refiere a la transferencia enzimática catalizada de grupos acilo entre un donante lípido y un receptor de lípido, en el que el donante lípido no es un grupo acilo libre.

El término "transesterificación" tal como se utiliza en la presente memoria, significa la transferencia enzimática catalizada de un grupo acilo entre un donante lípido (distinto de un ácido graso libre) a un receptor de acilo (distinto del agua).

5 Tal como se utiliza en la presente memoria el término "alcoholólisis" se refiere a la escisión enzimática de un enlace covalente de un derivado ácido por reacción con un alcohol ROH de modo que uno de los productos se combina con el H del alcohol y el otro producto se combina con el grupo OR del alcohol.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "alcohol" se refiere a un compuesto alquilo que contiene un grupo hidroxilo.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "hidrólisis" se refiere a la transferencia enzimática catalizada de un grupo acilo desde de un lípido hasta el grupo OH de una molécula de agua. La transferencia del acilo que procede de la hidrólisis requiere la separación de la molécula de agua.

15 La expresión "sin aumentar o sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres" tal como se utiliza en la presente memoria, significa que preferentemente la lípido aciltransferasa según la presente invención tiene el 100% de actividad de transferasa (es decir transfiere el 100% de los grupos acilo de un donante acilo al receptor de acilo, sin actividad hidrolítica); sin embargo, la enzima puede transferir menos del 100% de los grupos acilo presentes en el donante acilo lípido al receptor de acilo. En cuyo caso, preferentemente la actividad de aciltransferasa supone por lo menos el 5%, más preferentemente por lo menos el 10%, más preferentemente por lo menos el 20%, más preferentemente por lo menos el 30%, más preferentemente por lo menos el 40%, más preferentemente por lo menos el 50%, más preferentemente por lo menos el 60%, más preferentemente por lo menos el 70%, más preferentemente por lo menos el 80%, más preferentemente por lo menos el 90% y más preferentemente por lo menos el 98% de la actividad enzimática total. El % de actividad de transferasa (es decir la actividad de transferasa en % de la actividad enzimática total) puede determinarse por el siguiente protocolo:

Protocolo para la determinación del % de actividad de aciltransferasa:

30 Un alimento al que se ha añadido una lípido aciltransferasa según la presente invención, puede extraerse siguiendo la reacción enzimática con $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ 2:1 y la fase orgánica que contiene el material lipídico se aísla y se analiza por GLC y HPLC según el procedimiento descrito en la presente memoria a continuación. A partir de los análisis GLC y HPLC se determina la cantidad de ácidos grasos libres y uno o más de ésteres de esteroles/estanol; ésteres de carbohidrato, ésteres de proteína; diglicéridos; o monoglicéridos. Se analiza de la misma manera un alimento de referencia al que no se ha añadido ninguna enzima según la presente invención.

Cálculo

40 A partir de los resultados de los análisis GLC y HPLC puede calcularse el aumento de ácidos grasos libres y de ésteres esteroles/estanol y/o ésteres de carbohidrato y/o ésteres de proteínas y/o diglicéridos y/o monoglicéridos:

Δ % de ácidos grasos = % de ácido graso (enzima) - % de ácido graso (referencia); Mv ácido graso = peso molecular medio de los ácidos grasos;

45 $A = \Delta\%$ de éster de esteroles/Mv éster de esteroles (en la que $\Delta\%$ de éster de esteroles = % de éster de esteroles/estanol (enzima) - % éster de esteroles/estanol (referencia) y Mv éster de esteroles = peso molecular medio de los ésteres esteroles/estanol) - aplicable cuando el receptor de acilo es un esteroles y/o estanol;

50 $B = \Delta$ % de éster de carbohidrato/Mv del éster de carbohidrato (en la que Δ % éster de carbohidrato = % éster de carbohidrato (enzima) - % de éster de carbohidrato (referencia) y Mv éster de carbohidrato = peso molecular medio del éster de carbohidrato - aplicable cuando el receptor de acilo es un carbohidrato;

55 $C = \Delta$ % éster de proteína/Mv del éster de proteína (en la que Δ % éster de proteína = % éster de proteína (enzima) - % éster de proteína (referencia) y Mv éster de proteína = peso molecular medio del éster de proteína - aplicable cuando el receptor de acilo es una proteína; y

60 $D =$ valor absoluto de glicérido y/o monoglicérido/Mv di/monoglicérido (cuando Δ % de diglicérido y/o monoglicérido = % diglicérido y/o monoglicérido (enzima) - % diglicérido y/o monoglicérido (referencia) y Mv di/monoglicérido = peso molecular medio del diglicérido y/o monoglicérido) aplicable cuando el receptor de lípidos es el glicerol.

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

$$\% \text{ de actividad de transferasa} = \frac{A^* + B^* + C^* + D^* \times 100}{A^* + B^* + C^* + D^* + \Delta \% \text{ ácido graso} / (\text{Mv ácido graso})}$$

* - eliminar cuando proceda.

Si los ácidos grasos libres aumentan en el alimento no aumentan con preferencia sustancialmente, es decir en un grado significativo. Los autores quieren decir con esto, que el aumento en ácido graso libre no afecta desfavorablemente la calidad del alimento.

En algunos aspectos de la presente invención, la expresión "sin aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres" tal como se utiliza en la presente invención significa que la cantidad de ácido graso libre en el alimento o en la composición tratada con una lipasa aciltransferasa según la presente invención es inferior a la cantidad del ácido graso libre producida en el alimento o en una composición cuando se ha utilizado una enzima distinta de una lipasa aciltransferasa según la presente invención, tal como por ejemplo en comparación con la cantidad de ácido graso libre producido cuando se ha utilizado una enzima fosfolipasa convencional, por ejemplo LipopanF® (Novozymes A/S, Dinamarca).

La expresión "*in situ*" tal como se utiliza en la presente memoria significa que el o los emulsionantes y/o los ésteres de esteroles/estanol y/o los ésteres de carbohidrato y/o los mono- o diglicéridos se producen en el alimento o una fracción del alimento. Esto contrasta con la situación en la que, el o los emulsionantes y/o los ésteres de esteroles/estanol y/o los ésteres de carbohidrato y/o los ésteres de proteína y/o los mono- o diglicéridos se producen independientemente del alimento y se añaden como productos formados al alimento durante la preparación del mismo. En otras palabras, "*in situ*" tal como se utiliza en la presente memoria significa que mediante la adición de la enzima lipasa aciltransferasa según la presente invención a un alimento, o a los ingredientes o materiales del alimento que constituyen el alimento, un emulsionante y/o un éster de esteroles y/o un éster de estanol y/o un éster de carbohidrato y/o un éster de proteína y/o un mono- o diglicérido puede producirse a partir de los compuestos del alimento. Apropiadamente, los componentes del alimento puede(n) ser el/los sustrato(s) para la enzima. Si es necesario, los componentes del alimento pueden enriquecerse por adición de uno o más componentes adicionales cuyos componentes adicionales pueden ser los mismos que los presentes en el alimento o pueden ser adicionales a estos componentes ya presentes en el alimento. Para evitar dudas, en una forma de realización el procedimiento según la presente invención puede ser un procedimiento para la producción de un emulsionante y/o de un éster de esteroles y/o de un éster de estanol y/o un éster de carbohidrato y/o un éster de proteína y/o un mono- o diglicérido *in situ* en un alimento y no es un procedimiento para preparar un emulsionante y/o de un éster de esteroles y/o de un éster de estanol (por ejemplo es una forma aislada y/o purificada) para la adición posterior a un alimento.

En otra forma de realización la lipasa acil-transferasa puede utilizarse durante el tratamiento del alimento, pero no queda en el alimento. Por ejemplo, la lipasa aciltransferasa puede inmovilizarse, permitiendo que se reutilice.

Preferentemente, la lipasa aciltransferasa según la presente invención puede transferir un grupo acilo de un lípido a un esteroles y/o estanol y/o un carbohidrato y/o una proteína y/o glicerol cuando está presente en un medio polar, preferentemente en un medio acuoso, preferentemente un alimento que contiene agua. Apropiadamente, el medio acuoso puede ser un tampón acuoso o puede ser la fase acuosa en un alimento. La expresión "medio acuoso" tal como se utiliza en la presente memoria significa preferentemente un medio que está ausente de disolvente orgánico, preferentemente ausente de disolvente orgánico polar, más preferentemente ausente de disolvente orgánico no comestible. En particular, la expresión "medio acuoso" puede referirse a un medio al que ningún disolvente orgánico exógeno, preferentemente ningún disolvente orgánico polar, se ha añadido. La expresión "disolvente orgánico" tal como se utiliza en la presente memoria no comprende aceites alimenticios, preferentemente no comprende aceites alimenticios que sean altos en lípidos apolares. En una forma de realización la expresión "disolvente orgánico" puede excluir disolventes orgánicos comestibles, tales como etanol, propilenglicol y/o glicerol. Apropiadamente, el medio acuoso según la presente invención puede comprender menos del 80% en volumen de disolventes orgánicos, menos del 70% en volumen de disolventes orgánicos, menos del 50% en volumen de disolventes orgánicos, menos del 30% en volumen de disolventes orgánicos, más preferentemente menos del 15% en volumen de disolventes orgánicos, más preferentemente menos del 5%. Apropiadamente el alimento puede comprender entre el 1 y el 5% de disolvente orgánico, por ejemplo etanol. Sin embargo, cuando el alimento comprende dicho disolvente orgánico, preferentemente es producido de forma endógena en el alimento. Es decir, cuando el alimento comprende dicho disolvente orgánico, preferentemente el disolvente orgánico no es un disolvente orgánico exógeno.

El término "alimento" tal como se utiliza en la presente memoria significa una sustancia que es adecuada para consumo humano y/o animal.

Apropiadamente, el término "alimento" tal como se utiliza en la presente memoria puede significar un alimento en una forma que está lista para el consumo. Alternativamente, o además, sin embargo, el término "alimento" tal como se utiliza en la presente memoria puede significar uno o más materiales alimenticios que se utilizan en la preparación de un alimento. A modo de ejemplo, solamente, el término "alimento" comprende tanto los artículos horneados producidos a partir de la masa como la masa utilizada en la preparación de dichos artículos horneados.

La presente invención proporciona un alimento como se ha definido anteriormente en el que el alimento es un producto de masa u horneado que comprende uno o más de entre los siguientes: panes, pasteles, productos dulces de masa, masas laminadas, mantequillas líquidas, panes dulces, roscos, galletas, galletas saladas y dulces.

Apropiadamente el alimento según la presente invención pueden ser "alimentos refinados", incluyendo pasteles, repostería y similares.

5 En un aspecto, el alimento según la presente invención es un producto de masa o un producto horneado, tal como un pan, un producto frito, un aperitivo, pasteles, tortas, bizcochos de chocolate y nueces (brownies), pastas de té, fideos, artículos de aperitivo tales como galletas saladas, galletas de harina de trigo integral (graham crackers), galletas saladas en forma de ocho (pretzels) y patatas fritas y pastas.

10 Se dan a conocer asimismo en la presente memoria un producto alimenticio procedente de plantas tales como harinas, premezclas, aceites, grasas, manteca de cacao, crema no láctea para café, aliños para ensaladas, margarina, cremas para untar, manteca de cacahuete, mantecas, helados y aceites de cocinar, y un producto lácteo, incluyendo mantequilla, leche, crema, queso tal como los quesos naturales, procesados y de imitación en varias formas (incluyendo queso desmenuzado, en bloque, lonchas o rallado), queso cremoso, helado, postres congelados, yogur, yogures líquidos, grasa de leche en polvo y otros productos lácteos. La enzima según la presente invención
15 puede mejorar la estabilidad de la grasa en los productos lácteos.

Se da a conocer asimismo un producto alimenticio que contiene ingredientes derivados de animales, tales como productos cárnicos procesados, aceites de cocina, y mantecas.

20 Se da a conocer asimismo una bebida, una fruta, una mezcla de frutas, un vegetal o vino. En algunos casos la bebida puede contener hasta 20 g/l de fitosteroles añadidos.

Se da además a conocer un pienso para animales. El pienso para animales puede estar enriquecido con fitosterol y/o fitostanoles, preferentemente con beta-sitosterol/estanol. Apropiadamente, el pienso para animales puede ser un
25 pienso para aves de corral.

El alimento según la presente invención es un alimento que contiene agua. Apropiadamente el artículo puede estar compuesto del 10 al 98% de agua, apropiadamente del 14 al 98%, apropiadamente del 18 al 98% de agua, apropiadamente del 20 al 98%, apropiadamente del 40 al 98%, apropiadamente del 50 al 98%, apropiadamente del
30 70 al 98% y apropiadamente del 75 al 98%.

Para algunos aspectos, preferentemente el alimento según la presente invención no es un aceite derivado vegetal puro, tal como por ejemplo, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de colza. Para evitar dudas, en algunos aspectos de la presente invención el alimento según la presente invención puede comprender un
35 aceite, pero preferentemente el alimento no está compuesto principalmente de aceite o mezclas de aceite. Para algunos aspectos, preferentemente el alimento comprende menos del 95% de lípidos, preferentemente menos del 90% de lípidos, preferentemente menos del 85%, preferentemente menos del 80% de lípidos. De este modo, para algunos aspectos de la presente invención el aceite puede ser un componente del alimento, pero preferentemente el alimento no es un aceite por sí mismo.

40 Cuando se da el caso que se produce un éster de carbohidrato según la presente invención el éster de carbohidrato es preferentemente un éster de oligosacárido, un éster de monosacárido o un éster de disacárido.

Apropiadamente el éster de carbohidrato cuando se produce según la presente invención puede ser uno o más de
45 los siguientes: éster de glucosa, éster de fructosa, éster de anhidrofructosa, éster de maltosa, éster de lactosa, éster de galactosa, éster de xilosa, éster de xilooligosacárido, éster de maltooligosacárido, éster de arabinosa, éster de maltooligosacárido, éster de tagatosa, éster de sacarosa, éster de microtecina, éster de ascopirona P, éster de ascopirona T o éster de cortalcerona.

50 Preferentemente, el éster de carbohidrato cuando se produce según la presente invención es uno de los siguientes: un monoéster de carbohidrato, un monoéster de azúcar, un monoéster de oligosacárido, un monoéster de trisacárido, un monoéster de disacárido, un monoéster de monosacárido, un monoéster de glucosa, un monoéster de fructosa, monoéster de anhidrofructosa, monoéster de maltosa, monoéster de lactosa, monoéster de galactosa, monoéster de xilosa, monoéster de xilooligosacárido, monoéster de arabinosa, monoéster de maltooligosacárido,
55 monoéster de maltooligosacárido, monoéster de tagatosa, monoéster de sacarosa, éster de microtecina, éster de ascopirona P, éster de ascopirona T o éster de cortalcerona.

En una forma de realización, el éster de microtecina, el éster de ascopirona P, el éster de ascopirona T y/o el éster de cortalcerona pueden funcionar como agentes antimicrobianos. Alternativamente, o además de esto el éster de
60 microtecina, el éster de ascopirona P, el éster de ascopirona T y/o el éster de cortalcerona pueden funcionar como uno o ambos antioxidantes y/o emulsionantes.

Preferentemente, la formación del éster de carbohidrato (si existe) según la presente invención es independiente de UDP-glucosa.

65

Preferentemente, el alimento según la presente invención no comprende UDP-glucosa, o solamente comprende UDP-glucosa en cantidades insignificantes.

Apropiadamente, el emulsionante según la presente invención puede ser por ejemplo uno o más de los siguientes: un diglicérido, un monoglicérido, tal como 1-monoglicérido o una lisolecitina, tal como lisofosfatidilcolina por ejemplo, un digalactosil monoglicérido (DGMG). El emulsionante se produce preferentemente a partir del donante de lípido acilo después de la eliminación de uno o más grupos acilo de dicho donante de lípido acilo. El término lisolecitina tal como se usa en la presente memoria comprende lisofosfatidilcolina, lisofosfatidiletanolamina, lisofosfatidilinositol, lisofosfatidilserina y lisofosfatidilglicerol.

Cuando uno de los emulsionantes es un éster de carbohidrato, el segundo emulsionante puede ser por ejemplo uno o más de los siguientes: un diglicérido, un monoglicérido, tal como 1-monoglicérido, lisofosfatidilcolina o digalactosil monoglicérido (DGMG). El segundo emulsionante se produce preferentemente a partir del donante de lípido acilo después de la eliminación de uno o más grupos acilo de dicho donante de acilo lípido. El término lisofosfatidilcolina tal como se utiliza en la presente memoria es sinónimo del término lisolecitina y estos términos pueden utilizarse en la presente memoria indistintamente.

Preferentemente el segundo emulsionante es el DGMG. Apropiadamente, el DGMG se produce *in situ* por eliminación de un grupo acilo procedente de DGDG con la transferencia del grupo acilo eliminado en un carbohidrato para formar un éster de carbohidrato.

Cuando uno de los emulsionantes es un éster de proteína y/o un diglicérido y/o un monoglicérido, el segundo emulsionante puede ser por ejemplo uno más de los siguientes: un diglicérido, un monoglicérido, tal como 1-monoglicérido, lisofosfatidilcolina o digalactosil monoglicérido (DGMG). El segundo emulsionante se produce preferentemente a partir del donante de lípido acilo después de la eliminación de uno o más grupos acilo de dicho donante de acilo lípido. El término lisofosfatidilcolina tal como se utiliza en la presente memoria es sinónimo del término lisolecitina y estos términos pueden utilizarse en la presente memoria indistintamente.

En una forma de realización la lípido aciltransferasa de la invención puede utilizarse en un procedimiento para la preparación de un alimento tal como un aceite para cocinar, margarina o crema para untar, mediante la cual el alimento contiene de forma natural o ha sido enriquecido con glicerol, por lo menos un fosfolípido (por ejemplo lecitina) y/o un glucolípido (por ejemplo digalactosil diglicérido), y opcionalmente un fitosterol o fitostanol.

Cuando se utiliza como aceite de cocinar o margarina el alimento puede tener propiedades anti-incrustantes mejoradas. Además o alternativamente el alimento puede tener una o más propiedades técnicas provechosas, por ejemplo estabilidad oxidativa mejorada, propiedades de emulsificación mejoradas o utilidades sanitarias.

La lípido aciltransferasa de la invención puede estar en la preparación de alimentos con poca grasa, tales como las cremas de untar con poca grasa, los aliños para ensalada con poca grasa, la mayonesa con poca grasa, etc. En dichos productos alimenticios con poca grasa, el contenido en grasa se reduce por lo general mediante la adición de emulsionantes y de agua adicional en comparación con el equivalente con más grasa.

Se ha descubierto que las lípido aciltransferasas utilizadas en las composiciones y procedimientos de la invención tienen propiedades exclusivas cuando se comparan con las enzimas lipolíticas en las que tienen una marcada preferencia para la transferencia de grupos acilos procedentes de lípidos a otros receptores aparte del agua, incluso en presencia de agua en cantidad significativa. En una comparación con las enzimas de la técnica anterior, la lípido aciltransferasa utilizada en la invención se descubrió que tiene una actividad de transferasa relativamente alta en presencia de 6% de agua, 54% de agua, 73% de agua, 89% de agua y aproximadamente 95% de agua. Las enzimas lipolíticas probadas no tenían prácticamente ninguna actividad significativa afín a la transferasa a estas concentraciones de agua.

La actividad de lipasa y aciltransferasa de una enzima pueden evaluarse utilizando los siguientes ensayos: De esta manera una lípido aciltransferasa que presenta las características enzimáticas definidas en la presente memoria puede obtenerse e identificarse.

Ensayo de transferasa en sustrato tamponado (véase el Ejemplo 12)

Las enzimas, que funcionan como lípido aciltransferasas para su utilización en las composiciones y procedimientos de la invención pueden identificarse de manera rutinaria utilizando el análisis dado a conocer en la presente memoria en el Ejemplo 12. Este ensayo se denominará en lo sucesivo en la presente memoria como "Ensayo de transferasa en sustrato tamponado". En el Ejemplo 12 la enzima lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* según la presente invención se analizó y comparó con una gama de enzimas lipolíticas no comprendidas por la presente invención. Como puede apreciarse, se descubrió que de las enzimas lipolíticas solamente LIOPAN® F (Novozymes, Dinamarca) presenta alguna actividad de transferasa y a continuación solamente una concentración muy baja (1,3%).

Las enzimas adecuadas para su utilización en las composiciones y procedimientos de la invención pueden identificarse de manera rutinaria utilizando el ensayo de la transferasa en sustrato tamponado. Utilizando este ensayo, en el que hay un contenido en agua muy alto, aproximadamente 95%, las lípido aciltransferasas según la presente invención son las que tienen por lo menos 2% de actividad de aciltransferasa (actividad relativa de transferasa), preferentemente por lo menos 5% de actividad relativa de transferasa, preferentemente por lo menos 10% de actividad relativa de transferasa, por lo menos 15%, 20%, 25%, 26%, 28%, 30%, 40%, 50%, 60% ó 75% de actividad relativa de transferasa. Apropiadamente, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede tener menos del 28%, menos del 30%, preferentemente menos del 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% ó 100% de actividad de aciltransferasa.

Ensayo de transferasa en yema de huevo con alto contenido en agua (véase el Ejemplo 11)

Como alternativa a (o además de) utilizar el "Ensayo de transferasa en sustrato tamponado" (véase anteriormente), una lípido aciltransferasa para su utilización según la presente invención puede identificarse utilizando el "Ensayo con transferasa en yema de huevo con alto contenido en agua " dada a conocer en el Ejemplo 11.

En una forma de realización, la lípido aciltransferasa adecuada para su utilización en los procedimientos y/o las composiciones según la presente invención es la que cuando se prueba utilizando el ensayo de transferasa en yema de huevo rica en agua en una yema de huevo con 54% de agua, tiene hasta el 100% de actividad de transferasa relativa. De hecho, los experimentos en yema de huevo con alto contenido en agua ha demostrado que al comienzo del experimento se calculó que la cantidad inicial de transferasa era del 100% de actividad de transferasa, es decir no se observó actividad hidrolítica. En cambio, las enzimas lipolíticas utilizadas como referencia, es decir LIPOPAN® F y fosfolipasa A2 presentaron actividad de transferasa no detectable en la yema de huevo con 54% de agua, o la yema de huevo con contenido enriquecido en agua (es decir yema de huevo con 73% de agua o 89% de agua). Preferentemente el aumento en el contenido de agua no disminuye significativamente el porcentaje de actividad de aciltransferasa de una lípido aciltransferasa para su utilización en los procedimientos o composiciones según la presente invención.

En una forma de realización preferida, haciendo referencia al ensayo con transferasa en yema de huevo rica en agua, con un contenido en agua del 54%, una lípido aciltransferasa para su utilización en la presente invención tendrá un porcentaje inicial de actividad de aciltransferasa (actividad inicial de transferasa relativa) medida después del 10% del consumo de la molécula del donante (es decir fosfolípidos) de por lo menos 0,1% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 1% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 5% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 10% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 20% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 30% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 40% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 50% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 60%, preferentemente por lo menos 70%, preferentemente por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 90%, preferentemente por lo menos 95%, preferentemente por lo menos 99%, preferentemente aproximadamente 100% de actividad de transferasa relativa.

En una forma de realización preferida, haciendo referencia al ensayo con transferasa en yema de huevo rica en agua, con un contenido en agua del 54%, y medido después del 10% de consumo de la molécula donante (es decir fosfolípido), la lípido aciltransferasa para su utilización en las composiciones y procedimientos de la invención tiene actividad de transferasa detectable, es decir actividad de transferasa relativa entre 0,1% y 100%, preferentemente por lo menos 1% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 5% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 10% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 20% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 30% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 40% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 45%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de actividad de transferasa relativa. Apropiadamente, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede tener, cuando se utiliza el ensayo con transferasa en yema de huevo rica en agua, con un contenido en agua del 54%, y medido después del 10% de consumo de la molécula donante (es decir fosfolípido), un porcentaje de actividad de aciltransferasa (actividad de transferasa relativa) inferior al 45%, 47%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.

En una forma de realización preferida, haciendo referencia al ensayo con transferasa en yema de huevo rica en agua, con un contenido en agua del 73%, y medido después del 10% de consumo de molécula donante (es decir fosfolípido), la lípido aciltransferasa para su utilización en las composiciones y procedimientos de la invención tiene actividad de transferasa detectable, es decir actividad de transferasa relativa entre 0,1% y 100%, preferentemente por lo menos 1% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 5% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 10% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 20% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 30% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 40% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 45%, 50%, 58%, 60%, 70%, 80% o 90% de actividad de transferasa relativa. Apropiadamente, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede tener, cuando se utiliza el ensayo con transferasa en yema de huevo rica en agua, con un contenido en agua del 73%, y medido después del 10% de consumo de la molécula donante (es decir fosfolípido),

un porcentaje de actividad de aciltransferasa (actividad de transferasa relativa) inferior al 45%, 47%, 50%, 58%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.

En una forma de realización preferida, haciendo referencia al ensayo con transferasa en yema de huevo rica en agua, con un contenido en agua del 89%, y medido después del 10% de consumo de la molécula donante (es decir fosfolípido), la lípido aciltransferasa para su utilización en las composiciones y procedimientos de la invención tiene actividad de transferasa detectable, es decir actividad de transferasa relativa entre 0,1% y 100%, preferentemente por lo menos 1% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 5% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 10% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 20% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 30% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 40% de actividad de transferasa relativa, preferentemente por lo menos 45%, 50%, 60%, 70%, 80% o 90% de actividad de transferasa relativa. Apropiadamente, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede tener, cuando se utiliza el ensayo con transferasa en yema de huevo rica en agua, con un contenido en agua del 89%, y medida después del 10% de consumo de la molécula donante (es decir fosfolípido), un porcentaje de actividad de aciltransferasa (actividad de transferasa relativa) inferior al 45%, 47%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100%.

En una forma de realización preferida, haciendo referencia al ensayo con transferasa en yema de huevo rica en agua, una lípido aciltransferasa para su utilización en las composiciones y procedimientos de la invención tiene actividad de transferasa relativa significativa (es decir por lo menos del 0,1% en ambos contenidos de agua) y tiene una actividad de transferasa relativa significativa en yema de huevo con un contenido en agua del 54% como en una yema de huevo con un contenido en agua del 73%, cuando se mide después del 10% de consumo de la molécula donante (es decir, fosfolípido).

En una forma de realización preferida, haciendo referencia al ensayo con transferasa en yema de huevo rica en agua, una lípido aciltransferasa para su utilización en las composiciones y procedimientos de la invención tiene actividad de transferasa relativa significativa (es decir por lo menos del 0,1% en ambos contenidos de agua) y tiene una actividad de transferasa relativa significativa en yema de huevo con un contenido en agua del 54% como en una yema de huevo con un contenido en agua del 89%, cuando se mide después del 10% de consumo de la molécula donante (es decir, fosfolípido).

En una forma de realización preferida, haciendo referencia al ensayo con transferasa en yema de huevo rica en agua, una lípido aciltransferasa para su utilización en las composiciones y procedimientos de la invención tiene actividad de transferasa relativa significativa (es decir por lo menos del 0,1% en ambos contenidos de agua) y tiene una actividad de transferasa relativa significativa en yema de huevo con un contenido en agua del 73% como en una yema de huevo con un contenido en agua del 89%, cuando se mide después del 10% de consumo de la molécula donante (es decir, fosfolípido).

La expresión "actividad equivalente relativa de transferasa" como se denomina en la presente memoria, significa que la enzima tiene una actividad relativa de transferasa (% de actividad de aciltransferasa) que es por lo menos 2% inferior, preferentemente por lo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90% inferior, en la yema de huevo con el contenido en agua mayor en comparación con el de la yema de huevo con el contenido menor de agua.

Ensayo de transferasa en un medio con bajo contenido en agua

Además de utilizar el "Ensayo de transferasa en sustrato tamponado" y como una alternativa a (o además de) utilizar el "Ensayo de transferasa en yema de huevo con alto contenido en agua", la lípido aciltransferasa para su utilización según la presente invención puede identificarse utilizando el "Ensayo de transferasa en medio con poco contenido en agua".

Para determinar si una enzima es una lípido aciltransferasa según la presente invención, se puede realizar un "Ensayo de transferasa en un medio con bajo contenido en agua", es decir en un medio aceitoso con 6% de agua como se da a conocer en el Ejemplo 22. Este ejemplo ilustra que en un medio aceitoso con un contenido en agua del 6% la lípido aciltransferasa de la invención tiene una actividad de transferasa muy relativa, en la que las enzimas lipolíticas de la técnica anterior presentan actividad hidrolítica.

En una forma de realización, la lípido aciltransferasa adecuada para su utilización en los procedimientos y/o las composiciones según la presente invención es la que cuando se analiza utilizando el "Ensayo de transferasa en un medio con bajo contenido en agua" medida después de un periodo seleccionado de entre 30, 20 ó 120 minutos, tiene una actividad relativa de transferasa de por lo menos 1%, preferentemente por lo menos 2%, preferentemente por lo menos 5%, preferentemente por lo menos 10%, preferentemente por lo menos 20%, preferentemente por lo menos 30%, preferentemente por lo menos 40%, preferentemente por lo menos 50%, preferentemente por lo menos 60%, preferentemente por lo menos 70% y preferentemente por lo menos 75%. Apropiadamente, la lípido aciltransferasa según la presente invención, puede tener menos del 30%, 40%, 50%, 60%, 70% u 80% de actividad

cuando se mide después de un periodo de 10, 20, 30 ó 120 minutos, utilizando el "Ensayo de transferasa en un medio con con bajo contenido en agua".

5 Como se describió anteriormente, la lipasa aciltransferasa de la invención, puede identificarse utilizando ya sea "Ensayo de transferasa en sustrato tamponado" o en el "Ensayo con transferasa en un medio con bajo contenido en agua" utilizando colesterol como receptor de acilo. Desde luego, el experto se enterará fácilmente de que, con correcciones obvias a los métodos analíticos, puede utilizarse el "Ensayo con transferasa en sustrato tamponado" o el "Ensayo con transferasa en medio con bajo contenido en agua" para determinar la actividad de lípido aciltransferasa para cualquier donante de acilo o cualquier combinación de receptor de acilo. El experto sustituiría simplemente, si es necesario, el sustrato donante de acilo (por ejemplo, fosfolípido) por un sustrato donante de acilo alternativo (por ejemplo, glucolípido, triacilglicéridos) y/o reemplazaría el receptor de acilo (por ejemplo colesterol) por un sustrato receptor de acilo alternativo (por ejemplo, un carbohidrato, una proteína, otro esterol, un estanol o glicerol).

15 La expresión "con alto contenido en agua " tal como se utiliza en la presente memoria significa cualquier sustrato o alimento con más del 2% de contenido en agua, preferentemente más del 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% ó 90%.

20 La expresión "con bajo contenido en agua" tal como se utiliza significa cualquier sustrato o alimento con menos del 6% de contenido en agua, preferentemente menos del 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ó 0,5%.

25 Preferentemente el procedimiento y/o la utilización según la presente invención puede realizarse, por ejemplo, en un alimento a una temperatura entre 15 y 60°C, preferentemente a una temperatura entre 20 y 60°C, preferentemente entre 20 y 50°C, preferentemente entre 20 y 45°C, preferentemente entre 20 y 40°C. Para algunos aspectos, por ejemplo en la masa, preferentemente la temperatura del alimento durante el que tiene lugar la reacción de aciltransferasa está comprendida entre 20 y 40°C. Para otros aspectos, por ejemplo, con respecto a los productos lácteos, tales como el queso, la temperatura del alimento puede estar comprendida apropiadamente entre 30°C y 60°C. En otros aspectos todavía, por ejemplo con respecto a la mayonesa, la temperatura del alimento puede estar comprendida apropiadamente entre 20 y 40°C, más preferentemente entre 25 y 30°C.

30 Preferentemente, el emulsionante producido según la presente invención comprende menos del 5% en peso del alimento.

35 Preferentemente, el emulsionante producido según la presente invención comprende del 0,01% al 4% en peso del alimento.

Preferentemente, el emulsionante producido según la presente invención comprende del 0,01% al 2% en peso del alimento.

40 Preferentemente, el emulsionante producido según la presente invención comprende del 0,01% al 1% en peso del alimento.

Preferentemente, el emulsionante producido según la presente invención comprende del 0,01% al 0,5% en peso del alimento.

45 Preferentemente, el emulsionante producido según la presente invención comprende de 0,01 a 0,3% en peso del producto alimenticio.

50 Apropiadamente, el procedimiento según la presente invención incluye inactivar o desnaturalizar la enzima para proporcionar un alimento que comprende la enzima y una forma inactiva o desnaturalizada. Apropiadamente la enzima puede desnaturalizarse por cocción o por pasteurización.

55 La presente invención puede comprender además la utilización de una lípido aciltransferasa tal como se define en la presente memoria en composiciones enzimáticas para alimentos y/o piensos, y puede comprender composiciones enzimáticas para alimentos y/o piensos que comprenden una lípido aciltransferasa tal como se define en la presente memoria. Dichas composiciones pueden contener una o más enzimas adicionales, tales como las listadas en la presente memoria. Alternativamente, la composición enzimática de la invención puede utilizarse combinada con otros ingredientes y aditivos alimenticios tales como los listados en la presente memoria, incluyendo otras composiciones enzimáticas. Por la formulación de la lípido aciltransferasa de la invención en una composición para alimentos y/o piensos, la enzima puede estabilizarse para permitir el almacenamiento prolongado en condiciones adecuadas (en condiciones adecuadas) antes de su utilización en la producción de alimentos y/o piensos. Además, la composición enzimática de la presente invención proporciona la enzima en una forma adecuada para su utilización segura durante la aplicación *in situ* en la preparación de alimentos y/o piensos o ingredientes para su utilización en la preparación de alimentos y/o piensos. Dichas composiciones pueden estar en forma líquida, semilíquida o sólido/granular.

En una forma de realización la composición enzimática del alimento puede apropiadamente ser una composición mejoradora de la masa. La composición mejoradora de la masa puede comprender otros componentes útiles tales como un emulsionante y/o otras enzimas como las listadas en la presente memoria.

Las enzimas para alimentos están comercializadas como concentrados líquidos estabilizados o como sólidos en partículas. La formulación en la composición enzimática del alimento minimiza las pérdidas en actividad enzimática durante el transporte, almacenamiento y utilización. Las enzimas con frecuencia están expuestas a medios húmedos, cálidos u oxidantes en el tratamiento de los alimentos y las bebidas. Las formulaciones mejoran la estabilidad contrarrestando las fuerzas primarias de desactivación: desnaturalización, desactivación catalítica en el sitio y proteólisis. La desnaturalización sucede por desplegamiento físico de una estructura proteica terciaria de la enzima bajo tensión térmica o química. Una vez una enzima comienza a desplegarse resulta drásticamente más vulnerable a la desactivación y a la proteólisis. Para minimizar el desplegamiento, el formulador puede alterar el medio de la proteína a fin de producir una estructura proteica compacta; esto se hace más eficazmente por "exclusión preferencial" del agua desde la superficie de la proteína añadiendo compuestos que se asocian al agua tales como azúcares, alcoholes polihídricos y sales liotrópicas. Las mejores maneras de combatir la inactivación activa en el sitio son para asegurar concentraciones suficientes de algunos cofactores requeridos, para añadir inhibidores reversibles y para excluir especies oxidantes o reactivas en la formulación.

Además de la estabilidad enzimática, una formulación reuniría varios requisitos secundarios clave incluyendo la preservación contra la contaminación microbiana, el impedimento de la precipitación física o de la formación de niebla, minimizando la formación de polvos o aerosoles sensibilizantes, y la optimización de criterios estéticos tales como el color y el olor. Muchos de estos problemas están mejor estudiados enfocando "corriente arriba" tan lejos como sea posible, incluyendo la selección de las materias primas en la fermentación o el proceso de recuperación de enzimas. Las operaciones corriente abajo tales como diafiltración, adsorción, cromatografía, cristalización y extracción pueden utilizarse para eliminar impurezas responsables de color, olor y precipitación. El riesgo de precipitación física se minimiza formulando cerca del punto isoeléctrico de la enzima con disolventes hidrófilos tales como glicerol o propilenglicol. Se puede añadir también de manera eficaz concentraciones moderadas de sales de solvatación para evitar el desalado o "el salado inverso". Para prevenir la contaminación microbiana, se puede utilizar una combinación de filtración, acidificación y la minimización del agua libre; los biocidas pueden ser eficaces, pero el intervalo de productos químicos aceptables para controlar o destruir los microbios está cada vez más circunscrito por las reglamentaciones de sanidad y seguridad.

Dos procedimientos que producen los gránulos más resistentes a la erosión hasta la fecha son la granulación por alto cizallamiento y el revestimiento por pulverización en lecho fluidizado, véase por ejemplo T. Becker: "Separation and Purification Processes for Recovery of Industrial Enzymes" en R. K. Singh, S. S. H. Rizvi (eds.): *Bioseparation Processes in Foods*, Marcel Dekker, Nueva York, págs. 427-445. Estos procedimientos utilizan varios aglutinantes, revestimientos y morfologías de partículas para producir partículas no disgregables que todavía protegen las enzimas durante el almacenamiento pero permiten su fácil liberación en solución durante su utilización.

Las composiciones enzimáticas para alimentos que contienen la lipido aciltransferasa de la invención, pueden prepararse utilizando técnicas de formulación convencionales, tales como secado por pulverización o formulación líquida.

La lipido aciltransferasa de la invención puede expresarse en cualquier hospedador de expresión adecuada. Por ejemplo la lipido aciltransferasa de la invención puede expresarse en *Bacillus subtilis* y puede purificarse por ultrafiltración y/o por precipitación en etanol y/o centrifugación, y puede liofilizarse posteriormente usando almidón (maltodextrina) como vehículo para la enzima. La enzima liofilizada puede estandarizarse para la actividad PLU específica añadiendo además vehículo en forma de polvo. Las técnicas implicadas están bien demostradas y son rutinarias en la técnica.

Alternativamente, la lipido aciltransferasa para su utilización según la presente invención, por ejemplo la lipido aciltransferasa producida de manera heterogénea de la invención, una vez purificada puede estabilizarse en una formulación líquida adecuada tal como la basada en un glicerol. Otros procedimientos de preparación de formulaciones enzimáticas estabilizadas están descritos en las patentes EP 0 770 037 y EP 0 702 712.

La aciltransferasa en forma de polvo puede utilizarse también combinada con otras enzimas tales como las listadas en la presente memoria, para la producción de composiciones enzimáticas con actividad definida según la especificación del producto.

Por lo general la dosificación de la formulación enzimática para el alimento está comprendida entre 10 g y 1.000 g por cada 1000 kg de producto alimenticio, preferentemente entre 50 y 200 g por 1000 kg de producto alimenticio, preferentemente entre 75 y 125 g por 1000 kg de producto alimenticio.

Preferentemente la enzima según la presente invención está presente en una forma inactiva o en una forma desnaturalizada en el alimento.

En una forma de realización, la enzima según la presente invención está preferentemente no inmovilizada, en particular no está inmovilizada en un soporte sólido.

En una forma de realización alternativa, puede inmovilizarse la enzima.

La lípido aciltransferasa inmovilizada puede prepararse utilizando técnicas de inmovilización conocidas en la materia. Existen numerosos procedimientos de preparación de enzimas inmovilizadas que son evidentes para un experto en la materia (por ejemplo las técnicas mencionadas en la patente EP 0 746 608; o Balcao VM, Paiva A.L., Malcata F.X., *Enzyme Microb. Technol.* mayo de 1996, 1; 18(6): 392-416; o Reetz M.T., Jaeger KE. *Chem. Phys. Lipids.* junio de 1998, 93(1-2): 3-14; o Bornscheuer U.T., Bessler C., Srinivas R., Krishna S.H., *Trends Biotechnol.*, Oct. de 2002; 20(10): 433-7.

En una forma de realización, el alimento de la invención puede contener ingredientes alimenticios, que han sido preparados utilizando lípido aciltransferasa inmovilizada, pero no contienen la lípido aciltransferasa en el ingrediente alimenticio o en el alimento. Por ejemplo, el alimento puede contener uno o más de los siguientes componentes: un emulsionante, más de un emulsionante, uno o más agentes aromatizantes, uno o más mejoradores de textura y/o uno o más ésteres de esteroles tales como los ésteres de fitosterol o los ésteres de fitostanol.

La enzima según la presente invención puede utilizarse con uno o más emulsionantes convencionales, incluyendo por ejemplo monoglicéridos, ésteres de ácido diacetiltartárico, de mono y diglicéridos de ácidos grasos, y lecitinas por ejemplo, obtenidas de la soja.

La enzima según la presente invención puede utilizarse con una u otras enzimas más de calidad alimenticia adecuadas. Por lo tanto está dentro del alcance de la presente invención que, además de la enzima de la invención, por lo menos una enzima más se añade al alimento. Dichas enzimas adicionales incluyen enzimas degradadoras del almidón tales como las endo- o exoamilasas, pululanases, enzimas desramificadoras, hemicelulasas incluyendo las xilanasas, celulasas, lipasas, fosfolipasas y proteasas.

La enzima según la presente invención puede utilizarse con una enzima u otras más de calidad alimenticia adecuada. Por tanto, está comprendido dentro del alcance de la presente invención que además de la enzima de la invención, por lo menos una enzima más se añade al alimento. Dichas enzimas adicionales incluyen enzimas degradadoras del almidón tales como las endo- o exoamilasas, pululanases, enzimas desramificadoras, hemicelulasas incluyendo xilanasas, celulasas, oxido-reductasas por ejemplo, glucosa oxidasa, piranosa oxidasa, sulfhidril oxidasa o una carbohidrato oxidasa, tal como la que oxida la maltosa, por ejemplo hexosa oxidasa (HOX), lipasas, fosfolipasas y hexosa oxidasa y proteasas.

En una forma de realización preferida la lípido aciltransferasa se utiliza junto con una lipasa que tiene una o más de las siguientes actividades de la lipasa: actividad de glucolipasa (E.C.3.1.1.26), actividad de triacilglicerol lipasa (E.C.3.1.1.3), actividad de fosfolipasa A2 (E.C.3.1.1.4), actividad de fosfolipasa A1 (E.C.3.1.1.32). Apropiadamente, las enzimas lipasa son muy conocidas en la materia e incluyen a modo de ejemplo las lipasas siguientes: LIPOPAN® F y/o LECITASE® ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca), Fosfolipasa A2 (por ejemplo, fosfolipasa A2 de LIPOMOD™ 22L de Biocatalysts, LIPOMAX™ de Genecor), LIPOLASE® (Novozymes A/S, Dinamarca), las lipasas dadas a conocer en los documentos WO 03/97835, EP 0 977 869 o EP 1 193 314. Esta combinación de una lípido aciltransferasa tal como se define en la presente memoria y una lipasa puede ser particularmente preferida en productos de masa u horneados o en los alimentos tales como pasteles y repostería.

La utilización de lipasas combinadas con la enzima de la invención puede ser particularmente ventajosa en los casos en los que puede desearse alguna acumulación de ácidos grasos libres, por ejemplo en los quesos en los que los ácidos grasos libres pueden comunicar un sabor deseable, o en la preparación de alimentos finos. El experto en la materia podrá combinar proporciones de enzimas lipolíticas, por ejemplo LIPOPAN® F y/o LECITASE® ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca), fosfolipasa A2 (por ejemplo, fosfolipasa A2 de LIPOMOD™ 22L de Biocatalysts, LIPOMAX™ de Genecor), LIPOLASE® (Novozymes A/S, Dinamarca), las lipasas dadas a conocer en los documentos WO 03/97835, EP 0 977 869 o EP 1 193 314 y la lípido aciltransferasa de la presente invención para proporcionar la relación deseada de actividad hidrolítica a la transferasa lo que produce un efecto técnico preferido o la combinación de efector técnicos en el alimento (tales como los listados en la presente memoria en "Efectos Técnicos".

Tradicionalmente la industria pastelera utiliza mejoras en los pasteles para la producción de pasteles y para asegurar pasteles de alta calidad desde el punto de vista de sabor, estructura, calidad comestible y aspecto. Estos mejoradores de pasteles se basan normalmente en emulsionantes liofilizados en un vehículo como almidón y maltodextrina. Algunos mejoradores de pasteles están también en forma de gel a base de emulsionantes, azúcares y agua. Estos mejoradores de pasteles son muy importantes en la industria pastelera para producir pasteles de alta calidad. Los mejoradores de pasteles sin embargo contienen emulsionantes y otros ingredientes "no naturales" con un número E. A causa de la demanda de los consumidores para reducir las cantidades de números E, la industria pastelera ha pedido de maneras alternativas producir pasteles de alta calidad sin utilizar emulsionantes.

Una manera alternativa de producir pasteles es utilizar una enzima, es decir la lípido aciltransferasa definida en la presente memoria o una composición enzimática según la presente invención.

La lípido aciltransferasa tal como se define en la presente memoria y/o la composición de la enzima del alimento de la presente invención puede utilizarse en la preparación de un alimento refinado, tal como un pastel. En tales casos, los constituyentes siguientes pueden formarse en el alimento refinado:

i) ésteres de azúcar y lisolecitina (del carbohidrato y de la receta del pastel y la lecitina en el huevo que forma también parte de la receta del pastel); y/o

ii) péptidos acilados y lisolecitina (transformando un ácido graso de la lecitina en una proteína o péptido durante la formación de los condensados de proteína-ácido graso, que se conocen por ser emulsionantes muy eficaces (Herstellung und Anwendungsmöglichkeiten von Eiweiss-Fettsäurekondensaten. Andreas Sander, Eberhard Eilers, Andrea Heilemann, Edhit von Kreis. Fett/lipid 99 (1997) n° 4, 115-120).

Se considera en la producción de algunos alimentos refinados, particularmente los alimentos refinados con mucha grasa, tales como pasteles, puede ser deseable tener alguna acumulación de ácidos grasos. Por consiguiente la combinación de la utilización de enzimas lipolíticas y de la lípido aciltransferasa tal como se define en la presente memoria puede ser particularmente provechosa para la producción de alimentos muy refinados. Alternativamente, los ácidos grasos libres adicionales o el jabón de ácido graso (E470a) pueden seleccionarse y utilizarse combinados con la lípido aciltransferasa.

El alimento según la presente invención puede comprender apropiadamente uno o más de los aditivos siguientes:

Material de proteína de soja; carotenoides, flavonoides, antioxidantes y fitoquímicos (especialmente antocianonida, carotenoide, bioflavinoide, glutatión, catequina, isoflavona, licopeno, ginsenosido, picnogenol, alcaloides, fitosterol de pygeum, sulforazona, resveretol, extracto de semillas de uva o alimento que contiene ésteres de estanol), vitaminas (especialmente la vitamina C, la vitamina A, vitamina B3, vitamina D, vitamina E, tiamina, riboflavina, niacina, piridoxina, cianocobalamina, ácido fólico, biotina, ácido pantoténico o vitamina K), minerales (especialmente calcio, yodo, magnesio, zinc, hierro, selenio, manganeso, cromo, cobre, cobalto, molibdeno o fósforo), ácidos grasos (especialmente ácido gamma-linoleico, ácido eicosapentanoico o ácido decosahecanoico), aceites (especialmente aceite de borraja, aceite de canola rico en carotenoides o aceite de linaza), aminoácidos (especialmente triptófano, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, valina, leucina, isoleucina, alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, cistina, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, prolina, hidroxiprolina, serina, taurina o tirosina), enzimas (especialmente bromelaina, papaína, amilasa, celulasa o coenzima Q), lignina, éster de estanol o bacterias adecuadas (especialmente *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus bifidus*, *Lactobacillus plantarum* o *Streptococcus faecium*), ácido fólico y fibra soluble.

Efecto técnico

Sorprendentemente las lípido aciltransferasas tienen actividad significativa de aciltransferasa en los alimentos. Esta actividad tiene sorprendentes aplicaciones provechosas en procedimientos de preparación de alimentos.

La presente invención está implicada en el sorprendente descubrimiento de que las lípido aciltransferasas según la presente invención pueden realizar la esterificación de carbohidratos por alcoholisis, es decir la transferencia de acilo de un lípido, en un alimento con un contenido en agua significativo. La técnica anterior sugiere que dichas enzimas si funcionasen completamente de esta manera funcionarían solamente en un medio disolvente (es decir en medios con poco o ningún contenido de agua).

La presente invención puede suministrar uno o más de los efectos técnicos inesperados siguientes en productos con huevo, particularmente la mayonesa: una estabilidad térmica mejorada durante la pasteurización; propiedades organolépticas mejoradas, una consistencia mejorada.

La presente invención puede proporcionar uno o más de los siguientes efectos técnicos inesperados en la masa y/o en los productos horneados: un volumen específico mejorado de la masa o de los productos horneados (por ejemplo del pan y/o del pastel); una estabilidad mejorada de la masa; una puntuación mejorada de la corteza (por ejemplo una corteza de pan más fina y/o más crujiente), una puntuación de la miga mejorada (por ejemplo una distribución de la miga más homogénea y/o una estructura más fina de la miga y/o una miga más blanda); un aspecto mejorado (por ejemplo una superficie lisa sin ampollas u orificios o sustancialmente sin ampollas u orificios); un endurecimiento reducido, un aumento de la blandura; un olor mejorado; un sabor mejorado.

La presente invención puede proporcionar un efecto provechoso en la formación de materiales muy activos en superficie en un alimento sin formación de cantidad sustancial de ácidos grasos libres, que reducen la capacidad del alimento de oxidar durante el almacenaje porque los ácidos grasos libres son más propensos a la oxidación que los correspondientes ésteres de ácido graso.

Apropiadamente, la presente invención puede proporcionar uno o más de los siguientes efectos técnicos inesperados en un alimento: un aspecto mejorado, una sensación en la boca mejorada, una estabilidad mejorada, en particular una estabilidad térmica mejorada, un sabor mejorado, una blandura mejorada, una resiliencia mejorada y una emulsificación mejorada.

5 Apropiadamente, la presente invención puede proporcionar uno o más de los siguientes efectos técnicos inesperados en productos lácteos, tales como helados por ejemplo: una sensación en la boca mejorada (preferentemente una sensación en la boca más cremosa; un sabor mejorado; una fusión del núcleo mejorada.

10 Apropiadamente, la presente invención puede proporcionar uno o más de los siguientes efectos técnicos inesperados en el huevo o en los productos de huevo: estabilidad mejorada de la emulsión; estabilidad térmica de la emulsión; sabor mejorado; mal olor reducido; propiedades de espesamiento mejoradas, consistencia mejorada.

15 Los efectos técnicos específicos asociados a la utilización de una lipido aciltransferasa como la definida en la presente memoria en la preparación de un alimento se listan en la tabla siguiente:

	Alimento	Efecto
1	Pan, panes dulces y roscos	Refuerza la masa y aumenta la resistencia mecánica y aumenta la capacidad de absorción de agua. Aumenta el volumen de los productos lácteos y mantiene la blandura de la miga
2	Masa congelada	Impide la descomposición durante la refrigeración
3	Bizcocho	Mejora el volumen del pastel y la textura blanda uniforme
4	Galletas, galletas saladas y dulces	Estabiliza las emulsiones de grasa y evita la pegajosidad a la máquina. Impide el florecimiento de productos ricos en grasa
5	Masa de harina, leche y huevos y empanado	Mejora la textura de los productos fritos
6	Fideos	Impide que la masa se pegue a la máquina. Aumenta el contenido en agua y disminuye la falta de cocción
7	Fideos instantáneos	Impide que se formen filamentos que se adhieren unos a otros
8	Pastas	Acondicionador de la masa impide la adherencia durante la cocción
9	Natillas	Hace la pasta de almidón con una textura lisa y cremosa e impide la deshidratación
10	Decolorante de café	Impide la separación del aceite y agua
11	Crema batida	Proporciona emulsión estable
12	Chocolate	Impide o reduce el florecimiento
13	Caramelo, confites y turrones	Mejora la emulsificación del azúcar molido y del aceite. Impide la separación del aceite
14	Carne procesada y salchichas	Mejora la capacidad de soporte del agua de las salchichas y de la mermelada prensada e impide la separación de la fase aceite de pastas y paté

20 Apropiadamente, la presente invención puede proporcionar uno o más de los siguientes efectos técnicos en el queso: una disminución del efecto de pérdida de aceite en el queso; un aumento del rendimiento en queso; una mejora de sabor; un mal olor reducido; un sabor "a jabón" reducido.

25 En la producción de alimentos, en particular en la producción de queso, la utilización de la lipido aciltransferasa según la presente invención proporciona una ventaja significativa en la capacidad de recuperar proteínas solubles en productos lácteos. Por ejemplo, en la producción de queso casi el 20% de toda la proteína de la leche se elimina en el suero (es decir, la parte acuosa de la leche que queda después de la formación de grumos). El suero comprende las proteínas solubles de la leche, mientras que las proteínas hidrófobas se mantienen en la cuajada. Mediante la utilización de la lipido aciltransferasa según la presente invención es posible transferir un grupo acilo desde un lipido (preferentemente desde un glucolípido o un fosfolípido) a una proteína (en particular a una proteína del suero tal como la lactoglobulina) para formar una proteína en el condensado de ácido graso. Por tanto, produciendo un

30 producto que es más hidrófobo y que permanece en la cuajada en lugar de eluirse en el suero. De esta manera, más proteína de la leche puede mantenerse en el producto alimenticio final, es decir, el producto lácteo final tal como el queso.

35 En un aspecto, la presente invención se basa en parte en la realización de que los rendimientos de alimentos (tal como en quesos) puede mejorarse mediante la utilización de una lipido aciltransferasa. Además o alternativamente, puede mejorarse el sabor, la textura, la estabilidad oxidante y/o la estabilidad al almacenaje del alimento. Además o alternativamente, el alimento puede tener una concentración reducida en colesterol o un contenido mejorado de ésteres de fitoesterol/estanol.

Sin querer estar ligado a una teoría determinada se considera que el aumento en el rendimiento puede ser el resultado de la transesterificación de los productos del suero y los péptidos, dando como resultado un aumento significativo en la hidrofobia de las proteínas del suero y en la precipitación de las proteínas aciladas del suero en la cuajada.

En los sistemas biológicos, por ejemplo, la deposición de las proteínas unidas a la membrana y las enzimas se consigue por dos mecanismos diferentes. Las proteínas unidas a la membrana poseen numerosas extensiones de la membrana o dominios hidrófobos, o tienen alternativamente unido un ácido graso a la cadena polipeptídica. Los ácidos grasos tienen normalmente una cadena de 14 ó 16 átomos de carbono de longitud. Los ácidos grasos están unidos por enlace covalente a la cadena polipeptídica en 3 posiciones diferentes, el aminoácido N-terminal como enlace amida, un resto de cisteína como enlace tioéster o un aminoácido serina o treonina como enlace éster. Únicamente un ácido graso por molécula polipeptídica es necesario para incorporar la proteína a la membrana celular.

Cuando un ácido graso está unido por enlace covalente a una proteína no membranaria, las propiedades física y funcionales cambiarán drásticamente. El documento WO 97/14713 describe las proteínas transformadas de la soja y del gluten en derivados de acilo por tratamiento con una lipasa de *Mucor miehei* (LipozymeTM, Novozymes) y un ácido graso en disolvente orgánico. La lipasa aciltransferasa según la presente invención puede utilizarse en la producción de proteínas aciladas en un medio con poca o alto contenido en agua.

Se observa que las proteínas aciladas forman complejos anfífilos que pueden utilizarse para numerosos productos cosméticos. La proteína acilada puede formar geles, unirse al agua reteniendo la humedad, tiene propiedades emulsionantes y son muy activas en la interfase entre el agua y el lípido.

Por tanto, la presente invención puede proporcionar en un aspecto una composición cosmética que comprende una lipasa aciltransferasa tal como se define en la presente memoria.

Además, la presente invención puede proporcionar la utilización de una aciltransferasa tal como se define en la presente memoria para producir una composición cosmética.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de producción *in situ* de un éster de proteína en una composición cosmética, en la que el procedimiento comprende la etapa de adición a la composición cosmética (o a los componentes de la misma) una lipasa aciltransferasa como se define en la presente memoria.

Muchas proteínas alimenticias son solubles en soluciones acuosas y por consiguiente son adecuadas para la modificación *in situ* por la lipasa aciltransferasa. En la producción de queso, la β -lactoglobulina se pierde en la fracción de suero. Después de la acilación con una lipasa aciltransferasa, o una variante de lipasa aciltransferasa, los resultados iniciales indican que β -lactoglobulina puede depositarse sin embargo en la superficie de las micelas de caseína durante la coagulación con cuajo. La β -lactoglobulina tiene tres puntos potenciales de acilación (restos de serina) en tres bucles superficiales. La leche contiene cantidades suficientes de lecitina, un sustrato adecuado para que una enzima lipasa aciltransferasa acile la β -lactoglobulina. La lecitina formada puede tener un efecto emulsionante adicional.

Las mejoras observadas con la lipasa aciltransferasa según la presente invención están en comparación cuando se utilizan enzimas lipolíticas sin actividad de aciltransferasa, tales como las triacilglicerol lipasas y fosfolipasas.

Ventajas

La regeneración de un emulsionante y de un éster de esteroles/estanol *in situ* procedente de por lo menos un constituyente del material alimenticio, significa que el material alimenticio contendrá un aditivo material menos. Esto es ventajoso debido a la mejora en la facilidad de producción. Por ejemplo, ningún tratamiento o adición adicional de ingredientes o adición de emulsionantes pueden necesitarse. Además, el alimento puede contener menos "aditivos". La reducción o eliminación de "aditivos" es deseable para los consumidores y la inclusión de aditivos con frecuencia debe declararse al consumidor en los ingredientes que se listan en el alimento. De este modo, la presente invención presenta más ventajas.

Una ventaja de la presente invención puede ser la producción *in situ* de un emulsionante en un alimento sin aumento perjudicial en el contenido en ácidos grasos libres del alimento.

La generación de dos emulsionantes y/o un éster de carbohidrato *in situ* de al menos un constituyente del material alimenticio, significa que el material alimenticio contendrá por lo menos un material aditivo menos.

Además, cuando la lipasa aciltransferasa actúa sobre un glucolípido es posible producir de manera ventajosa el emulsionante DGMG *in situ* sin un aumento perjudicial en el contenido en ácido graso del material alimenticio. De este modo, reduciendo los efectos perjudiciales atribuidos a un aumento en los ácidos grasos libres, incluyendo pero

sin limitarse a una reducción del sabor "a jabón" en electroforesis queso, la prevención de la sobredosis en la masa y propiedades de la masa cocida.

5 En algunos aspectos, una ventaja de la presente invención es la reducción en las concentraciones de colesterol libre en el alimento.

10 En otro aspecto, una ventaja de la presente invención es el aumento en los ésteres de estero/estanol en el alimento. Algunos ésteres de estero/estanol pueden ser aromatizantes y/o texturizantes eficaces. De este modo, la presente invención puede no solamente dar como resultado la producción *in situ* de un emulsionante en un alimento, sino también la producción *in situ* de un aromatizante y/o un texturizante. Algunos ésteres de estero/estanol son conocidos porque reducen el colesterol en el suero sanguíneo y/o las lipoproteínas de baja densidad cuando se consumen en un alimento. De este modo, la presente invención puede utilizarse para preparar un alimento con concentraciones aumentadas de ésteres de estero/ésteres de estanol.

15 Para algunos aspectos, particularmente cuando la enzima según la presente invención se utiliza en productos a base de huevo, una ventaja es la eliminación de carbohidratos libres no deseados.

20 Además, de manera ventajosa las propiedades de emulsificación del alimento aumentan, conduciendo a un aspecto mejorado y/o a propiedades de manipulación y/o estructura y/o consistencia y/o estabilidad térmica sin un impacto negativo sobre el sabor.

25 Además, para algunas formas de realización ventajosamente el efecto de "sobredosis" observado cuando se utilizan lipasas por sí mismas, se resuelve eficazmente mediante la adición de una enzima según la presente invención. Esto es debido al menos en parte al hecho de que los ácidos grasos libres no se producen o solamente se producen en un grado insignificante cuando se utiliza la enzima según la presente invención.

AISLADA

30 En un aspecto, preferentemente el polipéptido o la proteína para su utilización en la presente invención es una forma aislada. El término "aislada" significa que la frecuencia está al menos sustancialmente exenta de al menos otro componente con el que la secuencia está naturalmente asociada en la naturaleza y tal como se encuentra en la naturaleza.

PURIFICADA

35 En un aspecto, preferentemente el polipéptido o la proteína para su utilización en la presente invención están en forma purificada. El término "purificada" significa que la secuencia está en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente 51% puro, o al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 90% puro o al menos aproximadamente 95% puro o al menos aproximadamente 98% puro.

CLONACIÓN DE UNA SECUENCIA NUCLEOTÍDICA QUE CODIFICA UN POLIPÉPTIDO SEGÚN LA PRESENTE INVENCION

45 Una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria o un polipéptido que es adecuado para la modificación puede aislarse a partir de cualquier célula u organismo que produzca dicho polipéptido. Varios procedimientos son muy conocidos en la técnica para el aislamiento de secuencias nucleotídicas.

50 Por ejemplo, un ADN genómico y/o un banco de ADNc puede construirse utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce el polipéptido sondas de oligonucleótidos marcadas, pueden sintetizarse y utilizarse para identificar clones que codifican polipéptidos del banco genómico preparado a partir del organismo. Alternativamente, una sonda oligonucleotídica marcada que contiene secuencias homólogas a otro gen de polipéptido conocido podría utilizarse para identificar clones que codifican polipéptidos. En este último caso, se utilizan las condiciones de hibridación y de lavado de menor severidad.

60 Alternativamente, podrían identificarse clones que codifican polipéptidos insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias negativas a enzimas con el banco de ADN genómico resultante y a continuación colocando en placas las bacterias transformadas en agar-agar que contienen enzima inhibida por el polipéptido, permitiendo de este modo clones que expresan el polipéptido que va a identificarse.

65 En una alternativa adicional todavía, la secuencia nucleotídica que codifica al polipéptido puede prepararse por síntesis por procedimientos estándar demostrados, por ejemplo, el procedimiento de la fósforoamidita descrito por Beaucage S. L. *et al.*, (1981) *Tetrahedron Letters*, 22, págs. 1859-1869, o el procedimiento descrito por Matthes *et al.*, (1984), *EMBO J.* 3, págs. 801-805. En el procedimiento de fosforoamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por

ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico y sintético mixto, de origen sintético y de ADNc mixto o de origen genómico y de ADNc mixto, preparada ligando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según proceda) de acuerdo con técnicas convencionales. Cada fragmento ligado corresponde a varias partes de la secuencia nucleotídica completa. La secuencia de ADN puede prepararse también por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores específicos, por ejemplo, tal como se describe en el documento US nº 4.683.202 o en Saiki R.K. *et al.* (*Science* (1988), 239, págs. 487-491).

SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

La presente invención comprende también secuencias nucleotídicas que codifican polipéptidos que tienen las propiedades específicas definidas en la presente memoria. La expresión "secuencia nucleotídica" tal 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 la misma (tales como fragmentos de la misma). La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico, sintético o recombinante, que puede ser bicatenaria o monocatenaria si representa la cadena transcrita o complementaria.

La expresión "secuencia nucleotídica" en relación con la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN de síntesis y ARN. Preferentemente significa ADN, más preferentemente ADNc para la secuencia de codificación.

En una forma de realización preferida, la secuencia nucleotídica por sí misma que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria no comprende la secuencia nucleotídica natural en su medio natural cuando está ligada a su(s) secuencia(s) asociada(s) de forma natural que está(n) también en su medio natural. Para facilidad de referencia, los autores podrán denominar a esta forma de realización preferida la "secuencia nucleotídica no natural". A este respecto, la expresión "secuencia nucleotídica natural" significa una secuencia nucleotídica completa que está en su medio natural y cuando está operativamente ligada a un activador completo con el que está asociada de forma natural, cuyo activador está también en su medio natural. De este modo, el polipéptido de la presente invención puede ser expresado por una secuencia nucleotídica en su organismo natural pero en el que la secuencia nucleotídica no está bajo el control del activador con el que está asociada de forma natural dentro de este organismo.

Preferentemente el polipéptido no es un polipéptido natural. A este respecto, la expresión "polipéptido natural" significa un polipéptido completo que está en su medio natural y cuando ha sido expresado por su secuencia nucleotídica natural.

Por lo general la secuencia nucleotídica que codifica polipéptidos que tienen las propiedades específicas definidas en la presente memoria se prepara utilizando técnicas de ADN recombinante (es decir ADN recombinante). Sin embargo, en una forma de realización alternativa de la invención, la secuencia nucleotídica podría sintetizarse en su totalidad o en parte, utilizando procedimientos químicos bien conocidos en la materia (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).

EVOLUCIÓN MOLECULAR

Una vez se ha aislado la secuencia nucleotídica que codifica la enzima, o una supuesta la secuencia nucleotídica que codifica la enzima se ha identificado, puede ser deseable modificar la secuencia nucleotídica seleccionada, por ejemplo puede ser deseable mutar la secuencia con objeto de preparar una enzima según la presente invención.

Pueden introducirse mutaciones utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias nucleotídicas adyacentes a las zonas de mutación deseadas.

Un procedimiento adecuado se da a conocer en Morinaga *et al.* (*Biotechnology* (1984) 2, págs.646-649). Otro procedimiento de introducción de mutaciones en secuencias nucleotídicas que codifican enzimas se describe en Nelson y Long (*Analytical Biochemistry* (1989) 180, págs. 147-151).

En lugar de la mutagénesis dirigida al sitio, tal como se describió anteriormente, se pueden introducir mutaciones al azar, por ejemplo utilizando un kit comercial tal como el kit de mutagénesis por PCR GeneMorph de Stratagene, o el kit de mutagénesis al azar para PCR Diversify de Clontech. La patente EP 0 583 265 se refiere a procedimientos de optimización de mutagénesis basada en PCR, que pueden también combinarse con la utilización de análogos de ADN mutagénicos como los descritos en la patente EP 0 866 796. Las tecnologías e PCR propensas a errores son adecuadas para la producción de variantes de lípido aciltransferasas con las características preferidas. El documento WO 0206457 se refiere a la evolución molecular de las lipasas.

Un tercer procedimiento para obtener nuevas secuencias es fragmentar las secuencias nucleotídicas no idénticas, ya sea utilizando cualquier número de enzimas de restricción o una enzima tal como ADNasa I, y reagrupando las

secuencias nucleotídicas completas que codifican proteínas funcionales. Alternativamente se puede utilizar una o múltiples secuencias nucleotídicas no idénticas e introducir mutaciones durante la reunión de la secuencia nucleotídica completa. Las tecnologías de reordenamiento de ADN y reordenamiento de la familia son adecuadas para la producción de variantes de lípido aciltransferasas con características preferidas. Los procedimientos adecuados para llevar a cabo el "reordenamiento" pueden encontrarse en las patentes EP 0 752 008, EP 1 138 763 y EP 1 103 606. El reordenamiento puede combinarse también con otras formas de mutagénesis de ADN tal como se describe en los documentos US nº 6.180.406 y WO 01/34835.

Por lo tanto, es posible producir numerosas mutaciones dirigidas al sitio o al azar en una secuencia nucleotídica, bien *in vivo* o *in vitro*, y para identificar posteriormente la funcionalidad mejorada del polipéptido codificado por varios medios. Utilizando métodos de recombinación mediada por simulación informática y *exo* (véanse los documentos WO 00/58517, US nº 6.344.328, US nº 6.361.974), por ejemplo, puede llevarse a cabo la evolución molecular en la que la variante producida conserva muy poca homología con las enzimas o proteínas conocidas. Dichas variantes obtenidas de este modo pueden tener analogía estructural significativa con conocidas enzimas de transferasa, pero tienen muy poca homología con la secuencia de aminoácidos.

Como ejemplo no limitativo, además, las mutaciones o las variantes naturales de una secuencia de polinucleótidos pueden recombinarse con las variantes de tipo natural o con otras mutaciones o variantes naturales para producir nuevas variantes. Dichas nuevas variantes pueden identificarse además la funcionalidad mejorada del polipéptido codificado.

La aplicación de los procedimientos de evolución molecular mencionados anteriormente y similares permite la identificación y selección de variantes de las enzimas de la presente invención, que tienen características preferidas sin ningún conocimiento previo de la estructura o función de la proteína y permite la producción de mutaciones o variantes no predecibles pero provechosas. Existen numerosos ejemplos de la aplicación de la evolución molecular en la técnica para la optimización o alteración de la actividad enzimática, tales ejemplos incluyen pero no se limitan a uno o más de los siguientes: expresión y/o optimizada en una célula hospedadora o actividad enzimática *in vitro* aumentada, sustrato alterado y/o especificidad del producto, estabilidad estructural enzimática aumentada o disminuida, actividad/especificidad enzimática alterada en condiciones ambientales preferidas, por ejemplo, de temperatura, pH, sustrato.

Como será evidente para un experto en la materia que utiliza herramientas de evolución molecular una enzima puede alterarse para mejorar su funcionalidad.

Apropiadamente, la lípido aciltransferasa utilizada en la invención puede ser una variante, es decir, puede contener por lo menos una sustitución, supresión o adición de aminoácidos, cuando se compara con una enzima original. Varias enzimas conservan por lo menos el 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% de homología con la enzima original. Las enzimas precursoras adecuadas pueden incluir cualquier enzima con actividad de esterasa o lipasa. Preferentemente, la enzima original se alinea con la secuencia de consenso pfam00657.

En una forma de realización preferida, una variante de la enzima lípido aciltransferasa conserva o incorpora por lo menos uno o más de los restos de aminoácidos de la secuencia de consenso pfam00657 encontrados en los bloques GDSx, GANDY y HPT.

Las enzimas, tales como las lipasas sin ninguna o poca actividad de lípido aciltransferasa en un medio acuoso puede mutarse utilizando herramientas de evolución molecular para introducir o potenciar la actividad de transferasa, produciendo de este modo una enzima lípido aciltransferasa con actividad significativa de transferasa adecuada para la utilización en las composiciones y procedimientos de la presente invención.

Apropiadamente, la lípido aciltransferasa para su utilización en la invención puede ser una variante con actividad enzimática aumentada en lípidos polares, preferentemente fosfolípidos y/o glucolípidos cuando se compara con la enzima original. Preferentemente, dichas variantes también tienen poca o ninguna actividad sobre los lípidos polares. La actividad aumentada sobre los lípidos polares, fosfolípidos y/o glucolípidos puede ser el resultado de la hidrólisis y/o de la actividad de la transferasa o una combinación de ambos.

Las variantes de lípido aciltransferasas para su utilización en la invención pueden haber disminuido la actividad sobre los triglicéridos, monoglicéridos y/o diglicéridos en comparación con la enzima original.

Apropiadamente, la enzima variante puede no tener ninguna actividad sobre los triglicéridos y/o monoglicéridos y/o diglicéridos.

Alternativamente, la variante de la enzima para su utilización en la invención puede haber aumentado la actividad sobre los triglicéridos, y/o puede también haber aumentado la actividad en uno o más de los siguientes, lípidos polares, fosfolípidos, lecitina, fosfatidilcolina, glucolípidos, digalactosilmonoglicérido y monogalactosilmonoglicérido.

Se conocen variantes de lípido aciltransferasa, y una o más de dichas variantes puede ser adecuada para su utilización en los procedimientos y utilizaciones según la presente invención y/o en las composiciones enzimáticas según la presente invención. A modo de ejemplo solamente, la variante de lípido aciltransferasas se describen en las referencias siguientes puede utilizarse según la presente invención: Hilton & Buckley, *J. Biol. Chem.*, enero de 1991, 15:266(2):997-1000; Robertson *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 21 de enero 1994; 269(3): 2146-50; Brumlik *et al.*, *J. Bacteriol.*, abril de 1996, 178(7): 2060-4; Peelman *et al.*, *Protein Sci.*, marzo de 1998; 7(3):587-99.

SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

La presente invención también comprende secuencia de aminoácidos de polipéptidos con las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónima del término "polipéptido" y/o del término "proteína". En algunos casos, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "péptido".

La secuencia de aminoácidos puede prepararse/aislarse de una fuente adecuada, o puede prepararse por síntesis o puede prepararse mediante la utilización de técnicas de ADN recombinante.

Apropiadamente, las secuencias de aminoácidos pueden obtenerse de péptidos aislados dados a conocer en la presente memoria por técnicas habituales.

Un procedimiento adecuado para determinar las secuencias de aminoácidos de péptidos aislados es el siguiente:

El polipéptido purificado puede liofilizarse y 100 µg del material secado por congelación puede disolverse en 50 µl de una mezcla de urea 8 M y bicarbonato amónico 0,4 M, pH 8,4. La proteína disuelta puede desnaturalizarse y reducirse durante 15 minutos a 50°C, después de la cubierta con nitrógeno y adición de 5 µl de ditioneitol 45 mM. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, pueden añadirse 5 µl de yodoacetamida 100 mM para modificar los restos de cisteína, durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad bajo nitrógeno.

Pueden añadirse a la mezcla de reacción anterior 135 µl de agua y 5 µg de endoproteinasa Lys-C en 5 µl de agua y la digestión puede realizarse a 37°C bajo nitrógeno durante 24 horas.

Los péptidos resultantes pueden separarse por HPLC en fase inversa en una columna VYDAC C18 (0,46 x 15 cm; 10 µm; The Separation Group, California, USA) utilizando disolvente A: 0,1% de TFA en agua y disolvente B: 0,1% de TFA en acetonitrilo. Los péptidos seleccionados se pueden volver a cromatografiar en una columna Develosil C18 utilizando el mismo sistema disolvente, antes del secuenciado de N-terminal. El secuenciado puede hacerse utilizando un secuenciador 476A de Applied Biosystems, utilizando ciclos rápidos en líquido pulsado según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, California, USA).

INTENSIDAD DE LA SECUENCIA U HOMOLOGÍA DE LA SECUENCIA

La presente invención comprende además la utilización de secuencias con un grado de identidad de secuencia u homología de secuencia con la(s) secuencia(s) de aminoácidos de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria o de cualquier secuencia nucleotídica que codifica dicho polipéptido (en lo sucesivo denominado "secuencia(s) homóloga(s)"). En la presente, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una determinada homología con las presentes secuencias de aminoácidos y las presentes secuencias nucleotídicas. En la presente, el término "homología" puede considerarse equivalente a "identidad".

La secuencia homóloga de aminoácidos y/o la secuencia nucleotídica debería proporcionar y/o codificar un polipéptido que conserva la actividad funcional y/o mejora la actividad de la enzima.

En el presente contexto, una secuencia homóloga se considera que incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser por lo menos 75%, 85% o 90% idéntica, preferentemente por lo menos 95 o 98% idéntica con la presente secuencia. Por lo general los homólogos comprenderán las mismas zonas activas, etc. que la presente secuencia de aminoácidos. Aunque la homología puede considerarse también desde el punto de vista de similitud (es decir restos de aminoácidos con similares propiedades/funciones químicas), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar homología desde el punto de vista de identidad de secuencia.

En el presente contexto, una secuencia homóloga se considera que incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser por lo menos 75%, 85% o 90% idéntica, preferentemente por lo menos 95 o 98% idéntica a una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de la presente invención (la presente secuencia). Por lo general los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican las zonas activas, etc. que la presente secuencia. Aunque la homología puede considerarse también desde el punto de vista de similitud (es decir, restos de aminoácidos con similares propiedades/funciones químicas), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar homología desde el punto de vista de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homologías pueden realizarse a simple vista, o más habitualmente, con ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse en las secuencias contiguas, es decir una secuencia está alineada con otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un residuo a la vez. Esto se denomina una alineación "sin hueco". Por lo general, dichas alineaciones sin hueco se realizan únicamente en un número relativamente corto de restos.

Aunque éste es un procedimiento muy sencillo y lógico, no puede tener en consideración que, por ejemplo, en un par idéntico de otro modo de secuencias, una inserción o supresión dé lugar a que los siguientes restos de aminoácidos se coloquen fuera de la alineación, dando como resultado de este modo potencialmente una gran reducción en el % de homología cuando se lleva a cabo una alineación global. En consecuencia, la mayoría de los procedimientos para comparación de secuencias se diseñan para producir las alineaciones óptimas que tienen en consideración posibles inserciones y supresiones sin penalizar indebidamente la puntuación global de la homología. Esto se consigue insertando "huecos" en la alineación de la secuencia para tratar de maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan "penalizaciones por hueco" a cada hueco que se produce en la alineación de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de la secuencia con tan pocos huecos como sea posible (reflejando mayor relevancia entre las dos secuencias comparadas), conseguirá una puntuación mayor que una con muchos huecos. Se utilizan por lo general "costes por hueco afines" que cargan un coste relativamente alto por existencia de un hueco y una penalidad más pequeña por cada resto posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más frecuentemente utilizado. Las penalizaciones altas por hueco producirán desde luego alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayor parte de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto al utilizar dicho programa informático para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada ampliación.

El cálculo del % máximo de homología por consiguiente requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, tomando en consideración las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicha alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Devereux *et al.*, 1984, *Nuc. Acids Research* 12 pág. 387). Ejemplos de otro programa informático que puede realizar comparaciones de frecuencias incluyen pero no se limitan al, paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed., capítulo 18), FASTA (Altschul *et al.*, *J. Mol. Biol.* 403-420) y el juego de herramientas de comparación GENWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para la investigación fuera de línea y en línea (véase Ausubel *et al.*, 1999, págs. 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit. Una nueva herramienta denominada BLAST 2 Secuencias está también disponible para comparar las secuencias de proteínas y 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 % de homología final puede medirse desde el punto de vista de identidad, el propio procedimiento de alineación no está basado por lo general en una comparación del par todo o nada. En su lugar, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud escalonado que asigna puntuaciones a cada comparación de pares basada en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada frecuentemente es la matriz BLOSUM62, matriz por defecto para la serie de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin utilizan generalmente los valores públicos por defecto y una tabla de comparación de símbolos habituales si se suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones se prefiere utilizar los valores públicos para el paquete GCG o en el caso de otro programa informático, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Alternativamente, puede calcularse el porcentaje de homologías utilizando la característica de la alineación múltiple en DNASIS™ (Hitachi Software), basado en un algoritmo basado en CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), *Gene* 73(1), 237-244).

Una vez el programa informático ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencias. El programa informático por lo general realiza esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

Las secuencias pueden presentar también supresiones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio imperceptible y dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Pueden hacerse sustituciones deliberadas de aminoácidos basándose en la similitud en la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos con tal que se conserve la actividad de enlace secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos principales polares sin carga

con valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

- 5 Pueden hacerse sustituciones conservadoras, por ejemplo según la Tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente en la misma línea y en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

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

- 10 La presente invención comprende además la sustitución homóloga (sustitución y reemplazamiento se utilizan ambas en la presente memoria para significar el intercambio de un resto de aminoácidos existente, por un resto alternativo) que puede ocurrir es decir sustitución semejante por semejante, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución no homóloga también puede ocurrir es decir de una clase de resto a otra o
- 15 alternativamente que implica la inclusión de aminoácidos artificiales tales como ornitina (en lo sucesivo denominada Z), ácido diaminobutírico ornitina (en lo sucesivo denominado B), norleucina ornitina (en lo sucesivo denominado O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazamientos pueden hacerse también por aminoácidos artificiales.

- 20 Las secuencias variantes de aminoácidos pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre cualesquiera dos restos de aminoácidos de la secuencia incluyendo los grupos alquilo tales como los grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos, tales como los restos de glicina o β -alanina. Una forma adicional de variación, implica la presencia de uno o más restos de aminoácidos en forma peptóide, será bien entendida por los expertos en la materia. Para evitar dudas, "la forma peptóide" se utiliza para referirse a restos
- 25 variantes de aminoácidos en los que el grupo sustituyente carbono- α está en el átomo de nitrógeno del resto en lugar de en el carbono- α . Los procedimientos para preparar péptidos en forma peptóide son conocidos en la técnica, por ejemplo Simon, R. J. *et al.*, PNAS (1992), 89(20), 9367-9371 y Horwell DC., *Trends Biotechnol.* (1995), 13(4), 132-134.

- 30 Las secuencias nucleotídicas para su utilización para la presente invención pueden incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. Numerosos tipos diferentes de modificación para oligonucleótidos son conocidos en la técnica. Éstos incluyen ejes centrales de fosfonato de metilo y de fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. En aras de la presente invención, debe sobreentenderse que las secuencias nucleotídicas descritas en la presente pueden ser modificadas por cualquier procedimiento disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden realizarse para aumentar la actividad *in vivo* o la duración de la vida de las
- 35 secuencias nucleotídicas.

- La presente invención comprende también la utilización de secuencias nucleotídicas que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria o cualquier derivado, fragmento o sus derivados. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma entonces esta frecuencia puede utilizarse como sonda para identificar
- 40 secuencias de codificación similares en otros organismos, etc.

- Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias de la presente invención pero que están comprendidos dentro del alcance de la invención pueden obtenerse de numerosas maneras. Pueden obtenerse otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria por ejemplo, sondando bancos de ADN
- 45 preparados a partir de una variedad de individuos, por ejemplo individuos de diferentes poblaciones. Además, pueden obtenerse otros homólogos víricos, bacterianos o celulares, particularmente homólogos celulares hallados en células de mamíferos (por ejemplo células de rata, de ratón, de ganado bovino y de primates) y dichos homólogos y sus fragmentos en general serán capaces de hibridar selectivamente a las secuencias mostradas en el listado de secuencias en la presente memoria. Dichas secuencias pueden obtenerse sondando bancos de ADN
- 50 preparados a partir de bancos de ADN genómicos procedentes de otras especies animales, y sondando dichos bancos con las sondas que comprenden toda o parte de alguna de las secuencias en los listados de secuencias adjuntos en condiciones del medio para alta severidad. Similares consideraciones se aplican para obtener especies homólogas y variantes alelas de las secuencias polipeptídicas o nucleotídicas de la invención.

- 55 Pueden obtenerse también variantes y los homólogos de cepas/especies utilizando PCR degenerada que utilizará los cebadores diseñados para las secuencia dianas dentro de las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos procedentes de varias

variantes/homólogos. Las alineaciones de secuencias pueden realizarse utilizando el programa informático conocido en la técnica. Por ejemplo se utiliza extensamente el programa GCG Wisconsin PileUp.

Los cebadores utilizados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de severidad inferiores a las utilizadas para clonar secuencias con cebadores de una sola secuencia frente a secuencias conocidas.

Alternativamente, dichos polinucleótidos pueden obtenerse por mutagenia dirigida a zonas específicas de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se necesitan cambios de la secuencia de codón imperceptible para optimizar las preferencias de codón para una célula hospedadora específica en la que se están expresando secuencias polinucleotídicas. Otros cambios de secuencia pueden desearse para introducir las secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Pueden utilizarse polinucleótidos (secuencias nucleotídicas) de la invención para producir un cebador, por ejemplo, un cebador para PCR, un cebador para una reacción de ampliación alternativa, una sonda por ejemplo, marcada con un marcador de revelado por medios convencionales utilizando marcadores radioactivos o no radioactivos, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán por lo menos 15, preferentemente por lo menos 20, por ejemplo por lo menos 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud, y están también comprendidos por la expresión polinucleótidos de la invención tal como se utiliza en la presente memoria.

Los polinucleótidos tales como los polinucleótidos y sondas de ADN según la invención se pueden producir de manera recombinante, por síntesis, o por cualquier medio disponible por los expertos en la materia. Además pueden clonarse por técnicas convencionales.

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, lo que implica una preparación en etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada un nucleótido cada vez. Las técnicas para llevar a cabo esto, que utilizan técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

Los polinucleótidos mayores se producirán generalmente utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará la preparación de un par de cebadores (por ejemplo de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) que flanquean una zona de la secuencia que se dirige al lípido que se desea clonar, poniendo los cebadores en contacto con el ARNm o el ADNc extraídos de una célula de animal o humana, realizando una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que producen la ampliación de la zona deseada, aislando el fragmento ampliado (por ejemplo purificando la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperando el ADN ampliado. Los cebadores pueden diseñarse para que contengan secuencias de reconocimiento adecuadas de la enzima de restricción, de modo que el ADN ampliado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

HIBRIDACIÓN

La presente invención comprende además secuencias que son complementarias con las secuencias de ácido nucleico de la presente invención o secuencias que pueden hibridarse ya sea con las secuencias de la presente invención o con secuencias que son complementarias de éstas.

El término "hibridación" tal como se utiliza en la presente memoria incluirá "el procedimiento mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria por emparejamiento de bases" así como el procedimiento de ampliación tal como se realiza en las tecnologías de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La presente invención comprende además la utilización de secuencias nucleotídicas que son capaces de hibridarse con las secuencias que son complementarias de las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas.

La presente invención comprende además secuencias que son complementarias de las secuencias que son capaces de hibridarse con las secuencias nucleotídicas expuestas en la presente memoria.

Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión TM del complejo de unión al nucleótido, como se da a conocer en Berger y Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, *Methods in Enzymology*, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) y proporciona una "severidad" definida como se explica a continuación.

La máxima severidad por lo general tiene lugar a aproximadamente T_m-5°C (5°C por debajo de la T_m de la sonda); alta severidad a aproximadamente 5°C hasta 10°C por debajo de T_m; severidad intermedia a aproximadamente 10°C hasta 20°C por debajo de T_m; y baja severidad a aproximadamente 20°C hasta 25°C por debajo de T_m. Como sobre entenderán los expertos en la materia, una hibridación de máxima severidad puede utilizarse para identificar o

detectar secuencias nucleotídicas idénticas mientras que una hibridación de severidad intermedia (o baja) puede utilizarse para identificar o detectar secuencias polinucleotídicas similares o relacionadas.

5 Preferentemente, la presente invención comprende secuencias que son complementarias de las secuencias que son capaces de hibridar en condiciones de alta severidad o severidad intermedia a secuencias nucleotídicas que codifican a polipéptidos que tienen las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

10 Más preferentemente, el término "variante" comprende secuencias que son complementarias de las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones severas (por ejemplo, 65°C y 0,1 x SSC {1 x SSC = NaCl 0,15 M, citrato-Na 0,015 M pH 7,0}) a las secuencias nucleotídicas que codifican polipéptidos que tienen las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

15 La presente invención se refiere además a secuencias nucleotídicas que pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas de la presente invención (incluyendo las secuencias complementarias de las expuestas en la presente memoria).

20 La presente invención se refiere además a secuencias nucleotídicas que son complementarias de las secuencias que pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas de la presente invención (incluyendo las secuencias complementarias de las presentadas en la presente memoria).

Además dentro del alcance de la presente invención están incluidas las secuencias polinucleotídicas que son capaces de hibridar las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria en condiciones de severidad intermedia a máxima.

25 En un aspecto preferido, la presente invención comprende las secuencias nucleotídicas que pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas de la presente invención, o el complemento de las mismas, en condiciones severas (por ejemplo, 50°C y 0,2 x SSC).

30 En un aspecto más preferido, la presente invención comprende las secuencias nucleotídicas que pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas expuestas en la presente memoria, o el complemento de las mismas, en condiciones severas (por ejemplo, 65°C y 0,1 x SSC).

EXPRESIÓN DE POLIPÉPTIDOS

35 Una secuencia nucleotídica para su utilización en la presente invención o para codificar un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede incorporarse en un vector recombinante replicable. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia nucleotídica en forma de polipéptido, en y/o desde una célula hospedadora compatible. La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control que incluyen activadores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse activadores

40 procarióticos y activadores funcionales en células eucarióticas. Pueden utilizarse activadores específicos para tejidos o específicos para estímulos. Pueden utilizarse también activadores híbridos que comprenden elementos de secuencia de dos o más activadores diferentes descritos anteriormente.

45 El polipéptido producido por una célula hospedadora recombinante por expresión de la secuencia nucleotídica puede segregarse o puede estar contenido dentro de la célula dependiendo de la secuencia y/o del vector utilizado. Las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de la sustancia que codifica secuencias a través de una membrana celular específica procariótica o eucariótica.

VECTOR DE EXPRESIÓN

50 La expresión "vector de expresión" significa un montaje capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*.

Preferentemente, el vector de expresión está incorporado en el genoma de un organismo hospedador adecuado. La expresión incorporado comprende preferentemente la incorporación estable en el genoma.

55 La secuencia nucleotídica de la presente invención o que codifica un polipéptido con las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede estar presente en un vector, en el que la secuencia nucleotídica está operativamente unida a secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica por un organismo hospedador adecuado, es decir el vector es un vector de expresión.

60 Los vectores de la presente invención pueden transformarse en una célula hospedadora adecuada tal como se describe a continuación para proporcionar la expresión de un polipéptido con las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

65 La elección del vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido o vector de fago con frecuencia dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir.

Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, tales como un gen que proporciona resistencia a antibióticos, por ejemplo, resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección puede realizarse por transformación conjunta (tal como se describe en el documento WO 91/17243).

Los vectores pueden utilizarse *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o utilizarse para transfectar o transformar una célula hospedadora.

Por lo tanto, en una forma de realización adicional, la invención proporciona un procedimiento de preparación de secuencias nucleotídicas de la presente invención introduciendo una secuencia nucleotídica de la presente invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible y cultivando la célula hospedadora en condiciones que producen la replicación del vector.

El vector puede comprender además una secuencia nucleotídica que permite al vector replicarse en la célula hospedadora en cuestión. Ejemplos de dichas secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

SECUENCIAS REGULADORAS

En algunas aplicaciones, la secuencia nucleotídica para su utilización en la presente invención o una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede estar operativamente unida a una secuencia reguladora que puede proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica, tal como mediante la célula hospedadora seleccionada. A modo de ejemplo, la presente invención comprende un vector que comprende la secuencia nucleotídica de la presente invención operativamente unida a dicha secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.

La expresión "operativamente unida" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos está en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Una secuencia reguladora "operativamente unida" a una secuencia de codificación está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de referencia.

La expresión "secuencias reguladoras" incluye activadores y potenciadores y/o otras señales de regulación de la expresión.

El término "activador" se utiliza en el sentido normal de la técnica, por ejemplo, una secuencia de fijación de la ARN polimerasa.

La expresión aumentada de la secuencia nucleotídica que codifica la enzima de la presente invención puede conseguirse también mediante la selección de zonas reguladoras heterólogas, por ejemplo, activadoras, zonas principal y terminadora de la secreción.

Preferentemente, la secuencia nucleotídica según la presente invención está operativamente unida por lo menos a un activador.

Ejemplos de activadores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia nucleotídica en un hospedador bacteriano, fúngico o de levadura son bien conocidos en la técnica.

MONTAJES

El término "montaje" (que es sinónimo de términos tales como "conjugado", "casete" e "híbrido") incluye una secuencia nucleotídica para su utilización según la presente invención directa o indirectamente unida a un activador. Un ejemplo de un acoplamiento indirecto es el aporte de un grupo espaciador adecuado tal como una secuencia intrónica tal como la Sh1-intrón o la ADH intrón, intermedian el activador y la secuencia nucleotídica de la presente invención. Lo mismo es cierto para el término "fusionado" en relación con la presente invención que incluye el acoplamiento directo o indirecto. En algunos casos, los términos no comprenden la combinación natural de la secuencia nucleotídica que codifica la proteína normalmente asociada con el activador del gen natural y cuando ambos están en su medio natural.

El montaje puede incluso contener o expresar un marcador, lo que permite la selección del montaje genético.

Para algunas aplicaciones, preferentemente el montaje comprende al menos una secuencia nucleotídica de la presente invención o una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria operativamente unido a un activador.

CÉLULAS HOSPEDADORAS

La expresión "célula hospedadora", en relación con la presente invención incluye cualquier célula que comprenda bien una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria o un vector de expresión tal como se describió anteriormente y que se utiliza en la producción recombinante de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

De este modo, una forma de realización adicional de la presente invención proporciona células hospedadoras transformadas o transfectadas con una secuencia nucleotídica que expresa un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria. Las células se seleccionarán para que sean compatibles con dicho vector y pueden ser por ejemplo células procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, levaduras o vegetales. Preferentemente, las células hospedadoras no son células humanas.

Ejemplos de organismos hospedadores bacterianos adecuados son las especies bacterianas gram negativas o gram positivas.

Dependiendo de la naturaleza de la secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria, y/o la conveniencia de procesar más la proteína expresada, pueden preferirse hospedadores eucarióticos tales como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren células de levadura sobre las células de hongos porque son más fáciles de manipular. Sin embargo algunas proteínas se segregan poco en la célula de la levadura, o en algunos casos no se procesan apropiadamente (por ejemplo, hiperglucosilación en levaduras). En estos casos, debería seleccionarse un organismo hospedador fúngico diferente.

La utilización de células hospedadoras adecuadas (tales como células de hospedadores de levaduras, de hongos y de vegetales) pueden proporcionar modificaciones tras la traducción (por ejemplo, miristoilación, glucosilación, truncamiento, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) ya que puede ser necesario proporcionar actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinante de la presente invención.

La célula hospedadora puede ser una cepa con insuficiente proteasa o sin proteasa.

ORGANISMO

El término "organismo" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que pueda comprender una secuencia nucleotídica según la presente invención o una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria y/o los productos obtenidos a partir de la misma.

Los organismos adecuados pueden incluir un procariota, una levadura, hongo o una planta.

La expresión "organismo transgénico" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprenda una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria y/o los productos obtenidos a partir de la misma y/o en la que un activador puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria en el organismo. Preferentemente la secuencia nucleotídica está incorporada en el genoma del organismo.

La expresión "organismo transgénico" no comprende las secuencias de codificación nucleotídicas naturales en su medio natural cuando están bajo el control de su activador natural que está también en su medio natural.

Por consiguiente, el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende alguna de, o las combinaciones de, una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria, montajes como los definidos en la presente memoria, vectores como los definidos en la presente memoria, plásmidos como los definidos en la presente memoria, células como los definidos en la presente memoria, o los productos de los mismos. Por ejemplo el organismo transgénico puede contener además la secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria bajo el control de un activador heterólogo.

TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS/ORGANISMOS HOSPEDADORES

Como se indicó al principio, el organismo hospedador puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Ejemplos de hospedadores procarióticos incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

Lo dado a conocer en la transformación de hospedadores procarióticos está muy documentado en la técnica, por ejemplo véase Sambrook *et al.*, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Si se utiliza un hospedador procariótico, entonces puede ser necesario que la secuencia nucleotídica se modifique adecuadamente antes de la transformación, tal como por eliminación de intrones.

En otra forma de realización el organismo transgénico puede ser una levadura.

Las células de hongos filamentosos pueden transformarse utilizando varios procedimientos conocidos en la técnica, tales como los procedimientos que conllevan la formación del protoplasto y la transformación de los protoplastos seguidos de la regeneración de la pared celular de una manera conocida. La utilización de *Aspergillus* como microorganismo hospedador esta descrita en la patente EP 0 238 023.

Otro organismo hospedador puede ser una planta. Un estudio de las técnicas generales utilizadas para transformar plantas puede encontrarse 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 de 1994, 17-27). Enseñanzas adicionales sobre la transformación de la planta pueden encontrarse en el documento EP A-0449375.

Las enseñanzas generales sobre la transformación de hongos, levaduras y plantas se presentan en los apartados siguientes.

HONGO TRANSFORMADO

Un organismo hospedador puede ser un hongo, tal como un hongo filamentosos. Ejemplos de dichos hospedadores adecuados incluyen cualquier miembro que pertenece a los géneros *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* y similares.

Las enseñanzas sobre transformación de hongos filamentosos se estudian en el documento US-A-5.741.665 que explica que las técnicas convencionales para la transformación de hongos filamentosos y el cultivo de hongos son bien conocidas en la materia. Un extenso estudio de las técnicas aplicadas a *N. crassa* se encuentra, por ejemplo en Davis y de Serres, *Methods Enzymol.* (1971) 17A:79-143.

Más enseñanzas sobre la transformación de hongos filamentosos se estudian en el documento US-A-5.674.707.

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

Un *Aspergillus* transgénico según la presente invención puede prepararse también, siguiendo, por ejemplo, las enseñanzas 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).

La expresión génica en hongos filamentosos ha sido estudiada en Punt *et al.*, (2002) *Trends Biotechnol.* Mayo de 2002. 20(5): 200-6. Archer & Peberdy *Crit. Rev. Biotechnol.* (1997) 17(4): 273-306.

LEVADURA TRANSFORMADA

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

Un estudio de los principios de expresión génica heteróloga en levadura se proporciona, por ejemplo, en *Methods Mol. Biol.* (1995), 49:341-54, y *Curr. Opin. Biotechnol.* (1997) Oct; 8(5): 554-60.

A este respecto, puede utilizarse levadura (tal como la especie *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (véase *FEMS Microbiol. Rev.* (2000 24(1): 45-66)), como vehículo para la expresión génica heteróloga.

Un estudio de los principios de la expresión génica heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y de la secreción de los productos génicos es proporcionado por E. Hinchcliffe, E. Kenny (1993), "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", *Yeasts*, Vol. 5. Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, editores, 2ª edición. Academic Press Ltd.).

Para la transformación de levaduras, se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse un *Saccharomyces* transgénico según la presente invención siguiendo las enseñanzas 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 de levadura transformadas pueden seleccionarse utilizando varios marcadores selectivos, tales como los marcadores auxótrofos, marcadores con resistencia a antibióticos dominante.

Un organismo hospedador de levadura adecuado puede seleccionarse de entre especies de levaduras tales como, pero sin limitarse a, las especies de levadura seleccionadas de entre *Pichia* spp., *Hansenula* spp., *Kluyveromyces*, *Yarrowinia* spp., *Saccharomyces* spp., incluyendo *S. cerevisiae*, o *Schizosaccharomyces* spp., incluyendo *Schizosaccharomyces pombe*.

Una cepa de la especie de levadura metilotrófica *Pichia pastoris* puede utilizarse como organismo hospedador.

En una forma de realización el organismo hospedador puede ser una especie *Hansenula*, tal como *H. polymorpha* (tal como se describe en el documento WO 01/39544).

PLANTAS/CÉLULAS VEGETALES TRANSFORMADAS

Un organismo hospedador adecuado para la presente invención puede ser una planta. Un estudio de las técnicas generales puede encontrarse 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 de 1994, 17-27), o en el documento WO 01/16308. La planta transgénica puede producir concentraciones aumentadas de ésteres de fitosterol y ésteres de fitostanol, por ejemplo.

Por tanto la presente invención se refiere además a un procedimiento para la producción de una planta transgénica con concentraciones aumentadas de ésteres de fitosterol y ésteres de fitostanol, que comprende las etapas de transformación de una célula vegetal con una lípido aciltransferasa tal como se define en la presente memoria (en particular con un vector de expresión o un montaje que comprende una lípido aciltransferasa como se define en la presente memoria) y cultivar una planta procedente de la célula vegetal transformada.

SECRECIÓN

A menudo, es deseable que el hospedador de expresión segregue la enzima en el medio de cultivo de donde puede recuperarse la enzima más fácilmente. Según la presente invención, la secuencia principal de secreción puede seleccionarse basándose en el hospedador de expresión deseado. Pueden utilizarse también secuencias de señal híbridas en el contexto de la presente invención.

Ejemplos típicos de secuencias principales de secreción heterólogas son las que se originan a partir del gen de amiloglucosidasa fúngica (AG) (*glaA*, ambas versiones de 18 y 24 aminoácidos, por ejemplo, de *Aspergillus*), el gen del factor a (levaduras por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen de α -amilasa (*Bacillus*).

DETECCIÓN

Se conocen en la técnica varios protocolos para detectar y medir la expresión de la secuencia de aminoácidos. Los ejemplos incluyen el ensayo de inmunosorbente con enzima ligada (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA) y clasificación de células activadas fluorescentes (FACS).

Una extensa variedad de marcadores y de técnicas de conjugación son conocidas por los expertos en la materia y pueden utilizarse en varios análisis de ácido nucleicos y aminoácidos.

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

Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados incluyen los radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromógenos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que dan a conocer la utilización de dichos marcadores incluyen los documentos US-A-3.817.837, US-A-3.850.752, US-A-3.939.350, US-A-3.996.345, US-A-4.227.437, US-A-4.275.149 y US-A-4.366.241.

Además, las inmunoglobulinas recombinantes pueden producirse como se muestra en el documento US-A-4.816.567.

PROTEÍNAS DE FUSIÓN

Un polipéptido con las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede producirse como proteína de fusión, por ejemplo para ayudar a la extracción y purificación del mismo. Ejemplos de acompañantes de la proteína de fusión incluyen la glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de fijación del ADN y/o de activación de la transcripción) y β -galactosidasa. Puede ser conveniente además incluir una secuencia de escisión proteolítica entre el acompañante de la proteína de fusión y la secuencia proteica de interés que permite la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión. Preferentemente, la proteína de fusión no impedirá la actividad de la secuencia proteica.

Los sistemas de expresión de la fusión génica, en *E. coli* han sido estudiados en *Curr. Opin. Biotechnol.* (1995), 6(5):501-6.

En otra forma de realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede estar ligada a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para el cribado de bancos de péptidos por agentes capaces de afectar

la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia híbrida que expresa un epíteto heterólogo que es reconocido por un anticuerpo disponible en el mercado.

5 La invención se describe a continuación, a modo de ejemplo solamente, haciendo referencia a las siguientes figuras y Ejemplos.

La figura 1 presenta una secuencia de consenso pfam00657 de la versión 6 de la base de datos (SEC. ID. nº 1);

10 La figura 2 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 2) extraída del organismo *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI:121051);

La figura 3 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 3) extraída del organismo *Aeromonas salmonicida* (AAG098404; GI:9964017);

15 La figura 4 presenta una secuencia de nucleótidos (SEC. ID. nº 4) extraída del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de registro NP_631558 en el Genbank);

La figura 5 presenta una secuencia de nucleótidos (SEC. ID. nº 5) extraída del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de registro CAC42140 en el Genbank);

20 La figura 6 presenta una secuencia de nucleótidos (SEC. ID. nº 4) extraída del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de registro P41734 en el Genbank);

La figura 7 presenta una alineación de las secuencias seleccionadas para la secuencia de consenso pfam00657;

25 La figura 8 presenta una alineación por pares de la SEC. ID. nº 3 con la SEC. ID. nº 2 que presenta el 93% de identidad en la secuencia de aminoácidos. La secuencia señal está subrayada. + indica las diferencias. El motivo GDSX que contiene la serina 16 de la zona activa y el ácido aspártico 116 y la histidina 291 de las zonas activas están subrayados (véanse las zonas sombreadas). Las cifras después del aminoácido es menos la secuencia señal;

30 La figura 9 presenta una secuencia nucleotídica (SEC. ID. nº 7) que codifica una lípido aciltransferasa según la presente invención extraída del organismo *Aeromonas hydrophila*;

La figura 10 presenta una secuencia nucleotídica (SEC. ID. nº 8) que codifica una lípido aciltransferasa según la presente invención extraída del organismo *Aeromonas salmonicida*;

La figura 11 presenta una secuencia de nucleótidos (SEC. ID. nº 9) que codifica una lípido aciltransferasa según la presente invención extraída del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de registro NC_003888.1:8327480...8328367) en el Genbank;

40 La figura 12 presenta una secuencia de nucleótidos (SEC. ID. nº 10) que codifica una lípido aciltransferasa según la presente invención extraída del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de registro AL939131.1:265480...266367) en el Genbank;

45 La figura 13 presenta una secuencia de nucleótidos (SEC. ID. nº 11) que codifica una lípido aciltransferasa según la presente invención extraída del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de registro Z75034 en el Genbank);

La figura 14 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 12) extraída del organismo *Ralstonia* (número de registro AL646052 en el Genbank);

50 La figura 15 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 13) que codifica una lípido acil transferasa según la presente invención extraída del organismo *Ralstonia*;

La figura 16 presenta la SEC. ID. nº 20. Código de registro de la proteína hipotética conservada, proteína Scoe1 NCBI código de registro CAB39707.1 GI:4539178 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

La figura 17 presenta una secuencia de nucleótidos presentada como SEC. ID. nº 21 que codifica la proteína hipotética conservada, proteína NCBI código de registro CAB39707.1 GI:4539178 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

60 La figura 18 presenta una secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 22 de la hipotética proteína conservada, código de registro CAC01477.1 GI:9716139 de la proteína Scoe2 NCBI. [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

65 La figura 19 presenta una secuencia de nucleótidos presentada como SEC. ID. nº 23 que codifica la hipotética proteína conservada, código de registro CAC01477.1 GI:9716139 de la proteína Scoe2 NCBI. [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

La figura 20 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 24) de la supuesta proteína segregada, código de registro CAB88833.1 GI:7635996 de la proteína Scoe3 NCBI [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

- 5 La figura 21 presenta una secuencia de nucleótidos presentada como SEC. ID. nº 25 de la supuesta proteína segregada, código de registro CAB88833.1 GI:7635996 de la proteína Scoe3 NCBI [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

La figura 22 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 26) de la supuesta proteína segregada código de registro CAB89450.1 GI:7672261 de la proteína Scoe4 NCBI . [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

- 10 La figura 23 presenta una secuencia de nucleótidos presentada como SEC. ID. nº 27 que codifica la supuesta proteína segregada código de registro CAB89450.1 GI:7672261 de la proteína Scoe4 NCBI. [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

- 15 La figura 24 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 28) de la supuesta lipoproteína código de registro CAB62724.1 GI:6562793 de la proteína Scoe5 NCBI [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

La figura 25 presenta una secuencia de nucleótidos presentada como SEC. ID. nº 29 que codifica la supuesta lipoproteína código de registro CAB62724.1 GI:6562793 de la proteína Scoe5 NCBI. [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

- 20 La figura 26 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 30) de GDSL-lipasa código de registro AAK84028.1 GI:15082088 de la proteína Srim1 NCBI [*Streptomyces rimosus*];

- 25 La figura 27 presenta una secuencia de nucleótidos presentada como SEC. ID. nº 31 que codifica la GDSL-lipasa código de registro AAK84028.1 GI:15082088 de la proteína Srim1 NCBI [*Streptomyces rimosus*];

La figura 28 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 32) de una lípido aciltransferasa procedente de *Aeromonas hydrophila* (ATCC nº 7965);

- 30 La figura 29 presenta una secuencia de nucleótidos (SEC. ID. nº 33) que codifica una lípido aciltransferasa procedente de *Aeromonas hydrophila* (ATCC nº 7965);

La figura 30 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 34) de una lípido aciltransferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* subesp. *Salmonicida* (ATCC nº 14174);

- 35 La figura 31 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 35) de una lípido aciltransferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* subesp. *Salmonicida* (ATCC nº 14174);

- 40 La figura 32 demuestra que los homólogos de los genes de *Aeromonas* pueden identificarse utilizando el servicio de herramientas para búsqueda de la alineación local básica en el National Center for Biotechnology Information, NIH, MD, USA y las bases de datos completas del genoma. El motivo GDSX se utilizó en la búsqueda de la base de datos y se identificaron numerosas secuencias y genes que codifican potencialmente enzimas con actividad lipolítica. Se identificaron genes del género *Streptomyces*, *Xanthomonas* y *Ralstonia*. Como ejemplo a continuación, la *Ralstonia solanacearum* se alineó al gen (sata) de *Aeromonas salmonicida*. La alineación por parejas presentó el 23% de identidad. La serina de la zona activa está presente en el terminal amino y la esterina y el ácido aspártico de los restos catalíticos pueden identificarse.

- 45 La figura 33 muestra la secuencia de consenso pfam00657.11 [familia 00657, versión 11 de la base de datos] (en lo sucesivo denominada consenso Pfam) y la alineación de varias secuencias a la secuencia de consenso Pfam. Las flechas indican los restos del sitio activo, las casillas subrayadas indican tres de las casillas de homología indicadas por [Upton C y Buckley J.T (1995), *Trends Biochem. Sci.*, 20; 179-179]. Las letras mayúsculas en el consenso Pfam indican restos conservados en muchos miembros de la familia. El símbolo - indica una posición en la que el modelo de Markov oculto del consenso Pfam que cabe esperar que se una a un resto pero no lo hace, de forma que se inserta en un hueco. El símbolo indica un resto sin un resto correspondiente en el consenso Pfam. Las secuencias son las secuencias de aminoácidos listadas en las figuras 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 y 30.

- 50 La figura 34 muestra la secuencia de consenso pfam00657.11 [familia 00657, versión 11 de la base de datos] (en lo sucesivo denominada consenso Pfam) y la alineación de varias secuencias a la secuencia de consenso Pfam. Las flechas indican los restos del sitio activo, las casillas subrayadas indican tres de las casillas de homología indicadas por [Upton C y Buckley J.T (1995), *Trends Biochem. Sci.*, 20; 179-179]. Las letras mayúsculas en el consenso Pfam indican restos conservados en muchos miembros de la familia. El símbolo - indica una posición en la que el modelo de Markov oculto del consenso Pfam que cabe esperar que se una a un resto pero no lo hace, de forma que se inserta en un hueco. El símbolo indica un resto sin un resto correspondiente en el consenso Pfam. Las secuencias son las secuencias de aminoácidos listadas en las figuras 2, 16, 18, 20, 26, 28 y 30. Se descubrió que todas estas proteínas eran activas contra sustratos lipídicos.

La figura 35 presenta un vector de expresión pet12-AsalGCAT = pSM que contiene el gen de lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* activado por His con terminal C;

La figura 36 presenta los resultados de la experimentación con extractos celulares en un kit de análisis NEFA, lo que representa la actividad de una lípido aciltransferasa recombinante de *A. salmonicida*, para con la lecitina. Los pocillos de izquierda a derecha indican: un control positivo, un control negativo (es decir extractos de plásmido vacío) y las muestras recogidas después de 0, 1, 2 y 3 horas de cultivo después de la inducción de IPTG.

La figura 37 presenta la optimización del crecimiento de BL21(DE3)pLysS que alberga el vector de expresión pet12-AsalGCAT = pSM que presenta el cultivo a 30°C, resultado en la producción de la enzima con gran actividad para con la lecitina. Se determinó la actividad de fosfolipasa en extractos celulares utilizando el kit de ensayo NEFA. Pocillos de izquierda a derecha: referencia positiva; referencia negativa; 20°C; 30°C;

La figura 38 presenta extractos celulares en bruto de BL21(DE3)pLysS que expresan la lípido aciltransferasa activa incubada con el sustrato lecitina y la mezcla de reacción se analizó utilizando la cromatografía en capa fina que muestra la presencia de productos de degradación. Bandas: 1. sin enzima; 2. +A.sal-10 µl 37°C; 3.+ A.sal-20 µl 37°C; 4. +A.sal-10 µl 24°C; 5. +A.sal-20 µl 24°C;

La figura 39 presenta la purificación parcial de la aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* que muestra la actividad de fosfolipasa asociada a la proteína purificada con etiqueta His. SE = extractos sometidos a ultrasonidos, His = purificado con kit de rotación Ni-NTA de Qiagen;

La figura 40 presenta el vector de expresión pet12-A.h.GCAT = pSMa que contiene el gen de glicerolípid aciltransferasa (GCAT) de *Aeromonas hydrophila* activado por His en el terminal C se utilizó para transformar la cepa BL21(DE3) pLysS de *E. coli*;

La figura 41 presenta la actividad de los extractos en bruto (5 y 10 µl) que contiene la enzima GCAT de *Aeromonas hydrophila* recombinante se determinó para con la lecitina utilizando el kit del ácido graso no esterificado (NEFA) (Roche, Suiza) se demuestra la presencia de la enzima activa para con el fosfolípido lecitina;

La figura 42 presenta la optimización del crecimiento de BL21(DE3)pLysS que alberga el vector de expresión pet12-AsalGCAT = pSM que presenta el cultivo a 30°C, resultado en la producción de la enzima con gran actividad para con la lecitina. Se determinó la actividad de fosfolipasa en extractos celulares utilizando el kit de ensayo NEFA.

La figura 43 presenta la purificación parcial de las aciltransferasas de *Aeromonas hydrophila* y *Aeromonas salmonicida* que presentan la actividad de fosfolipasa asociada a la proteína purificada con etiqueta His. SE = extractos sometidos a ultrasonidos, His = purificado con kit de rotación Ni-NTA de Qiagen;

La figura 44 presenta la expresión de los genes de *Aeromonas* en *Bacillus subtilis* 163 que presenta la producción de la enzima segregada con actividad para con tanto la lecitina como con DGDG. pUB-AH = montaje que contiene el gen de *A. hydrophila* y pUB-AS, montaje con el gen de *A. salmonicida*. El filtrado del cultivo se incubó con los sustratos durante 60 minutos.

La figura 45 y la figura 46 presentan una placa de TLC en el disolvente IV de revelado (cloroformo:metanol:agua (65:25:4)); Banda 1: 40 mg sitosterol 30 min.; Banda 2: transferasa + 40 mg de sitosterol 30 min.; Banda 3: transferasa + 80 mg de sitosterol 30 min.; Banda 4: transferasa + 40 mg de sitosterol 120 minutos; Banda 5: transferasa + 80 mg de sitosterol 120 minutos; Banda 6: transferasa + 40 mg de sitosterol 300 minutos; Banda 7: transferasa + 40 mg de sitosterol 300 minutos; Banda 8: colesterol; Banda 9: sitosterol;

La figura 47 representa la reacción entre la fosfatidilcolina y el colesterol que está catalizada por una lípido aciltransferasa;

La figura 48 presenta un análisis por TLC de los lípidos extraídos de la yema de huevo tratada o sin tratar con la enzima, 6) 0,31 PLU/g de transferasa nº 179, 7) 1,25 PLU/g de transferasa nº 178-9, 8) 23,25 PLU/g de fosfolipasa nº 3108, 9) referencia.

La figura 49 presenta muestras de mayonesa para análisis producidas por yema de huevo tratada o sin tratar con la enzima: 5) 0,31 PLU/g de Transferasa nº 179, 6) 1,25 PLU/g de transferasa nº 178-9, 7) 23,3 PLU/g de fosfolipasa nº 3108, 8) referencia, agua.

La figura 50 presenta una TLC (en disolvente I) del lípido de yema de huevo tratado con una lípido aciltransferasa procedente de *A. hydrophila*;

La figura 51 presenta una TLC (en disolvente IV) del lípido de yema de huevo tratado con una lípido aciltransferasa procedente de *A. hydrophila*;

La figura 52 presenta un análisis por TLC de transferasa tratada con lípido de yema de huevo a lo largo del tiempo;

La figura 53 presenta la cantidad de ácido graso de éster de colesterol producida en función del tiempo cuando se utiliza una lípido aciltransferasa (transf. nº 178-9) en comparación con cuando se utiliza una enzima lipolítica de referencia, *Thermomyces lanuginosus*;

La figura 54 presenta la actividad relativa de la transferasa como % de transferasa y la actividad hidrolítica en las reacciones enzimáticas en la yema de huevo con alto contenido en agua, nº 1991 (fosfolipasa A2) y nº 2427 (fosfolipasa A1), son fosfolipasas de referencia, nº 178 es una lípido aciltransferasa;

La figura 55 presenta el efecto del contenido de agua en el ensayo de actividad en transferasa; de la transferasa nº 178 en las reacciones de la transferasa en yema de huevo con alto contenido en agua;

La figura 56 presenta la actividad en transferasa para una lípido aciltransferasa (nº 178) en función del tiempo de reacción en las reacciones de transferasa en yema de huevo con alto contenido en agua;

La figura 57 y la figura 58 presentan los gráficos que representan el ácido graso y el éster de colesterol en función del tiempo. Los gráficos representan los resultados obtenidos por análisis de GLC en el ensayo para la medición de la actividad de aciltransferasa utilizando lecitina y colesterol en tampón como sustrato;

La figura 59 presenta una TLC en el disolvente I. Yema de huevo tratada con lípido aciltransferasa nº 138 procedente de *Aeromonas salmonicida* (Banda nº 1 y nº 2) o con una fosfolipasa nº 2938 (LIPOPAN® F) (Banda nº 3) o yema de huevo sin tratar (Banda nº 4);

La figura 60 presenta una TLC en el disolvente IV. Yema de huevo tratada con lípido aciltransferasa nº 138 (banda nº 1 y nº 2) o con fosfolipasa nº 2938 (banda nº 3) o yema de huevo sin tratar (banda nº 4);

la figura 61 presenta una yema de huevo tratada con lípido aciltransferasa nº 138 (muestras nº 1 y nº 2) y con fosfolipasa nº 2938 (muestra nº 3) o yema de huevo sin tratar (muestra nº 4);

la figura 62 presenta una emulsión alimenticia después de 2 horas a 100°C. 0) yema de huevo sin tratar. 1) yema de huevo tratada con lípido aciltransferasa nº 138 durante 210 minutos. 3) yema de huevo tratada con fosfolipasa nº 2938 de referencia durante 210 minutos;

la figura 63 presenta placas de TLC que presentan la identificación de la actividad de transferasa en esteroles vegetal y glicerol. PC = fosfatidilcolina; LPC = lisofosfatidilcolina; PE = fosfatidiletanolamina; monogl = monoglicérido;

la figura 64 presenta una placa de TLC en disolvente I, muestras 1 a 6 después de 24 horas y muestras 1 a 4 después de 4 horas de tiempo de reacción. El análisis de TLC confirma la formación del éster de esteroles en las muestras 1, 2, 5 y 6;

la figura 65 presenta una placa de TLC en disolvente I cuando la actividad de transferasa de una aciltransferasa inmovilizada procedente de *Aeromonas salmonicida* se determinó en una mezcla de aceite, con las muestras tomadas a 0,5, 1, 3, 6 y 24 h;

las figuras 66 y 67 presentan las placas de TLC en los disolventes I y IV. Banda 1 = lecitina; Banda 2 = referencia-10 min.; Banda 3 = 0,75 PLU, 10 min.; Banda 4 = 0,75 PLU, 60 min. ; Banda 5 = 0,75 PLU, 220 min.; Banda 6 = referencia, 20 h; Banda 7 = 0,75 PLU, 20 h; y Banda 8 = éster de colesterol;

las figuras 68 y 69 presentan placas de TLC en el disolvente IV. Banda 1 = lecitina; Banda 2 = referencia-10 min.; Banda 3 = 1 PLU, 10 min.; Banda 4 = 1 PLU, 60 min. ; Banda 5 = 1 PLU, 180 min.; Banda 6 = 1 PLU, 220 min.; Banda 7 = 1 PLU, 1.200 min.; Banda 8 = referencia, 1200 min; Banda 9 = éster de glucosa; Banda 10 = colesterol; y Banda 11= glucosa;

la figura 70 presenta la reacción entre DGDG y glucosa cuando está catalizada por una lípido aciltransferasa;

la figura 71 presenta una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 36) del montaje de fusión utilizado para la mutagénesis del gen de lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* en el Ejemplo 17. Los aminoácidos subrayados son un péptido señal de xilanasas;

la figura 72 presenta una secuencia de nucleótidos (SEC. ID. nº 45) que codifica una enzima de *Aeromonas hydrophila* que incluye un péptido señal de xilanasas; y

la figura 73 presenta una placa de TLC que presenta claramente la formación del éster de esteroles vegetal y de monoglicérido. La Banda 1 es después de un tiempo de reacción de 1 hora, la Banda 2 es después de un tiempo de

reacción de 4 horas, la Banda 3 es después de un tiempo de reacción de 24 horas y la Banda 4 es un esteroide vegetal.

Ejemplos

Excepto donde se indica, el análisis de TLC se realizó como se describe en el Ejemplo 6 y el análisis de GLC se realizó como se describe en el Ejemplo 11.

Ejemplo 1: Clonación, secuenciado y expresión heteróloga de una transferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* subesp. *Salmonicida*

Cepas utilizadas

Aeromonas salmonicida subesp. *Salmonicida* (ATCC 14174) se adquirió en el ATCC y se cultivó durante la noche a 30°C en medio de Luria-Bertani (LB). Se centrifugaron las células y se aisló el ADN genómico utilizando los procedimientos para el aislamiento de ADN genómico de Qiagen Ltd.; juego de tampón de ADN genómico (cat. 19060), proteasa K (cat. 19131) y ARNasa A (cat. 19101) se adquirieron todos en Qiagen Ltd. (Boundary court Gatwick Court, West Sussex, RH10 2AX).

La cepa bacteriana BL21 del hospedador (DE3)pLysS (Novagen) se utilizó para la producción de las enzimas de *Aeromonas* recombinantes. Se utilizaron células competentes de BL21(DE3)pLysS como hospedador para la transformación con el vector de expresión pet12-AsalGCAT = pSM. Los transformados que contienen el plásmido apropiado se cultivaron a 37°C en medio LB con agar-agar que contenía 100 µg de ampicilina/ml.

Construcción del vector de expresión pet12-AsalGCAT = pSM

Para todas las ampliaciones en ADN de los genes de transferasa procedentes de *Aeromonas*, se utilizó ADN genómico (0,2-1 µl) como plantilla y *pfu* ADN polimerasa (2,5 unidades) se utilizaron con 10 µl de 10 x tampón *pfu*, 1 µl de cada cebador (50 pmoles/ µl), dNTP 200 µM en un volumen de reacción total de 100 µl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico programable utilizando las siguientes condiciones: 95°C durante 30 segundos, 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos. Se aplicó una prolongación adicional de 5 minutos a 72°C.

La ampliación por PCR del gen de transferasa procedente de *A. salmonicida* se llevó a cabo en 2 reacciones de PCR por separado. La reacción 1 de PCR se llevó a cabo utilizando pares de cebadores, como 1USNEW(5'AGCATATGAAAA AATGGTTTGT TTGTTTATTG GGG3' [SEC. ID. n° 36]) y asls950new (5' GTG ATG GTG GGC GAG GAA CTC GTA CTG3' [SEC. ID. n° 37]). Se llevó a cabo una segunda reacción de PCR para incorporar una etiqueta de histidina en el terminal C utilizando el producto de la PCR procedente de la primera reacción y los cebadores: as1USNEW(5'AGCATATGAAAA AATGGTTTGT TTGTTTATTG GGG3' [SEC. ID. n° 38]) y AHLS1001 (5'TTGGATCC GAATTCAT CAATG GTG ATG GTG ATG GTG GGC3' [SEC. ID. n° 39]). El producto de la PCR procedente de la segunda reacción se purificó y se digirió con las enzimas de restricción Nde1 y BamHI. 2 µg del vector ADN pET12a se digirió también con las enzimas de restricción Nde1 y BamHI y se trató con fosfatasa. El pet12a tratado con la enzima de restricción y el producto de la PCR de la reacción 2 se purificaron y se ligaron utilizando un kit de ligadura rápida (Roche, Suiza). Se utilizó la mezcla de ligadura para transformar las células TOP10 de *E. coli*. Los transformados se colocaron en placa en medio LB agar-agar que contenía 100 µg/ml de ampicilina.

El cebador del activador T7 (5'TAATACGACTCACTATAG3' [SEC. ID. n° 40]) y el cebador del terminador T7 (5'CTAGTTATTGCTCAGCGG3' [SEC. ID. n° 41]) se utilizaron para verificar las secuencias y la orientación de los genes de transferasa clonados en el vector pET12a. El kit de secuenciado de ADN del ciclo de terminadores se realizó utilizando ABI Prism® BigDye™ con 500 ng de ADN plásmido como plantilla y 3,2 pmoles de activador T7 y cebadores del terminador.

El montaje mostrado en la figura 35 se utilizó para transformar la cepa BL21(DE3)pLysS (Novagen) competente del hospedador bacteriano y se seleccionaron transformados resistentes a ampicilina y se utilizaron para el análisis de la expresión.

Expresión de la lipido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* recombinante

La cuantificación de la actividad enzimática para con la lecitina se determinó en extractos celulares utilizando el kit de ácido graso no esterificado (NEFA) (Roche, Suiza).

En la figura 36, BL21(DE3)pLysS que alberga el vector de expresión pet12-AsalGCAT = pSM se cultivó en medio LB + 100 µg/ml de ampicilina y se incubó con agitación a 37°C hasta que se alcanza la DO₆₀₀ = 0,6 a 1,0. Los cultivos se indujeron a continuación utilizando IPTG (0,4 mM) y se continuó la incubación durante las 3 horas siguientes. Se

tomaron muestras a las 0, 1, 2 y 3 horas después de la inducción con IPTG. Se determinó la actividad enzimática utilizando el kit NEFA y lecitina como sustrato.

Optimización del crecimiento para la producción de más enzimas activas

BL21(DE3)pLysS que alberga el vector de expresión pet12-AsalGCAT = pSM se cultivó en medio LB +100 µg/ml de ampicilina y se incubó con agitación a diferentes temperaturas de cultivo (37°C, 30°C y 20°C). La condición óptima para la producción de la enzima lípido aciltransferasa activa fue cuando los cultivos se cultivan 30°C como se muestra en la figura 37.

Purificación parcial de transferasa de *Aeromonas salmonicida* recombinante

La cepa BL21(DE3)pLysS que alberga el vector de expresión pet12-AsalGCAT = pSM se cultivó a 37°C y se prepararon extractos celulares en bruto por tratamiento con ultrasonidos. La enzima recombinante se purificó más a partir de los extractos celulares en bruto tratados con ultrasonidos utilizando el kit de rotación Ni-NTA de Qiagen. Se determinó la actividad de fosfolipasa utilizando el kit NEFA y lecitina como sustrato. Los extractos celulares en bruto de BL21(DE3)pLysS que expresa la transferasa activa incubada con el sustrato de lecitina y la mezcla de reacción se analizó utilizando la cromatografía en capa fina que presenta la presencia de productos de degradación (véase la figura 38).

Purificación parcial de la transferasa recombinante de *Aeromonas salmonicidae*. La cepa BL21(DE3)pLysS que alberga el vector de expresión pet12-AsalGCAT = pSM se cultivó a 37°C y se prepararon extractos celulares en bruto por tratamiento con ultrasonidos. La enzima recombinante se purificó más a partir de los extractos celulares en bruto tratados con ultrasonidos utilizando el kit de rotación Ni-NTA de Qiagen. Se determinó la actividad de fosfolipasa utilizando el kit NEFA y lecitina como sustrato (véase la figura 39).

Ejemplo 2: Clonación y expresión la transferasa de *Aeromonas hydrophila* en *E. coli*

Aeromonas hydrophila (ATCC n° 7965) se adquirió en el ATCC y se cultivó durante la noche a 30°C en medio de Luria-Bertani (LB). Se centrifugaron las células y se aisló el ADN genómico utilizando los procedimientos para el aislamiento de ADN genómico de Qiagen Ltd.; juego de tampón de ADN genómico (cat. 19060), proteasa K (cat. 19131) y ARNasa A (cat. 19101) se adquirieron todos en Qiagen Ltd. (Boundary court Gatwick Court, West Sussex, RH10 2AX).

La cepa bacteriana BL21 del hospedador (DE3)pLysS (Novagen) se utilizó para la producción de las enzimas de *Aeromonas* recombinantes. Se utilizaron células competentes de BL21(DE3)pLysS como hospedadoras para la transformación con el vector de expresión pet12a-A.h.GCAT=pSMa. Los transformados que contienen el plásmido apropiado se cultivaron a 37°C en medio LB con agar-agar que contenía 100 µg de ampicilina/ml.

Construcción del vector de expresión pet12a-AsalGCAT = pSMa:

Para todas las ampliaciones en ADN de los genes de transferasa procedentes de *Aeromonas*, se utilizó ADN genómico (0,2-1 µl) como plantilla y *pfu* ADN polimerasa (2,5 unidades) se utilizaron con 10 µl de 10 x tampón *pfu*, 1 µl de cada cebador (50 pmoles/µl), dNTP 200 µM en un volumen total de reacción de 100 µl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un ciclador térmico programable utilizando las siguientes condiciones: 95°C durante 30 segundos, 30 ciclos a 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 1 minuto y 68°C durante 2 minutos. Se aplicó una prolongación adicional de 5 minutos a 72°C.

La ampliación por PCR del gen de transferasa procedente de *A. hydrophila* (ATCC n° 7965) se llevó a cabo en 2 reacciones de PCR por separado.

La reacción 1 de la PCR se realizó utilizando pares de cebadores, AHUS1 (5'GTCATATGAAAAATGGTTTGTGTGTTTATTGGGATTGGTC3', SEC. ID. n° 42) y ahls950 (5'ATGGTGATGGTGGCGAGGAAGTCTGACTG3', SEC. ID. n° 43).

Se realizó una segunda reacción PCR para incorporar la etiqueta histidina en el terminal C utilizando el producto de la PCR de la primera reacción y los pares de cebador:

AHUS1(5'GTCATATGAAAAATGGTTTGTGTGTTTATTGGGATTGGTC3' SEC ID n° 44,) y AHLS1001(5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATGGTGGGTC3' SEC ID n° 45).

El producto de la PCR procedente de la segunda reacción se purificó y se digirió con las enzimas de restricción Nde1 y BamHI. 2 µg del vector ADN pET12a se digirió también con las enzimas de restricción Nde1 y BamHI y se trató con fosfatasa. El pet 12a tratado con la enzima de restricción y el producto de la PCR de la reacción 2 se purificaron y se ligaron utilizando un kit de ligadura rápida (Roche, Suiza). Se utilizó la mezcla de ligadura para

transformar las células TOP10 de *E. coli*. Los transformados se colocaron en placa de medio agar-agar LB que contenía 100 µg/ml de ampicilina.

El cebador del activador T7 (5'TAATACGACTCACTATAG3' y el cebador del terminador T7 (5'CTAGTTATTGCTCAGCGG3' se utilizaron para verificar las secuencias y la orientación de los genes clonados GCAT en el vector pET12a. El secuenciado de ADN del ciclo de terminadores se realizó utilizando el kit de secuenciado del ciclo de terminadores ABI Prism® BigDye™ con 500 ng de ADN plásmido como plantilla y 3,2 pmoles de activador T7 y cebadores del terminador.

El montaje mostrado en la figura 40 se utilizó para transformar la cepa BL21(DE3)pLysS (Novagen) competente del hospedador bacteriano y se seleccionaron transformados resistentes a ampicilina y se utilizaron para el análisis de la expresión.

Expresión de la transferasa de *Aeromonas hydrophila* en BL21(DE3)pLysS

La cepa de *E. coli* BL21(DE3)pLysS que alberga el vector de expresión pet12a-A.h.GCAT = pSMa se cultivó en medio LB + 100 µg/ml de ampicilina y se incubó con agitación a 37°C hasta que se alcanza una D.O.₆₀₀ = 0,6 a 1,0. Los cultivos se indujeron a continuación utilizando IPTG (0,4 mM) y se continuó la incubación durante las 3 horas siguientes. Se tomaron muestras a las 0, 1, 2 y 3 horas después de la inducción con IPTG. Se determinó la actividad enzimática utilizando el kit NEFA y lecitina como sustrato (figura 41).

Optimización del crecimiento para la producción de más enzimas activas

BL21(DE3)pLysS que alberga el vector de expresión pet12a-A.h.GCAT = pSMa se cultivó en medio LB +100 µg/ml de ampicilina y se incubó con agitación a diferentes temperaturas de cultivo (37°C, 30°C y 20°C). La condición óptima para la producción de la enzima GCAT activa fue cuando los cultivos se cultivan a 30°C como se muestra en la figura 42.

Purificación parcial de transferasa de *A. hydrophila* recombinante (GCAT)

La cepa BL21(DE3)pLysS que alberga el vector de expresión pet12a-A.h.GCAT = pSMa se cultivó a 37°C y se prepararon extractos celulares en bruto por tratamiento con ultrasonidos. La enzima recombinante se purificó más a partir de los extractos celulares en bruto tratados con ultrasonidos utilizando el kit de rotación Ni-NTA de Qiagen. Se determinó la actividad de fosfolipasa utilizando el kit NEFA y lecitina como sustrato. (figura 43).

Ejemplo 3: Expresión de transferasas de *Aeromonas* en *Bacillus subtilis* 163

Construcción del plásmido

Se utilizaron dos vectores de expresión diferentes de *Bacillus subtilis* (pUB 110 y pBE5) para la expresión heteróloga de los genes de *Aeromonas* en *Bacillus subtilis*. El vector pUB110 contiene el activador de alfa-amilasa mientras que el vector pBE tiene el activador P32 como zona reguladora para la expresión de los genes fusionados de *Aeromonas*. En el pUB110 el primer aminoácido de los genes de GCAT maduros de *Aeromonas* se fusionaron en el marco con el último aminoácido de la secuencia del péptido señal de xilanasas de *Bacillus subtilis* mediante la secuencia de restricción Nhe1, creando 2 aminoácidos adicionales en frente de las proteínas maduras. El pBE5 contiene la fusión de la secuencia señal cgtase en la secuencia NcoI para la secreción de las proteínas recombinantes en el filtrado del cultivo.

Se realizaron las reacciones de PCR para obtener la fusión de los genes de *Aeromonas* en el marco para las secuencias señal de los vectores pUB 110 y los pBE5. Las PCR se realizaron utilizando los pares de cebadores siguientes para el gen de *A. hydrophila*:

Reacción 1 de PCR: usAHncoI (5'ATGCCATGGCCGACAGCCGTCCCGCC3', SEC ID nº 46) y IsAH (5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3', SEC ID nº 47)

Reacción 2 de PCR: US-Ahnhel (5'TTGCTAGCGCCGACAGCCGTCCCGCC3', SEC ID nº 48.) y IsAH (5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3', SEC ID nº 49)

Las PRC se realizaron utilizando los pares de cebadores siguientes para el gen de *A. salmonicida*:

Reacción 3 de PCR: US-AsncoI (5'TTGCCATGGCCGACACTCGCCCCGGC3', SEC ID nº 50) y IsAH(5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3', SEC ID nº 51)

Reacción 4 de PCR: US-ASnhe1 (5'TTGCTAGCGCCGACACTCGCCCCGCC3', SEC ID nº 52) and 1Sah (5'TTGGATCCGAATTCATCAATGGTGATG3', SEC ID nº 53)

Todos los productos de la PCR se clonaron en el truncamiento II de la PCR (vector TOPO) y se secuenciaron con cebadores de secuenciado complementarios y transcritos.

Los clones procedentes de las reacciones 1 y 3 de la PCR se cortaron con NcoI y Bam HI y se utilizaron como inserciones para la ligadura del vector pBE5 cortado con NcoI/BamHI/fosfatasa. Los clones procedentes de las reacciones 2 y 4 de la PCR se cortaron con NheI y Bam HI y se utilizaron como inserciones para la ligadura del vector pUB que se cortó con NheI/BamHI/fosfatasa.

Expresión de los genes de la transferasa de *Aeromonas* en *Bacillus subtilis* y caracterización de la actividad enzimática

Las aciltransferasas de las dos especies de *Aeromonas* se han expresado con éxito en *E. coli* (resultados anteriormente). Los montajes génicos de la fusión pUB110 y pBE5 de *Bacillus* se utilizaron para transformar *Bacillus subtilis* y se seleccionaron los transformados por colocación en placas con kanamicina. Los transformados resistentes a la kanamicina aislados y cultivados en 2 x YT son capaces de expresión heteróloga de los genes de *Aeromonas* en *Bacillus*. Los filtrados del cultivo tienen actividad de digalactosildiacilglicerol (DGDG) galactolipasa, además de tener actividades tanto de aciltransferasa como de fosfolipasa. La actividad hacia el digalactosildiacilglicerol (DGDG) se midió después de 60 minutos de incubación del sobrenadante del cultivo con el sustrato. DGDG procedente de harina de trigo (puede adquirirse en Sigma) así como la actividad hacia la lecitina como se muestra en la figura 44. *Bacillus* produjo la enzima después de toda la noche (20 a 24 horas) a las 48 horas de cultivo en el medio de cultivo como una proteína segregada. En algunos casos, la expresión de los genes de *Aeromonas* se ha demostrado que interfiere con la viabilidad celular y el crecimiento en *Bacillus* y *E. coli*, es por consiguiente necesario seleccionar minuciosamente las cepas de expresión y optimizar las condiciones del cultivo para garantizar la expresión. Por ejemplo, varias cepas hospedadoras de *Bacillus* (B.s 163, DB104 y OS 21) se transformaron con los vectores de expresión para la comparación del crecimiento. B.s163 se puede transformar con 2 genes de *Aeromonas* y puede expresar la proteína activa. DB104 se puede transformar con todos los montajes pero solamente puede expresar la transferasa de *A. salmonicida*.

Ejemplo 4: Fermentación y purificación de lípido aciltransferasas de *Aeromonas* producidas en *E. coli*

Fermentaciones de *E. coli*:

Microorganismos

Se utilizaron en este estudio dos cepas de *Escherichia coli*, una que contenía una lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (Ejemplo 2) y dos que contenían lípido aciltransferasas de *Aeromonas salmonicida* (Ejemplo 1).

La cepa de *E. coli* que contenía el gen de *A. hydrophila* se denominó DIDK0124 y la cepa de *E. coli* que contenía el gen de *A. salmonicida* se denominó DIDK0125. La fermentación con DIDK0124 se denominó HYDRO0303 y la fermentación con DIDK0125 se denominó SAL0302. La proteína purificada de HYDRO025 se denominó REFⁿ138. La proteína purificada de HYDRO0303 se denominó REFⁿ135.

Medios de cultivo y condiciones de cultivo

LB con agar-agar

Las placas de LB con agar-agar utilizadas para mantener las cepas contenían: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 15 g/l de agar-agar, 100 mg/l de ampicilina y 35 mg/l de cloranfenicol. Las placas de agar-agar se incubaron a 30°C.

Matraz en agitación con LB

El medio LB (50 ml por matraz en agitación) utilizado para la producción de material de inóculo para los cultivos en biorreactor contenía: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 100 mg/l de ampicilina y 35 mg/l de cloranfenicol. Los matraces en agitación se inocularon en las placas con LB agar-agar y se incubaron a 30°C y a 200 rpm.

Cultivo en biorreactor

Se llevaron a cabo cultivos en biorreactores de 6 l construidos en planta rellenos con 4 l de medio que contenía: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de NaCl, 8 g/l de KH₂PO₄, 0,9 g/l MgSO₄·7H₂O, 40 g/l de glucosa monohidratada, 0,4 ml/ ADD APT® Foamstop Sin 260 (ADD APT Chemicals AG, Helmond, Holanda), 10 mg/l de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6H₂O, 0,7 mg/l de CuSO₄·5H₂O, 3 mg/l de ZnSO₄·7H₂O, 3 mg/l de MnSO₄·H₂O, 10 mg/l de EDTA, 0,1 mg/l de NiSO₄·6H₂O, 0,1 mg/l de CoCl₂, 0,1 mg/l de H₃BO₄, 0,1 mg/l de KI, 0,1 mg/l de Na₂MoO₄·2H₂O, 1 g/l de ampicilina y 35 mg/l de cloranfenicol.

Los biorreactores se inocularon con una cantidad de cultivo LB que garantiza el final del cultivo después de aproximadamente 20 horas de cultivo (calculado a partir de la tasa de crecimiento específico máxima de $0,6 \text{ h}^{-1}$, la D.O.₆₀₀ del matraz en agitación con LB y la D.O.₆₀₀ final en el biorreactor de aproximadamente 20).

Se inoculó SAL0302 con 10 ml de cultivo LB y se inoculó HYDRO0303 con 4 ml de cultivo LB.

Los biorreactores se operaron en las condiciones siguientes: temperatura 30°C, agitación entre 800 y 1000 rpm (dependiendo del experimento), 5 l/min de aireación, pH 6,9, pH de control 8,75% (p/v), NH₃-agua y H₂SO₄ 2 M. La inducción se consiguió mediante adición de isopropil β-D-tiogalactósido a una concentración final de 0,6 mM cuando se produjeron 0,4 moles (HYDRO0303) y 0,7 moles de CO₂ respectivamente.

Recolección

Se utilizó el siguiente procedimiento para la recolección y homogenización de la biomasa:

- 1) El caldo de cultivo de fermentación de las fermentaciones se centrifugó a $5.000 \times g$ y 4°C durante 10 minutos, y se descargó el sobrenadante. La biomasa se almacenó a -20°C hasta su utilización. Se descongeló la biomasa y se volvió a poner en suspensión en 500 ml de NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM e inhibidor de proteasa completo (sin EDTA) (Roche, Alemania).
- 2) La biomasa en suspensión se homogeneizó a 2 kbares y 4°C en un destructor celular de Constant Systems Ltd. (Warwick, U.K.)
- 3) Los detritos celulares se separaron por centrifugación a $10.000 \times g$ y 4°C durante 30 minutos seguido de la recolección del sobrenadante.
- 4) El sobrenadante se clarificó más por centrifugación a $13.700 \times g$ y 4°C durante 60 minutos seguidos de recolección del sobrenadante.
- 5) Se filtró el sobrenadante a través de filtros Vacu Cap de 0,2 μm (Pall Life Sciences, U.K.) y el filtrado se recogió para su purificación cromatográfica inmediata.

Purificación cromatográfica de las transferasas

Se rellenó una columna (2,5 x 10 cm) con 50 ml de gel Sefarosa Quelante ff. y se cargó con sulfato de níquel (según el procedimiento descrito por el fabricante Amersham Biosciences). Se equilibró la columna con 200 ml de NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM. Se aplicaron 400 ml de producto en crudo a la columna a un caudal de 5 ml/min. Se lavó a continuación la columna con NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM hasta que el UV₂₈₀ alcanzó la línea de referencia. El GCAT se eluyó a continuación con 40 ml de NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM e imidazol 500 mM.

Ejemplo 5: Fermentación y purificación de lípido aciltransferasas de *Aeromonas* producidas en *Bacillus subtilis*

Fermentaciones

BAC0318-19, BAC0323-24

Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este estudio se originan en la transformación de una cepa del hospedador *Bacillus subtilis*, n° 163 con un plásmido que contiene el gen que codifica la transferasa de *Aeromonas salmonicida* insertada en el vector pUB110OIS. La expresión del gen está controlada por un activador de alfa-amilasa, y la secreción de la transferasa está mediada por la secuencia señal de la xilanasas de *Bacillus subtilis* (Ejemplo 3). La cepas se denominaron DIDK0138 (fermentación de BAC0318-19) y DIDK0153 (fermentación de BAC0323-24).

Medios de cultivo y condiciones del cultivo

Medio de precultivo

A un matraz en agitación (volumen total de 500 ml, con tabiques) se añadieron 100 ml de un medio que contenía:

NaCl	5 g/l
K ₂ HPO ₄	10 g/l
Harina de soja	20 g/l
Extracto de levadura BioSpringer 106	20 g/l
Antiespumante SIN260	5 ml/l

el pH se ajustó a 7,0 antes de la esterilización en el autoclave.

- 5 Después de la esterilización en autoclave se añadieron 6 ml de Nutriose al 50% (p/p) por matraz. Se añadió kanamicina a una concentración de 50 mg/l después de la esterilización en autoclave.

Inoculación

- 10 Un matraz de precultivo en agitación se inoculó con cultivo congelado directamente en una solución madre en glicerol al 25% (p/v). El matraz en agitación se incubó a 33°C y 175 rpm durante aproximadamente 16 horas, durante las que se utilizaron 50 ml para inocular el fermentador.

Fermentaciones

- 15 Las fermentaciones se realizaron en fermentadores de 6 l construidos en planta.

El medio (3 l) del lote contenía:

Licor de maíz fermentado (50% de w)	40 g/l
Extracto de levadura BioSpringer 153 (50% de w)	10 g/l
NaCl	5 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,25 g/l
Mn(NO ₃) ₂ ·H ₂ O	0,2 g/l
Antiespumante SIN260	1 ml/l
Kanamicina (esterilizada en filtro para el fermentador después de esterilización en autoclave)	50 mg/l

- 20 La alimentación contenía:

Glucosa monohidratada	540 g/kg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	4,8 g/kg
Antiespumante SIN260	4 ml/kg
Extracto de levadura BioSpringer 153 (50% de w) (esterilizado en autoclave por separado)	150 g/kg

- 25 La alimentación en la fermentación de BAC0318 y BAC0323 se comenzó basándose en el CO₂ acumulado, según las ecuaciones siguientes:

Alimentación - Caudal [g/h] = 0, AcCO₂ < 0,15
 Alimentación - Caudal [g/h] = 2,85 + t·1,54, AcCO₂ ≥ 0,15 y t < 12
 Alimentación - Caudal [g/h] = 21,3, t > 12

- 30 t: tiempo (en horas) desde el momento en que el CO₂ acumulado (AcCO₂) alcanzó 0,15 moles.

La alimentación en la fermentación de BAC0319 y BAC0324 se inició basándose en el CO₂ acumulado según las ecuaciones siguientes:

- 35 Alimentación - Caudal [g/h] = 0, AcCO₂ < 0,15
 Alimentación - Caudal [g/h] = 2,0 + t·1,08, AcCO₂ ≥ 0,15 y t < 12
 Alimentación - Caudal [g/h] = 15, t > 12

- 40 t: tiempo (en horas) desde el momento en que el CO₂ acumulado (AcCO₂) alcanzó 0,15 moles.

El pH se controló en 7,0 añadiendo 12,5% (p/v) de NH₃-agua o ácido fosfórico 2 M.
 La aireación fue de 3 l/min correspondiente a 1 vvm.
 La temperatura fue de 33°C.

- 45 El fermentador estaba equipado con dos agitadores Rushton de 8 cm Ø colocados a una distancia de 10 cm.

Recolección

La biomasa se separó por centrifugación a 16.000 x g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se esterilizó por filtración el sobrenadante y el filtrado se utilizó para la purificación y pruebas de aplicación.

Ejemplo 6. Pruebas de aplicación en yema de huevo

En los experimentos siguientes la transferasa aislada de *Aeromonas salmonicida* expresada en *E. coli* se probó en yema de huevo sola y en yema de huevo a la que se había añadido un esteroide vegetal.

Material

Transferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* Ref. nº 138
 Yema de huevo: de huevo fresco (huevos de gallinas)
 Esterol vegetal: β -sitosterol, Sigma, S 5753
 Placas de TLC: Placas de sílice Merck nº 1.05715.0001.

Análisis de TLC.

Se activó la placa de TLC en una estufa (110°C) durante ½ h.

Se vertieron 100 ml de disolvente de revelado en una cámara de cromatografía con tapa. Las paredes de la cámara estaban cubiertas con papel de filtro (Whatman 2) con objeto de saturar la cámara con el vapor de disolvente.

La placa de TLC se colocó en un marco y la muestra se aplicó sobre la placa de TLC 2 cm desde el fondo. La placa de TLC se colocó a continuación en la cámara de TLC con el disolvente de revelado. Cuando el disolvente de revelado llevó 14 cm desde el fondo de la placa, la placa de TLC se sacó y se secó en una tabla de vapores, y a continuación se colocó en la estufa a 110°C durante 10 minutos.

La placa de TLC se sumergió a continuación en el reactivo de revelado y se secó en la estufa a 110°C durante 15 minutos.

Disolvente de revelado:

nº IV: cloroformo:metanol:H₂O (65:25:4)
 nº I: P-éter:MTBE:ácido acético (60:40:1)

Tampón de revelado (tampón de vanadato):

32 g de Na₂CO₃ y 300 ml de H₂O (1 M)
 18,2 g de pentóxido de vanadato (V₂O₅) se añaden y se disuelve durante el calentamiento suave.
 La solución se enfría hasta temperatura ambiente.
 Se añaden con cuidado 460 ml de H₂SO₄ 2,5 M (460 ml de H₂O + 61 ml de H₂SO₄).
 Se añade agua hasta 1000 ml.

Actividad de fosfolipasa**Sustrato:**

0,6% de L- α fosfatidilcolina al 95% vegetal (Avanti nº 441601) + 0,4% de Triton-X 100 (Sigma-X-100) + CaCl₂ 5 mM se disuelve en tampón HEPES 0,05 M, pH 7.

Procedimiento

Se añadieron 400 μ l de sustrato a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se colocaron en un termomezclador Eppendorf a 30°C durante 5 minutos.

En el tiempo T = 0 se añadieron 50 μ l de solución enzimática. También se analizó un blanco con agua en lugar de la enzima.

Se mezcló la muestra a 1000 rpm en el termomezclador Eppendorf a 30°C durante 10 minutos. En el tiempo T = 10 min. se colocó el tubo Eppendorf en otro termomezclador a 99°C durante 10 minutos para interrumpir la reacción.

Se analizaron los ácidos grasos libres en las muestras utilizando un kit NEFA de WAKO GmbH.

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

Extracción de lípidos

Se mezcló 1 g de yema de huevo y 7,5 ml de cloroformo:metanol 2:1 en un Whirley y se centrifugó a 750 x g durante 10 minutos.

Se aislaron 3 ml de la fase de cloroformo y se utilizaron para análisis de lípidos posterior.

Resultados:

Se analizó la actividad de fosfolipasa en la transferasa (REF. n° 138) de *Aeromonas salmonicida* expresada en *E. coli* como se describió anteriormente y se determinó también en la yema de huevo con o sin β -sitosterol. La muestra se agitó con un agitador magnético durante la reacción. El diseño experimental se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Prueba	Tiempo de reacción a 37°C	Yema de huevo	Sitosterol	Transferasa n° 138
n°	minutos	gramos	mg	Unidades
1	30	1	40	
2	30	1	40	0,75 PLU
3	30	1	80	0,75 PLU
4	120	1	40	0,75 PLU
5	120	1	80	0,75 PLU
6	300	1	40	0,75 PLU
8	300	1	40	

Se interrumpió la reacción añadiendo 7,5 ml de cloroformo:metanol (2:1) y se mezcló en un mezclador Whirley durante 30 segundos. Se aisló la fase de cloroformo por centrifugación y se transfirieron 2 μ l de la fase de cloroformo a una placa de TLC de sílice activada previamente y se eluyó con disolvente de revelado n° I, y otra placa de TLC en disolvente de revelado n° IV.

Los resultados de los análisis de TLC se muestran en las figuras 45 y 46.

La reacción de transferasa con una transferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* en yema de huevo en la que se añadió estero vegetal ha demostrado que la enzima transfiere ácido graso de la lecitina en la yema de huevo al colesterol durante la formación del éster de colesterol. El cromatograma por TLC indicó además, que la parte del estero añadida a la yema de huevo se transfería al éster de estero.

La cantidad de éster de estero en relación con la cantidad de éster de colesterol formado durante la reacción puede analizarse por HPLC o GLC.

Es sabido que los ésteres de estero vegetales reducen la absorción del colesterol en el intestino. Se indica además en la bibliografía que los ésteres de colesterol se absorben menos que el colesterol libre en el intestino. Cuando una transferasa y estero vegetal se añaden a la yema de huevo se obtiene un producto que causa absorción reducida del colesterol, y al mismo tiempo se produce lisolecitina que mejora las propiedades de emulsificación de la yema de huevo. Una ventaja adicional de añadir transferasa y estero vegetal a la yema de huevo es que el éster de estero vegetal es ingerido junto con el colesterol natural disponible, que cabe esperar que tenga el mayor efecto sobre la reducción de la absorción del colesterol.

Ejemplo 7: Modificación de la yema de huevo por la lípido aciltransferasa procedente de *Aeromonas salmonicida*

Según la presente invención se ha demostrado ahora que es posible producir lisolecitina de la yema de huevo sin formación sustancial de ácido graso libre mediante la utilización de una transferasa.

El contenido en lecitina de la yema de huevo es un emulsionante importante para la producción de mayonesa con la limitación de que la mayonesa no es estable al calor. Se ha sabido por consiguiente durante varios años utilizar un fosfolipasa del páncreas para modificar la lecitina en la yema de huevo a lisolecitina, que es un emulsionante más eficaz. La utilización de la yema de huevo modificada por enzimas en la producción de la mayonesa contribuye a una mejor estabilidad al calor de la mayonesa durante la pasteurización. Una limitación de la utilización de la fosfolipasa del páncreas en la yema de huevo es que la cantidad de ácido graso aumenta también, lo que contribuye a una estabilidad oxidativa reducida porque los ácidos grasos libres son más propensos a la oxidación que el éster correspondiente. El ácido graso libre puede contribuir también a un sabor a jabón.

La transferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* se expresó con éxito en *B.subtilis* y se fermentó a escala de laboratorio como se describe en el Ejemplo 5, se purificó por cromatografía de líquidos y se utilizó para modificar los lípidos de la yema de huevo. La yema de huevo modificada por enzimas se utilizó para producir mayonesa estable al calor.

La transferasa de *A. salmonicida* puede utilizarse para producir lisolecitina y colesterol en la yema de huevo sin la producción de cantidades significativas de ácidos grasos libres. Es decir, sin aumentar o aumentar sustancialmente los ácidos grasos libres en el alimento.

La yema de huevo modificada por enzimas producida por la transferasa presentaba propiedades mejoradas de emulsificación y puede utilizarse para la producción de mayonesa estable al calor.

Esta enzima era muy funcional en la modificación de la yema de huevo catalizando la reacción de transferencia de lípidos entre la lecitina y el colesterol, figura 47.

Este estudio investigó más la utilización de transferasa para la modificación de la yema de huevo y la utilización de la yema de huevo modificada en la producción de mayonesa estable al calor.

Este ejemplo describe la fermentación, aislamiento y aplicación de la transferasa en las yemas de huevo, así como la aplicación de la yema de huevo modificada por enzimas en la mayonesa. El ejemplo se divide en dos partes:

A. Aplicación de la transferasa en la yema de huevo

B. Experimento de la yema de huevo modificada por enzimas en la mayonesa

Parte experimental

A. Aplicación

Enzima y sustrato

Transferasa nº 178-9 de *A. salmonicida*, purificación 2554-100 C73, 15 PLU-7/ml. Transferasa nº 179 de *A. salmonicida*, 18,5 PLU-7/ml.

Fosfolipasa A1 LECITASE™ ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca)

Yema de huevo: yema de huevo líquida con 8% de sal, SANNOVA FOODS, DK

El análisis de TLC se realizó como se describió anteriormente (véase el Ejemplo 6 anterior).

Actividad de la fosfolipasa: véase los ejemplos anteriores.

Extracción de lípidos

1 g de yema de huevo, 7,5 ml de cloroformo:metanol 2:1 se mezclaron en un Whirley durante 30 s. y se centrifugaron a 750 durante x g durante 10 minutos.

Se aislaron 4 ml de la fase de cloroformo y se utilizaron para el análisis de lípidos posterior.

Prueba de estabilidad a la oxidación

La estabilidad a la oxidación de la mayonesa se midió en un equipo ML OXIPRESS en el que la muestra es oxidativa tensionada mediante calor a presión en una atmósfera de oxígeno.

Después de un cierto tiempo, denominado periodo de inducción (IP), la oxidación de la muestra produce un determinado consumo de oxígeno, que es registrado como cambio de presión de un transductor de presión. El periodo de inducción más elevado indica mejor estabilidad a la oxidación.

Procedimiento

Se colocan 5 gramos de mayonesa en un recipiente de vidrio y se cierra el recipiente de vidrio con el transductor de presión. Se llena el recipiente con oxígeno a 5 bares. Se abre la válvula para vaciar el recipiente. Este procedimiento se repite dos veces y la muestra con atmósfera de oxígeno a 5 bares se coloca a 80°C. La presión de oxígeno se mide en función del tiempo y se calcula el periodo de inducción (IP) en horas.

Resultados

La transferasa purificada procedente de *Aeromonas salmonicida* de las muestras nº 179 y nº 178-9 se utilizaron para tratar la yema de huevo como se resume en la Tabla 2. La prueba inicial ha demostrado que la GCAT transferasa debería añadirse con mucha menos actividad de fosfolipasa (PLU), que una fosfolipasa comercial. Esto se explica por el hecho de que GCAT es una transferasa y por consiguiente tiene mucha menos actividad hidrolítica que una fosfolipasa normal.

Tabla 2

	Yema de huevo Sanofe 8% de sal	2344-44 C89 18,5 PLU-7/ml	Transferasa nº 178-9	nº 3108, Lecitasa Ultra	agua	
nº	Yema de huevo	Transferasa nº 179	18,5 PLU-7/ml	1500 PLU-7/ml 7/ml		
	gramos	gramos	gramos	ml	gramos	PLU-7/ml
6	120	2,00			8,00	0,31
7	120		10		0	1,25
8	120			1,86	8,14	23,25
9	120				10	0

Se realizaron las reacciones enzimáticas pesando la yema de huevo y la enzima en un vaso de precipitados. Se colocaron las muestras en una estufa a 37°C durante la agitación lenta. Después de 1, 2 y 4 horas de tiempo de reacción se extrajo una muestra para análisis de TLC. Después de 4 horas de tiempo de reacción se almacenó el producto a 5°C y se utilizó para los experimentos con mayonesa.

El análisis TLC de los lípidos extraídos de la yema de huevo tratada con enzimas se presenta en la figura 48.

Los análisis de TLC de la figura 48 presentan un efecto hidrolítico claro de la fosfolipasa nº 3108 en triglicérido durante la formación de ácidos grasos libres, así como de algunos mono- y diglicéridos. La fosfolipasa nº 3108 parece no tener ningún efecto sobre el colesterol. Ambas muestras de transferasa contribuyen evidentemente a la formación de éster de colesterol correspondiente con la reducción de contenidos de colesterol.

D. Yema de huevo modificada con enzimas en mayonesa

Para investigar el efecto de la modificación de las muestra con yema de huevo mencionadas en la Tabla 2, se realizaron pruebas de aplicación en la mayonesa con un contenido en grasa del 50%. Una mayonesa que contiene yema de huevo sin tratar se produjo también.

El objetivo de la investigación fue determinar el impacto de las propiedades de emulsificación de la yema de huevo modificada con enzimas y el impacto en la estabilidad térmica. Todas las muestras de mayonesa contenían la misma cantidad de aceite y se emulsionaron sólo con yema de huevo. Todas las muestras de mayonesa se produjeron utilizando un mezclador Koruma (Disho V60/10) y se calentó durante el tratamiento a 95°C durante 5 minutos.

Las muestras de las mayonesas (figura 49) producidas por la yema de huevo tratada con enzimas eran adecuadas y homogéneas sin separación de aceite. La muestra de referencia se separó en un aceite y en una fase acuosa.

El tamaño de partícula de la gotita de aceite en las muestras de mayonesa con yema de huevo tratadas con enzimas se midió en un Mastersizer Malvern. Se mezcló la muestra con 0,1% de SDS en tampón fosfato 0,1 M, pH 7, antes de la medición. La lectura fue el tamaño medio de todas las partículas mostradas en la Tabla 3.

Tabla 3

Experimento	Enzima	Tamaño medio de partícula µm
6	Transferasa nº 179, 0,31 PLU-7/g	12,9
7	Transferasa nº 178-9, 1,25 PLU-7/g	7,2
8	Lecitasa Ultra nº 3108, 23 PLU-7/g	5,2

Los resultados de la medición del tamaño de partícula demuestran claramente el efecto de la dosis aumentada de transferasa procedente de *A. salmonicida*. Con la dosis alta de transferasa el tamaño de partícula está próximo al de la mayonesa producida por Lecitasa Ultra. Debe retenerse en mente sin embargo que la Lecitasa Ultra produce muchos ácidos grasos, que pueden contribuir a una distribución de partículas más fina.

El tamaño de la gotita de aceite de la mayonesa preparada con la enzima es significativamente más pequeño que el tamaño de la gotita de aceite de la mayonesa preparada sin la enzima (es decir, la mayonesa de referencia).

Estabilidad a la oxidación

La estabilidad a la oxidación de las muestras 7 y 8 de mayonesa se analizó en un ML OXIPRESS con los resultados mostrados en la Tabla 4.

Tabla 4

Muestra	Período de inducción	
	1. determinación de horas	2. determinación de horas
7	37,44	38,08
8	35,68	35,52

La medición de la estabilidad a la oxidación proporcionó una diferencia significativa clara en la estabilidad a la oxidación. La mayonesa con yema de huevo tratada con transferasa 179-8 tenía una estabilidad a la oxidación significativa mejor que la mayonesa con yema de huevo tratada con Lecitasa Ultra. Esto puede explicarse por el hecho que la Lecitasa Ultra produce más ácidos grasos libres que son más propensos a la oxidación que los correspondientes ésteres de ácidos grasos.

Una muestra de las yemas de huevo utilizadas para la producción de mayonesa se extrajo con cloroformo, y los lípidos de la yema de huevo se analizaron por GLC utilizando los resultados presentados en la Tabla 5.

Tabla 5

Experimento	Enzima	Ácido graso	Colesterol	Éster de colesterol	Triglicérido
6	Transferasa nº 179,	0,96	0,94	0,49	23,95
7	Transferasa nº 178-9	1,84	0,60	1,06	24,54
8	Lecitasa Ultra nº 3108	14,05	1,16	0,12	2,45
9	Referencia	0,48	1,16	0,13	22,87

Los resultados de la GLC en la Tabla 5 confirman en los resultados del análisis de TLC que la Lecitasa Ultra produce una cantidad muy elevada de ácidos grasos libres y una gran parte del triglicérido está hidrolizado. Por otra parte la transferasa produce solamente una modesta cantidad de ácidos grasos libres y ningún triglicérido se hidroliza. Está también demostrado claramente que la transferasa produce éster de colesterol procedente del colesterol.

Los resultados indican que la cantidad de PC en la mayonesa "tratada con enzimas" es reducida en comparación con la mayonesa de referencia, mientras que la cantidad de LPC aumenta en la mayonesa con enzima tratada en comparación con la mayonesa de referencia. El aumento de la cantidad de LPC puede explicar bien las propiedades mejoradas de emulsificación de la mayonesa tratada con enzimas en comparación con la mayonesa de referencia. Los análisis de HPLC y GLC indican además un nivel menos de colesterol libre en la mayonesa tratada con enzimas en comparación con la mayonesa de referencia, probablemente debido al colesterol que se está utilizando como molécula receptora en la reacción de transferasa que produce un aumento en la cantidad de ésteres de colesterol en la mayonesa tratada con enzimas en comparación con la mayonesa de referencia. Además, los resultados indican que la cantidad de ácidos grasos libres no aumenta de manera significativa cuando la yema de huevo se trata con la transferasa. Los resultados indican además que la cantidad de ácidos grasos libres producidos en el alimento tratado con la lipido aciltransferasa es significativamente menor que en el alimento tratado con la fosfolipasa de referencia, esto es cierto incluso si la cantidad de lisolecitina formada en los alimentos es la misma.

Ejemplo 8: Efecto de la transferasa de *Aeromonas salmonicida* en pasteles

El efecto de la acil-transferasa de GCAT procedente de *Aeromonas salmonicida* se prueba en una receta de pastel. La enzima se prueba sola y combinada con otras enzimas lipolíticas. Las enzimas se añaden a alguno de los ingredientes del pastel o se añaden juntos con los demás ingredientes del pastel antes de mezclar en el pastel.

Los resultados preliminares demuestran que la acil-transferasa combinada con una enzima de hidrólisis de triglicéridos mejora el volumen del pastel y la estructura de la miga en comparación con una referencia.

En los siguientes experimentos una transferasa producida procedente de *A. salmonicida* y sus variantes se prueban solas y combinadas con enzimas hidrolizantes de triglicéridos. Estas enzimas son activas en los componentes lipídicos en el huevo y la manteca así como en los carbohidratos, proteínas, glicerol y colesterol (en el huevo), lo que forma parte de la receta del pastel.

Materiales y procedimiento

Enzima

- 5 Acil-transferasa nº 179 de *Aeromonas salmonicida*
 Grindamyl EXEL 16, Lipasa procedente de *Thermomyces lanuginosus*

Receta del pastel:

Ingredientes	%	g
Azúcar 35/20	20,37	204
Harina para pastel, Albatros	18,11	181
Almidón de trigo	5,21	52
Levadura de panadero	0,36	4
Huevo entero líquido pasteurizado	22,63	226
Manteca Vegao (Aarhus United)	18,11	181
Suero en polvo	0,68	7
Jarabe de glucosa 75% 42 DE	4,53	45
Glicerol	1,36	14
Sal	0,32	3
Aceite de semillas de colza	6,34	63
Sorbato de potasio	0,18	1,8

10 **Equipo**

Mezclador: Hobart N50 con una espátula
 Estufa: estufa para pasteles Simon

15 **Procedimiento:**

Todos los ingredientes deben estar a temperatura ambiente.

- 20 1. Quemar azúcar y manteca durante 3 minutos, empezar a la 2ª velocidad y mover a la 3ª velocidad en 30 s.
2. Añadir los ingredientes restantes y empezar a la 1ª velocidad y mover a la 2ª velocidad en 30 s.-5 min. de mezcla total.
- 25 3. Medir el volumen de la mantequilla en una copa de 1 dl.
4. Los moldes del pastel golpeado se pulveriza con aceite "Babette" pulverizado y se cubre con papel.
5. Se pesan 2 x 350 g en los moldes de la tarta golpeados.
- 30 6. Se extiende la masa uniformemente con una espátula.
7. Antes de ponerla en el horno se añade un chorro de aceite en la parte superior del pastel (en el medio) para partir el pastel por la mitad.
- 35 8. Hornear durante 50 min a 180°C.
9. Después del horneado sacar el molde del horno y "dejarlo caer" en la tabla antes de sacar los pasteles de los moldes.
- 40 10. Sacar el papel de los pasteles y dar la vuelta cara arriba.
11. Se enfrían los pasteles en una parrilla durante 60 min. antes de pesar y medir el volumen

45 **Observaciones**

La(s) enzima(s) utilizada(s) se añade(n) al comienzo del mezclado o se añade(n) a algunos de los ingredientes del pastel antes de añadirla(s) a otros ingredientes del pastel.

- 50 Las enzimas son solamente activas durante el mezclado o la reacción de los componentes del pastel y las enzimas se inactivan durante la cocción del pastel.

Resultados

Se realizan los siguientes experimentos como se muestra en la tabla siguiente:

		1	2	3	4
Huevo entero	G	250	250	250	250
Jarabe de glucosa, 75% DE 42	G	10	10	10	10
Acil-transferasa nº 179, 26 PLU/ml	MI	25		25	
Gryndamil EXEL 16	Mg		37,5	37,5	
Agua					25

Se hacen reaccionar huevo, jarabe de glucosa y enzima durante 30 minutos a 37°C y poco después los huevos se utilizan para producir pastel según la receta mencionada anteriormente.

Los resultados preliminares demuestran que una combinación de aciltransferasa y un glicérido que hidroliza la lipasa procedente de *Thermomyces lanuginosus* mejora el volumen del pastel, y además la estructura de la miga, la calidad y aspecto del alimento se mejora en comparación con una referencia con agua. Los resultados preliminares indican en el pastel que puede preferiblemente utilizarse una combinación de lípido aciltransferasa y una lipasa.

Ejemplo 9: El objeto de estos experimentos fue probar una transferasa de *A. hydrophila* expresada en *E.coli*

La reacción con transferasa de *A. hydrophila* nº 135 (0,5 NEFA-PLU/ml) se probó en yema de huevo. El montaje experimental se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6

nº	Tiempo de reacción minutos	Yema de huevo gramos	nº 135 conc. Unidades PLU-NEFA
1	30	1	0,000
2	30	2	0,100
3	60	2	0,100
4	150	2	0,100
5	240	2	0,100
6	1560	2	0,100
7	1560	1	0,000

Se calentó a 37°C la yema de huevo y se añadió la enzima. Después del tiempo de reacción se añadieron 7 ml de CHCl₃:metanol 2:1 y se mezcló en un Whirley durante 30 segundos.

Se centrifugó la muestra a 800 x g durante 10 minutos y se aisló la fase disolvente inferior. Se aplicaron 2 µl de esta muestra sobre una placa de sílice de TLC y se eluyó en el disolvente IV de elución. Los resultados del análisis TLC se muestran en las figuras 50 y 51.

Los procedimientos y materiales mencionados en este ejemplo son los detallados en los ejemplos anteriores.

Las muestras de este experimento se analizaron bien por GLC como derivados de TMS. Los resultados del análisis GLC se presentan en la Tabla 7.

Tabla 7. Análisis GLC de lípidos de la yema de huevo

nº	Reacción	Transferasa nº 135 conc.			
	tiempo	Unidades/g yema de huevo	Ácido graso libre	Colesterol	Éster de colesterol
	min		%	%	%
7	Referencia	0	0,25	2,88	0,34
3	60	0,025	0,25	2,68	0,56
4	150	0,025	0,29	1,85	1,72
5	240	0,025	0,53	1,42	3,54
6	1560	0,025	0,95	0,3	4,43

A partir del análisis GLC del ácido graso libre, del colesterol y del éster del colesterol es posible calcular la concentración molar de cada componente y calcular el % de actividad de transferasa como se muestra en la Tabla 7.

Cálculo del % de actividad de transferasa

A partir de los resultados se calculan los aumentos en ácido graso libre y ésteres de esterol:

$$\Delta\% \text{ ácido graso} = \% \text{ ácido graso (enzima)} - \% \text{ ácido graso (referencia)}$$

$$\Delta\% \text{ éster de esterol} = \% \text{ esterol/éster de estanol (enzima)} - \% \text{ esterol/éster de estanol (referencia)}$$

La actividad de la transferasa se calcula en % de la actividad enzimática total:

$$\% \text{ de actividad de transferasa} = \frac{\Delta\% \text{ éster de esterol}/(\text{Mv éster de esterol}) \times 100}{\Delta\% \text{ éster de esterol}/(\text{Mv éster de esterol}) + \Delta\% \text{ ácido graso}/(\text{Mv ácido graso})}$$

en la que:

Mv éster de esterol = peso molecular medio de los ésteres de esterol

Mv ácido graso = peso molecular medio de los ácidos grasos

Tabla 8. Actividad de transferasa en la yema de huevo de *A.hydrophila* n° 135

Nº	Reacción	Transferasa n° 135 conc.				
	tiempo	Unidades/g yema de huevo	Ácido graso libre	Colesterol	Éster de colesterol	Actividad de transferasa
	min		mM	mM	mM	%
7	Control	0	8,9	74,5	5,3	-
3	60	0,05	8,9	69,3	8,7	100
4	150	0,05	10,4	47,8	26,5	93
5	240	0,05	18,9	36,7	54,6	77
6	1560	0,05	33,9	7,8	68,4	48

Los análisis tanto por TLC como por GLC confirman que inicialmente la reacción de la transferasa de *A.hydrophila* n° 135 es la reacción dominante. Después de 150 minutos de tiempo de reacción se produce alguna actividad hidrolítica. Después de 1560 minutos la reacción de transferasa y la reacción hidrolítica han alcanzado casi el mismo nivel. Los resultados indican además que siempre y cuando la molécula receptora de colesterol esté disponible la reacción de transferasa es la reacción dominante. Cuando la concentración de colesterol disminuye la actividad hidrolítica se hace más dominante.

Ejemplo 10: Ensayo para la medición de la actividad de transferasa utilizando yema de huevo como sustrato-denominado en lo sucesivo "Ensayo con yema de huevo"

Se aisló una lípido aciltransferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* y se expresó en *Bacillus subtilis*. El objeto de este trabajo es desarrollar un método analítico, que sea capaz de mejorar la actividad tanto de transferasa como hidrolítica de las enzimas, y a partir de estos análisis es posible definir la actividad tanto de transferasa como la hidrolítica de las enzimas utilizando un sustrato que contiene lecitina y colesterol.

En este trabajo se utilizó yema de huevo como sustrato para el ensayo enzimático porque la yema de huevo contiene tanto lecitina como colesterol y es sabido que las transferasas y las fosfolipasas actúan muy bien en este sustrato.

El inconveniente de utilizar yema de huevo es que este sustrato es una mezcla compleja de agua, lípidos y proteínas. Los componentes lipídicos incluyen 66,2% de glicéridos; 29,6% de fosfolípidos y 4,2% de colesterol. Los fosfolípidos están constituidos por 73% de lecitina, 15% de cefalina y 12% de otros fosfolípidos. De los ácidos grasos, el 33% están saturados y el 67% insaturados, incluyendo 42% de ácido oleico y 7% de ácido linoleico (ref. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, John Wiley & Sons, Inc.).

Cabe esperar algunas variaciones en la composición de la yema de huevo. En la bibliografía (*Biochimica et Biophysica Acta*, 1124 (1992) 205-222) se menciona sin embargo que: "La yema de huevo madura de las gallinas domésticas poseen una composición de lípidos y lipoproteínas notablemente constante a pesar de la mucha variación en la dieta y en las condiciones ambientales" y además se cita "Como resultado la yema de huevo continúa proporcionando un alimento de composición casi constante que sirve para mantener sus propiedades químicas y físico-químicas para la utilización fiable en las industrias de panificación, cosmética y farmacéutica".

Esta referencia indica que la composición de la yema de huevo es muy constante y se decidió por consiguiente utilizar yema de huevo de gallinas como sustrato para el ensayo con yema de huevo.

La cuantificación de los productos de la reacción de lípidos a partir del tratamiento enzimático de la yema de huevo se realizó mediante extracción de lípidos del sustrato seguido de análisis GLC de los componentes lipídicos.

5 Procedimiento

Materiales

10 Yema de huevo: yema de huevo líquida pasteurizada de Danæg Products A/S, DK-4000 Roskilde. Tampón HEPES, Sigma cat. nº H 3375. Cloroformo, grado analítico

Enzimas

15 Lípido aciltransferasa purificada de *A. salmonicida* nº 178-9.

Lipasa de *Thermomyces lanuginosus*. GRINDAMYL EXEL 16, nº de artículo 147060 (referencia).

Ensayo enzimático con sustrato de yema de huevo

20 En un vaso Wheaton de 20 ml se pesaron 5 g de yema de huevo líquido y se calentó a 35°C. 0,25 ml de solución enzimática se añadió y se puso en marcha un cronómetro.

A intervalos regulares se transfirieron muestras de 0,5 g a un vaso Dram de 10 ml.

25 Se añadieron 20 µl de HCl 4 M para interrumpir la reacción enzimática y acidificar el jabón de ácido graso.

Se añadieron 3 ml de cloroformo y la muestra se mezcló en un mezclador Whirley durante 30 s.

30 Se centrifugó la muestra a 3000 g durante 10 min y se transfirieron 0,8 ml de la fase cloroformo a un vaso Dram alquitranado. Se evaporó el cloroformo a 60°C bajo una corriente de nitrógeno. Se pesó de nuevo el vaso Dram.

Se analizaron los lípidos aislados por GLC y TLC.

Análisis por TLC, como se describe en la presente memoria.

35 Análisis por GLC, como se describe en la presente memoria.

Resultados

40 En la Tabla 9 se muestra el experimento realizado para el ensayo con yema de huevo utilizando yema de huevo como sustrato.

Tabla 9

		1	2	3
Yema de huevo, líquida	gramos	5	5	5
Transferasa nº 178-9, 32 PLU-7/ml *	ml			0,25
Lipasa de <i>T. lanuginosus</i> , 200 LIPU/ml	ml		0,25	
Agua	ml	0,25		

45 Se tomaron muestras de 0,5 g después de 15, 30, 60, 120 y 1.080 minutos, y se aisló el lípido por extracción con disolvente. Se analizaron los lípidos por TLC utilizando el disolvente I y IV respectivamente. La fotografía de la placa de la TLC se muestra en la figura 52.

50 El análisis por TLC indica claramente la actividad de la transferasa nº 178-9 de *A. salmonicida* (muestra 3). Ésta se aprecia por la disminución de los fosfolípidos PC y PE. Los resultados indican además que la cantidad de lisolecitina LPC no es tan alta como era de esperar. Esto puede indicar actividad hidrolítica en la lisolecitina o puede también ser causado por extracción insuficiente porque la lisolecitina es muy polar y por consiguiente podría distribuirse parcialmente en la fase acuosa.

55 Los lípidos aislados por extracción con disolvente se analizaron también por GLC con objeto de cuantificar la cantidad de ácido graso libre, colesterol y éster de colesterol. Los resultados de la GLC se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Análisis por GLC del lípido procedente de la yema de huevo tratada con enzimas. Los resultados se expresan en % basados en el contenido en lípidos

			15	30	60	120	1080
			Minutos	Minutos	Minutos	Minutos	Minutos
Ácidos grasos libres	Referencia	1	0,328	0,304	0,332	0,333	0,369
	T. lanuginosus	2	0,391	0,376	0,459	0,627	22,909
	A. salmonicida nº178-9	3	1,007	1,668	4,013	6,761	15,098
Colesterol	Referencia	1	3,075	2,968	3,103	3,056	3,099
	T. lanuginosus	2	3,130	3,032	3,045	3,026	3,225
	A. salmonicida nº 178-9	3	2,835	1,912	0,356	0,220	0,206
Éster de colesterol	Referencia	1	0,416	0,397	0,422	0,408	0,437
	T. lanuginosus	2	0,436	0,400	0,425	0,419	0,416
	A. salmonicida nº 178-9	3	1,414	2,988	6,107	6,694	5,760
Triglicérido	Referencia	1	76,153	73,505	75,565	79,344	77,382
	T. lanuginosus	2	74,099	74,413	77,079	74,284	21,781
	A. salmonicida nº 178-9	3	73,781	73,342	77,857	82,040	72,117

5 A partir de los resultados se observó que casi todo el colesterol estaba esterificado después de 60 minutos en la muestra 3. Se concluyó que en los primeros 30 minutos había sustrato en exceso para la reacción. Los resultados de las muestras tomadas después de 15 y 30 minutos se utilizaron por consiguiente para calcular las actividades de las enzimas.

10 Basándose en la información de la Tabla 10 y en el hecho que la yema de huevo contiene 27% de lípidos, la cantidad de ácido graso y éster de colesterol en micromoles producida por ml de enzimas se calculó con los resultados mostrados en la Tabla 11.

15 Los resultados en la Tabla 11 se obtuvieron en los cálculos siguientes de los resultados de los ácidos grasos en la muestra nº 3 (A. *Salmonicida*, 15 min.).

Lípido en 5 g en yema de huevo = $5 \times 0,27 = 1,35$ gramos

1,35 gramos de lípido contienen 1,007% de ácidos grasos = $1,35 \times 1,007/100 = 0,01359$ gramos.

Peso molecular medio de los ácidos grasos es 272.

$0,01350$ gramos = $0,01359 \times 1.000.000/272$ μ moles = 49,9798 μ moles

Se añaden 0,25 ml de enzima

μ moles de ácido graso/ml de enzima = $49,9798/0,25 = 199,9$

Tabla 11

Micromoles/ml de enzima		0 min	15 min	30 min
Ácido graso libre	Referencia		65,01	60,37
	T. lanuginosa		77,61	74,71
	Transferasa nº 178-9		199,86	331,06
Éster de colesterol	Referencia		35,09	33,50
	T. lanuginosa		36,77	33,73
	Transf. nº178-9		119,29	252,15

30 A partir de los resultados de la Tabla 11 es posible calcular el cambio en la cantidad de ácido graso y de éster de colesterol producido por la enzima con respecto a la referencia como se muestra en la Tabla 12:

Tabla 12

Δ Micromoles/ml de enzima		0 min	15 min	30 min
Ácido graso libre	T. lanuginosus	0	12,593	14,340
	Transf. nº178-9	0	134,843	270,691
Éster de colesterol	T. lanuginosus	0	1,677	0,235
	Transf. nº178-9	0	84,196	218,652

35 La cantidad de ácido graso o de éster de colesterol producida en función del tiempo se muestra en la figura 53.

A partir de la pendiente de la curva se calculó la actividad hidrolítica (formación de FFA) y la actividad de lípido aciltransferasa (formación de éster de colesterol) en función del tiempo. La actividad de transferasa relativa (% de actividad de aciltransferasa) y la actividad hidrolítica relativa se calcularon a continuación como se muestra en la Tabla 13. La actividad de transferasa relativa se determinó utilizando el protocolo para la determinación del % de actividad de actividad de aciltransferasa como se describió anteriormente. Por ejemplo, el cálculo de la actividad relativa para el n° 178-9. La actividad total es la actividad de FFA + actividad de transferasa = $9,023 + 7,2884 = 16,311$ $\mu\text{moles/min/ml}$. Actividad relativa de transferasa = $7,2884 \times 100/16,311 = 44,7$, actividad hidrolítica relativa = $9,023 \times 100/16,311 = 55,3$.

Tabla 13

T. lanuginosus	Actividad de FFA	0,4780	$\mu\text{mol/min/ml}$
A. salmonicida #178-9	Actividad de FFA	9,0230	$\mu\text{mol/min/ml}$
T. lanuginosus	Actividad del éster de colesterol	0,0078	$\mu\text{mol/min/ml}$
A. salmonicida #178-9	Actividad del éster de colesterol	7,2884	$\mu\text{mol/min/ml}$
T. lanuginosus	Actividad de transferasa relativa	1,6	
A. salmonicida #178-9		44,7	
T. lanuginosus	Actividad hidrolítica relativa	98,4	
A. salmonicida #178-9		55,3	

Los resultados en la Tabla 13 confirmaron que la enzima transferasa de *A. salmonicida* tiene una actividad significativa de transferasa, pero los resultados confirmaron también que esta enzima tiene una actividad hidrolítica significativa. La lipasa procedente de *T. lanuginosus* principalmente tiene actividad hidrolítica y la actividad de transferasa relativa 1,6 no fue prueba de actividad de transferasa alguna pero se explicó por la incertidumbre de los análisis.

Conclusión

Se utilizó yema de huevo como sustrato para la medición de actividad de transferasa e hidrolasa de la lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* y de una lipasa procedente de *Thermomyces lanuginosus*. En las condiciones del ensayo hubo inicialmente una relación lineal entre el éster de colesterol y la formación de ácido graso libre y tiempo para la enzima lípido aciltransferasa. Basándose en esta relación lineal fue posible calcular la actividad hidrolítica (formación de FFA) y la actividad de transferasa (formación de éster de colesterol). Se calculó también la actividad hidrolítica relativa y de transferasa. La lípido aciltransferasa (en este caso una GCAT) de *Aeromonas salmonicida*, demostró casi igual actividad hidrolítica y de transferasa en estas condiciones de ensayo.

La lipasa de *Thermomyces lanuginosus* presentó muy poca actividad hidrolítica y la actividad de transferasa no fue significativa.

Ejemplo 11: Ensayo con transferasa en yema de huevo con alto contenido en agua

Introducción

Se aisló una lípido aciltransferasa según la presente invención de *Aeromonas salmonicida* y se expresó en *Bacillus subtilis*. Los experimentos iniciales han demostrado que esta enzima es muy eficaz en la transferencia de ácidos grasos desde la lecitina al colesterol utilizando yema de huevo como sustrato.

En los experimentos siguientes la reacción de la transferasa se estudió con más detalle utilizando yema de huevo como sustrato con atención especial a la concentración de agua en el sustrato.

Procedimiento

Materiales

Yema de huevo: Yema de huevo líquida pasteurizada de Danæg Products A/S, DK-4000 Roskilde.

Tampón HEPES, n° cat. H 3375 de Sigma

Cloroformo, calidad analítica

Escualeno, calidad analítica

Enzimas

n° 178-9 lípido aciltransferasa según la presente invención de *A. salmonicida*

n° 2427 Fosfolipasa A1 de *Fusarium oxysporum*. LIOPAN®F de Novozymes, DK (enzima lipolítica comparativa)

n° 1991 fosfolipasa A2 del páncreas, LIPOMOD 22L de Biocatalysts, U.K. (enzima lipolítica comparativa).

Ensayo enzimático con sustrato de yema de huevo

Se pesaron 5 gramos de yema de huevo líquida en un vaso Wheaton de 20 ml y se calentó a 35°C.

Se añadió agua y solución enzimática y se puso en marcha un cronómetro.

A intervalos regulares se transfirieron 0,5 g de muestras a un vaso Dram de 10 ml.

Se añadieron 20 µl de HCl 4 M para interrumpir la reacción enzimática y acidificar el jabón de ácido graso.

Se añadieron 3 ml de cloroformo y la muestra se mezcló en un mezclador Whirley durante 30 s.

Se centrifugó la muestra a 3.000 g durante 10 min y se transfirieron 0,8 ml de la fase cloroformo a un vaso Dram alquitranado. Se evaporó el cloroformo a 60°C bajo vapor de nitrógeno. El vaso Dram se pesa de nuevo.

Se analizan los lípidos aislados por GLC.

Análisis GLC

Un cromatógrafo de gases capilar Autosystem 9000 de Perkin Elmer equipado con una columna de sílice fundida WCOT de 12,5 m x 0,25 mm de DI x 5% de fenil-metilsilicona de 0,1 µ de espesor de película (CP Sil 8 CB de Chrompack).

Gas portador: helio

Inyector. Inyección dividida en frío inyección PSSI (temp. inicial 50°C calentada hasta 385°C), volumen 1,0 µl detector FID: 395°C

Programa en la estufa:	1	2	3
Temperatura de la estufa, °C	90	280	350
Isoterma, tiempo min.	1	0	10
Ritmo de temperatura, °C/min.	15	4	

Preparación de la muestra: Se disolvieron 30 mg de muestra en 9 ml de heptano:piridina, 2:1 que contenía el patrón interno heptadecano, 0,5 mg/ml. Se transfirieron 300 µl de la solución de la muestra a un vial con tapón hermético, se añadieron 300 µl de MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida) y se hicieron reaccionar durante 20 minutos a 60°C.

Cálculo: Se determinaron los factores de respuesta para mono-di-triglicéridos y ácidos grasos libres del Patrón 2 (mono-di-triglicéridos), en colesterol, palmitato de colesterol y estearato de colesterol y se determinaron los factores de respuesta del material de referencia puro (pesada del material puro 10 mg).

Resultados

Se utilizó yema de huevo que contenía 2% de escualeno como sustrato particularmente as reacciones. Se añadió escualeno como patrón interno para el análisis por GLC, para cuantificar los componentes lipídicos en la yema de huevo.

El experimento se montó como se muestra en la Tabla 14.

Tabla 14

		1	2	3	4	5	6	7	8
Sustrato, yema de huevo con 2% de escualeno	g	5	5	5	5	5	5	2,5	2,5
Transferasa n° 178-9, 14 PLU-7/ml	ml		0,25			0,25		0,13	
Solución de LIOPAN® F, 200 PLU-7/ml	ml			0,25					0,13
Fosfolipasa A2 n° 1991, 6300 PLU/ml	ml				0,25		0,25		
Agua	ml	0,25				3,8	3,8	8,75	8,75

Se tomaron muestras después de 30, 60 y 120 minutos y se analizaron según el procedimiento descrito anteriormente (0,5 ml (exp. 1-4) 0,86 ml (exp. 5-6) y 2,2 ml (exp. 7-8) se tomaron las muestras).

5 Los resultados del análisis GLC se muestran en la Tabla 15. Los resultados de GLC se expresaron en porcentaje del sustrato (yema de huevo). La tabla indica también el tiempo de reacción y la cantidad total de agua en la mezcla de reacción.

Tabla 15

Enzima	Tiempo de reacción minutos	% de agua en la reacción	GLC % de ácido graso	GLC % de colesterol	GLC % de éster de colesterol
Referencia	120	54	0,247	0,863	0,083
# 178	30	54	0,422	0,669	0,445
# 178	60	54	0,515	0,549	0,672
# 178	120	54	0,711	0,364	1,029
#2427	30	54	2,366	0,848	0,090
#2427	60	54	3,175	0,837	0,088
#2427	120	54	3,926	0,833	0,082
#1991	30	54	1,606	0,911	0,083
#1991	60	54	1,701	0,838	0,080
#1991	120	54	1,781	0,763	0,053
# 178	30	73	0,377	0,764	0,495
# 178	60	73	0,488	0,665	0,719
# 178	120	73	0,626	0,426	0,931
#2427	30	73	2,471	0,853	0,092
#2427	60	73	3,284	0,858	0,087
#2427	120	73	4,176	0,837	0,081
# 178	30	89	0,344	0,720	0,308
# 178	60	89	0,443	0,725	0,446
# 178	120	89	0,610	0,597	0,607
#2427	30	89	0,510	0,167	0,010
#2427	60	89	0,602	0,133	0,010
#2427	120	89	0,867	0,147	0,009

10 Basándose en los análisis de ácido graso, colesterol y éster de colesterol fue posible calcular la cantidad de ácido graso libre y éster de colesterol producida en función del tiempo de reacción y del contenido de agua. Basándose en estos resultados fue posible calcular la actividad enzimática total como la suma de la formación de ácido graso y la formación de éster de colesterol. La actividad hidrolítica relativa y la actividad de transferasa relativa (es decir, el % de actividad de aciltransferasa) se calcularon a continuación con los resultados presentados en la Tabla 16.

15 Los resultados en la Tabla 16, se analizaron también estadísticamente utilizando un Statgraphic Multifactor ANOVA. Los resultados estadísticos en la figura 54 confirman que la fosfolipasa A1, n° 2427 y la fosfolipasa A2, n° 1991 no tienen actividad de transferasa mientras que la transferasa n° 178-9 presentó casi el 50% de actividad de transferasa en estas condiciones analíticas.

20 El efecto del contenido de agua en el ensayo sobre la actividad de la transferasa n° 178 se analizó también estadísticamente como se muestra en la figura 55. Estos resultados indican que en el intervalo entre 54 y 89% de agua en el ensayo no existía ningún efecto fuerte del contenido de agua sobre la actividad de la transferasa relativa.

25 El impacto del tiempo de reacción de la actividad de la transferasa para la transferasa n° 178 se evaluó con los resultados mostrados en la Tabla 16 y figura 56. Los resultados en la figura 56 indican que la actividad relativa de la transferasa disminuye en función del tiempo de reacción. Esto puede explicarse por el hecho de que la mayor parte del receptor molecular de colesterol se consume y por consiguiente aumenta la actividad hidrolítica relativa. Los valores negativos para la reacción de transferasa para el n° 2427 solo indican que no hay actividad de transferasa dentro de la variación del método analítico.

Tabla 16

Enzima	Tiempo de reacción minutos	% de agua en mezcla de reacción	Ácido graso producido	Colesterol consumido	Éster de colesterol producido	Actividad hidrolítica %	% de actividad de transferasa
# 178	30	54	0,175	0,194	0,362	53	47
# 178	60	54	0,268	0,314	0,589	52	48
# 178	120	54	0,464	0,499	0,946	53	47
#2427	30	54	2,119	0,015	0,007	100	0
#2427	120	54	2,928	0,026	0,005	100	0
#2427	60	54	3,679	0,030	-0,001	100	0
#1991	30	54	1,359	-0,048	0,000	100	0
#1991	60	54	1,454	0,025	-0,003	100	0
#1991	120	54	1,534	0,100	-0,030	101	-1
# 178	30	73	0,130	0,099	0,412	42	58
# 178	60	73	0,241	0,198	0,636	47	53
#178	120	73	0,379	0,437	0,848	51	49
#2427	30	73	2,224	0,410	0,009	100	0
#2427	60	73	3,037	0,005	0,004	100	0
#2427	120	73	3,929	0,026	-0,002	100	0
# 178	30	89	0,097	0,143	0,225	50	50
# 178	60	89	0,196	0,138	0,363	56	44
# 178	120	89	0,363	0,266	0,524	62	38
#2427	30	89	0,263	0,696	-0,073	113	-13
#2427	60	89	0,355	0,730	-0,073	110	-10
#2427	120	89	0,620	0,716	-0,074	105	-5

Conclusión

5 La lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* se analizó en la yema de huevo como sustrato y con diferentes cantidades de contenido en agua. Esta enzima se comparó con las enzimas lipolíticas de referencia, es decir fosfolipasa A1 de *Fusarium oxysporum* y una fosfolipasa A2 del páncreas.

10 Los resultados han demostrado que solamente la transferasa catalizó la reacción de transferasa entre la lecitina y el colesterol durante la formación del éster de colesterol. Los resultados demostraron que en el intervalo entre el 54% y el 89% de agua en el sustrato la actividad relativa de la transferasa fue casi la misma que para la transferasa de *Aeromonas salmonicida*.

15 Ejemplo 12: "Ensayo de transferasa en sustrato tamponado" para la medición de la actividad de aciltransferasa (por ejemplo, para la utilización en un alimento que utiliza lecitina y colesterol)

20 Se aisló lípido aciltransferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* y se expresó en *Bacillus subtilis*. Esta enzima es muy eficaz para transferir los ácidos grasos de la lecitina al colesterol durante la formación de ésteres de colesterol. Se ha demostrado además que la enzima tiene alguna actividad hidrolítica, que se observa por la formación de ácido graso libre. Las fosfolipasas tradicionales (EC 3.1.1.4 y EC 3.1.1.32) tienen capacidad de hidrolizar lecitina durante la formación de los ácidos grasos libres y de lisolecitina, y no se han descrito reacciones de transferasa para estas enzimas.

25 Se detalla en la presente memoria un ensayo que puede medir la actividad tanto de transferasa como hidrolítica de las enzimas y de este modo identificar lípido aciltransferasas según la presente invención, el ensayo utiliza un sustrato que contiene lecitina y colesterol. En este trabajo se utilizó un sustrato a base de fosfatidilcolina y colesterol dispersado en un tampón. La cuantificación de los productos de reacción se hizo mediante extracción de los lípidos del sustrato seguido de análisis por GLC de los componentes lipídicos.

30 Procedimiento

Materiales

35 L-alfa-fosfatidilcolina al 95% (vegetal) Avanti n° 441601
 Colesterol: Cat.C 8503 de Sigma
 Palmitato de colesteroilo, Sigma C 6072
 Estearato de colesteroilo, Sigma C 3549
 Tampón HEPES, cat. n° H 3375 de Sigma
 40 Cloroformo, calidad analítica.

Enzimas

GCAT purificada de *A. salmonicida* n° 178-9

El análisis por TLC se realizó tal como se describe en el Ejemplo 6.

El análisis por GLC se realizó tal como se describe en el Ejemplo 11.

Resultados: ensayo de transferasa basado en fosfatidilcolina y colesterol como sustratos.

A continuación se determinó la actividad de transferasa de la transferasa en un sustrato a base de fosfatidilcolina y colesterol según el procedimiento siguiente.

450 mg de fosfatidilcolina (> 95% PC Avanti artículo n° 441601) y 50 mg de colesterol se disolvieron en cloroformo y se evaporó a sequedad al vacío. Se transfirieron 300 mg de la mezcla colesterol/fosfatidilcolina a un vaso Wheaton y se añadieron 15 ml de tampón HEPES 50 mM, pH 7. Se dispersó el lípido en el tampón durante la agitación.

Se calentó el sustrato a 35°C durante el mezclado con un agitador magnético y se añadieron 0,25 ml de enzima. Este es un medio abundante en agua con aproximadamente 95% de agua.

Se tomaron muestras de 2 ml después de 0, 5, 10, 15, 25 y 60 minutos de tiempo de reacción.

Inmediatamente se añadieron 25 µl de HCl 4 M para acidificar el ácido graso libre y se interrumpió la mezcla de reacción. Se añadieron 3,00 ml de cloroformo y la muestra se agitó intensamente en un Whirley durante 30 segundos. Se centrifugó la muestra y se aislaron 2 ml de la fase de cloroformo y se filtraron a través de filtros de 0,45 µm en un vaso Dram alquitranado de 10 ml. El cloroformo se evaporó bajo una corriente de nitrógeno a 60°C, y las muestras se pesaron de nuevo. Se analizó el lípido extractado por GLC.

Los resultados del análisis GLC se muestran en la Tabla 17. Los resultados se expresan en % calculado sobre el lípido extraído. La cantidad de ácido graso y éster de colesterol formado en función del tiempo se ilustra en la figura 57. Puede concluirse de la figura 57 que la reacción enzimática no es lineal en función del tiempo, porque se observa una actividad hidrolítica y de transferasa inicialmente fuerte. Después de aproximadamente 10 minutos y hasta aproximadamente 60 minutos la reacción presenta una respuesta casi lineal de formación de ácido graso y éster de colesterol en función del tiempo. Se decidió por tanto observar en la reacción enzimática en este intervalo de tiempo.

Tabla 17

Minutos	0	5	10	15	25	40	60
Colesterol, %	10,064	8,943	8,577	8,656	8,102	7,856	7,809
Colesterol ester, %	0,000	1,571	2,030	2,058	2,282	2,659	3,081
FFA total, %	0,260	1,197	1,239	1,466	2,445	2,943	3,940

A partir del conocimiento acerca de la cantidad de lípido en la mezcla de reacción y de la cantidad de enzima añadida fue posible calcular la formación de ácido graso y de éster de colesterol expresado en µmoles/ml de enzima (Tabla 18 y figura 58)

Tabla 18

Minutos	10	15	25	40	60
	µmol/ml	µmol/ml	µmol/ml	µmol/ml	µmol/ml
FFA total	58,1	68,7	114,6	138,0	184,7
Colesterol ester	88,8	90,0	99,3	115,6	133,8

A partir de los resultados de la Tabla 18 y de la pendiente de las curvas en la figura 58, fue posible calcular la cantidad de ácido graso y éster de colesterol en función del tiempo expresado en µmoles/min por ml de enzima.

El cálculo de la actividad hidrolítica y de la actividad de transferasa se presenta en la Tabla 19. La actividad relativa de la transferasa se determinó utilizando el protocolo para la determinación del % de actividad de aciltransferasa como se describe en la presente anteriormente.

Tabla 19

Actividad hidrolítica (ácido graso)	2,52	Pmol/min por ml de enzima
Actividad de transferasa (éster de colesterol)	0,94	Pmol/min por ml de enzima
Actividad total	3,45	Pmol/min por ml de enzima
Actividad relativa de transferasa	27,1	%
Actividad hidrolítica relativa	72,9	%

Identificación de otras enzimas por la actividad de transferasa

El procedimiento mencionado anteriormente se utilizó para identificar la transferasa y la actividad hidrolítica diferentes enzimas lipolíticas. Las enzimas se determinaron como se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20

		1	2	3	4	5
Sustrato	ml	15	15	15	15	15
Transferasa nº 178-9 de <i>A. salmonicida</i> 32 PLU-7/ml	ml	0,25				
Nº 3016 al 5%, LIOPAN® F (<i>F.oxysporum</i>)	ml		0,25			
<i>Thermomyces lanuginosus</i> al 5%	ml			0,25		
<i>Candida rugosa</i> nº 2983 al 5%	ml				0,25	
<i>Candida cylindracea</i> nº 3076 al 5%	ml					0,25

El sustrato que contiene 300 mg de fosfatidilcolina/colesterol dispersado en tampón HEPES 50 mM, pH 7,0, se calentó a 35°C con agitación. Se añadió solución enzimática y la muestra se mantuvo a 35°C en agitación. Se tomaron muestras a intervalos regulares y se extrajeron con cloroformo. Se analizaron los lípidos aislados por GLC con los resultados mostrados en la Tabla 21.

Tabla 21

Muestra								
1	Transferasa 178-9							
	minutos	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	2,516	2,983	2,62	2,894	3,448	3,911
	Colesterol	7,547	6,438	6,365	6,15	6,136	5,936	5,662
	Éster de colesterol	0	1,835	2,177	2,44	2,58	2,851	3,331
2	<i>Fusarium oxysporum</i> (LIOPAN® F)	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	1,345	1,796	1,95	2,487	2,424	2,977
	Colesterol	7,547	7,309	7,366	7,33	7,429	7,341	7,326
	Éster de colesterol	0	0,26	0,386	0,35	0,267	0,36	0,394
3	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	0,853	0,875	1	0,896	1,105	1,009
	Colesterol	7,547	7,384	7,639	7,63	7,675	7,603	7,529
	Éster de colesterol	0	0	0	0	0	0	0
4	<i>Candida rugosa</i> (nº 2938)	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	0,982	0,987	1,02	1,135	1,131	1,15
	Colesterol	7,547	7,438	7,656	7,66	7,638	7,575	7,585
	Éster de colesterol	0	0	0	0	0	0	0
5	<i>Candida cylindracea</i> nº 3076	0	5	10	15	25	40	60
	FFA	1,216	1,032	1,097	1,07	1,203	1,131	1,43
	Colesterol	7,547	7,502	7,425	7,65	7,619	7,502	7,411
	Éster de colesterol	0	0	0	0	0	0	0

A partir del análisis por GLC se observó que solamente la lipasa (178-9) produjo cantidad significativa de éster de colesterol y de ácidos grasos. La Fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* también proporcionó un aumento estacionario en el ácido graso libre pero solamente una formación inicial en pequeña cantidad de éster de colesterol se formó, pero no se observó ningún aumento del éster de colesterol en función del tiempo.

Basándose en el conocimiento de la cantidad del sustrato lipídico y de los análisis por GLC fue posible calcular la actividad relativa de la transferasa y la actividad hidrolítica relativa basadas en los resultados de 10 a 60 minutos de tiempo de reacción. Los resultados de la transferasa 178-9 y de la lipasa de *Fusarium oxysporum* se muestran en la Tabla 21. Las demás enzimas probadas no mostraron ninguna actividad.

Tabla 21

	Transferasa 178-9	<i>Fusarium oxysporum</i>
Actividad hidrolítica, micromoles/min. por ml de enzima	1,03	0,96
Actividad de transferasa, micromoles/min. por ml de enzima	0,40	0,01
Actividad total, micromoles/min. por ml de enzima	1,43	0,98
Actividad hidrolítica relativa	71,8	98,7
Actividad relativa de transferasa	28,2	1,3

5 Los resultados mostrados en la tabla 21 confirman una actividad de transferasa significativa procedente de la lípido aciltransferasa (muestra 178-9). Se observa además que la actividad relativa de transferasa está muy de acuerdo con la del experimento mencionado en la Tabla 19.

10 Una actividad de transferasa muy baja de la fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* se observó sin embargo. Este nivel de transferasa es tan bajo que está comprendido dentro de la incertidumbre del análisis. Como cabía esperar la fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* tiene una actividad hidrolítica significativa.

Conclusión

15 En lugar de yema de huevo (mostrada en el Ejemplo 11) se utilizó un sustrato artificial a base de fosfatidilcolina purificada y colesterol como sustrato para medir la actividad de la transferasa de *Aeromonas salmonicida*. Entre 10 minutos y 60 minutos de tiempo de reacción el ensayo proporcionó una formación casi lineal de ácidos grasos libres y de éster de colesterol en función del tiempo. Basándose en la actividad entre 10 y 60 minutos de tiempo de reacción se calculó la actividad hidrolítica y la actividad de transferasa.

20 La concentración de sustrato en este ensayo fue relativamente menor que en la yema de huevo, y la cantidad de agua en el ensayo fue relativamente mayor.

25 Basándose en los resultados del ensayo de la lípido aciltransferasa (en este caso una GCAT) de *Aeromonas salmonicida* en un sustrato artificial de fosfatidilcolina/colesterol en tampón se llega a la conclusión de que esta enzima presenta una actividad de transferasa muy buena también en un sistema con un contenido de agua muy alto.

30 Ambos ensayos basados en la yema de huevo (véase el Ejemplo 11) y fosfatidilcolina/colesterol en tampón (Ejemplo 12), pueden utilizarse para medir la actividad de transferasa e hidrolítica de las enzimas. Se prefiere la yema de huevo desde el punto de vista de que la actividad hidrolítica y de transferasa es lineal en función del tiempo, pero la fosfatidilcolina/colesterol en el tampón es solamente lineal dentro de un determinado límite de tiempo.

Ejemplo 13: Emulsiones alimenticias

35 Se ensayó el efecto de la yema de huevo líquida modificada por enzimas en una receta patrón de emulsión de alimento con 60% de aceite.

Los procedimientos normalizados y los materiales son como para los detallados en los ejemplos anteriores.

40 Se trató la yema de huevo con una lípido aciltransferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* n° 138 o fosfolipasa, es decir, una enzima Lipopan F® disponible en el comercio (Novozymes A/S, Dinamarca) (n° 2938) como se muestra en la Tabla 22.

Tabla 22. Tratamiento enzimático de la yema de huevo

		1	2	3	4
Yema de huevo, producto n° 1123 P2 de Sanofo	g	10	10	10	10
n° 138, 10 PLU/ml	MI	1	1		
n° 2938, 200 PLU/ml	MI			1	
Agua	MI				1
Tiempo de reacción	Minutos	210	360	210	210

45 El análisis por TLC de los lípidos de la yema de huevo procedentes de la yema de huevo tratada con enzima (Tabla 9) se muestra en las figuras 59 y 60.

50 En este experimento se aumentó la dosis de n° 2938 por un factor de 10 y esto dio una actividad muy evidente en la yema de huevo. La cantidad de ácido graso libre aumento de manera significativa y la lecitina (PC) se hidrolizó a lisolectina (LPC). La transferasa n° 138 proporcionó una reacción de transferasa clara debido a que el colesterol libre se convirtió en éster de colesterol y parte de la lecitina se convirtió en lisolectina.

Otro aspecto interesante de la modificación enzimática fue la consistencia del producto. La muestra tratada con fosfolipasa nº 2938 se volvió muy sólida, mientras que las muestras tratadas con la lipido aciltransferasa nº 138 mantuvo la misma consistencia que la muestra de referencia (véase la figura 61).

Estas yemas de huevo modificadas se ensayaron en una receta de Emulsión alimenticia mostrada en la Tabla 23.

Tabla 23. Mayonesa con yema de huevo modificada con enzima

	0	1a	2a	3a	4a
	%	%	%	%	%
Rapsolie	60	60	60	60	60
Yema de huevo, producto nº 1123P2 de Sanofi	2,8				
Yema de huevo nº 1 modificada con enzimas		2,8			
Yema de huevo nº 2 modificada con enzimas			2,8		
Yema de huevo nº 3 modificada con enzimas				2,8	
Yema de huevo nº 4 de referencia (sin tratar)					2,8
Agua	39	36,2	36,2	36,2	36,2
Vinagre, ácido acético al 10%	1	1	1	1	1

Se trataron las yemas de huevo 1 y 2 modificadas con la lipido aciltransferasa; y se modificó la yema de huevo 3 tratada con la fosfolipasa disponible en el comercio.

La emulsión alimenticia se produjo como una emulsión de aceite en agua según el siguiente procedimiento: se pesó la yema de huevo y el agua en un vaso de precipitado. Se pesó el aceite por separado.

Se sumergió en la fase acuosa un mezclador Turrax (20000 rpm). El aceite se bombeó a la fase acuosa a una velocidad constante de 2 minutos. El mezclado continuó durante 1 minuto más. El vinagre se añadió a continuación y se mezcló durante 5 segundos.

La estabilidad de la emulsión se determinó en una estufa a 100°C. Después de 2 horas a 100°C se evaluó la emulsión (véase la figura 62).

La estabilidad de la emulsión de la yema de huevo sin tratar fue muy buena en este experimento. El tratamiento de la yema de huevo con la lipido aciltransferasa nº 138 sin embargo mejoró la estabilidad porque la cantidad de separación de agua se redujo. La yema de huevo tratada con fosfolipasa nº 2938 proporcionó una emulsión muy inestable con casi separación completa de la fase de aceite y del agua a 100°C.

Se considera que en algunas aplicaciones de la utilización de las composiciones y procedimientos de la invención se puede proporcionar un aumento de la estabilidad térmica de las emulsiones, tal como aliños de ensalada de aceite en agua y similares. Esto es particularmente importante en las emulsiones de alimentos que están pasteurizadas para asegurar larga estabilidad al almacenaje y/o se calientan antes de servirlos, por ejemplo, en las comidas preparadas previamente para recalentamiento antes de servirlos (por ejemplo, comidas para microondas). Aunque no se desea estar ligado por ninguna teoría en particular, se considera que en algunas aplicaciones la acumulación de ácido graso libre puede ser perjudicial para la estabilidad térmica de dichas emulsiones. Debe reconocerse que el aumento de la estabilidad térmica de las emulsiones alimenticias producido utilizando los procedimientos de la invención puede no encontrarse o incluso ser deseable, en todas las aplicaciones alimenticias. Será evidente para un experto en la materia que las aplicaciones de dichas características son deseables, y que la estabilidad de las emulsiones puede determinarse fácilmente utilizando unas sencillas pruebas de calor, equivalentes a, por ejemplo pasteurización y/o recalentamiento por microondas. Los inventores han descubierto en una forma de realización preferida las emulsiones alimenticias obtenidas utilizando las enzimas de la invención han aumentado la estabilidad térmica.

Ejemplo 14: Reacción de transferasa en yema de huevo enriquecida con esteroles vegetales

La transferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* fue capaz de catalizar la formación de lisolecitina, monoglicérido y ésteres de esteroles vegetales en yema de huevo enriquecida con esteroles vegetales y glicerol. La misma enzima se probó además en un sistema con poco agua que contenía aceite de palma, lecitina, esteroles vegetales y glicerol mediante los análisis de TLC y GLC se demostró que el monoglicérido y los ésteres de esteroles vegetales se producían en estas condiciones de reacción.

Introducción

Se probó la actividad de transferasa en la transferasa de *Aeromonas salmonicida* en el sistema de lecitina, grasa, esteroles vegetales y glicerol casi exento de agua.

Materiales:

Yema de huevo: Yema de huevo líquida pasteurizada de Danæg Products A/S, DK-4000 Roskilde GCAT transferase purification 178-9, 32 PLU-7/ml (Journal 2254-100)

Lecitina de soja, Yolking de Aarhus United, Dinamarca.

Aceite de palma 43, de Aarhus United, Dinamarca.

L- α fosfatidilcolina al 95% vegetal (Avanti n° 441601)

Sitosterol, Sigma n° S5753

Esterol vegetal: Generol N122 de Cognis, Alemania.

Glicerol artículo n° 085915

Resultados

La identificación inicial de la actividad de transferasa en esteroles vegetal y glicerol se realizó en yema de huevo como se muestra en la Tabla 24.

Tabla 24

		1	2	3	4
Yema de huevo	gramos	1	1	1	1
Glicerol	gramos	0,1	0,1		
Sitosterol: ole 3:7				0,13	0,13
Transferasa n° 178-9	unidades	1		1	
Agua			*		*

*Agua correspondiente a la cantidad de agua en la solución enzimática = 83 μ l

Se mezclaron los ingredientes y se calentaron a 37°C y se mantuvo a esta temperatura durante la agitación con un agitador magnético.

Se tomaron muestras de 0,1 gramo después de 3 y 23 horas y se analizaron por TLC.

Los resultados del análisis TLC se muestran en la figura 63.

El resultado en la figura 63 indicó que tanto el colesterol como los esteroides vegetales estaban esterificados por la reacción con transferasa, correspondiente con la formación de lisolecitina (muestras 3 y 4) porque casi todo el esteroles libre y el colesterol se convirtieron en el éster correspondiente en la muestra 3.

Los resultados indicaban también que la muestra solo con glicerol y yema de huevo producía monoglicérido. La cantidad de monoglicérido necesita ser confirmada por análisis GLC. Cuando se añadió esteroles junto con glicerol (muestra 3) la cantidad de monoglicérido fue muy baja y no era detectable por TLC. Esto indicaba que con tal que exista exceso de esteroles o colesterol la reacción con transferasa que utiliza glicerol era modesta.

En otro experimento la enzima transferasa 178-9 se añadió a una mezcla de lecitina de soja, glicerol y esteroles vegetal para estudiar la actividad catalítica de la enzima en esta mezcla de reacción.

La composición de las mezclas de reacción en estos experimentos se presenta en la Tabla 25.

Tabla 25

		1	2	3	4	5	6
Lecitina de soja	g	1,875	2,25	1,875	2,5	3,5	3,5
Plantesterol; Generol N 122	g	0,225	0,225	0	0	0,225	0,5
Aceite de palma 43	g	2,675	2,25	2,8	2,125	1,062	0,831
Glicerol	g	0,225	0,275	0,325	0,375	0,248	0,238
Transferasa n° 178-9, 32 PLU/ml	ml	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

El experimento se realizó mezclando los componentes lipídicos durante agitación a 46°C. Se añadió la enzima y se sacaron muestras después de 4 y 24 horas.

Se analizaron las muestras por TLC como se muestra en la figura 64.

La muestra del experimento 2, 4 y 5 después de 24 horas de reacción se analizó también por GLC cuyos resultados se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26

		2	4	5
Glicerol	%	3,16	5,71	4,17
Ácidos grasos	%	4,23	5,36	6,67
Mono	%	2,24	3,87	3,92
Esterol	%	2,13		2,62
Éster de estero	%	2,89		2,14

Los resultados confirmaron que la transferasa 178-9 pudo catalizar la formación de ésteres de estero, vegetales y monoglicéridos de una mezcla de reacción que contiene lecitina de soja, glicerol y estero vegetal. Dicha mezcla de reacción pudo ser de interés para la utilización en la producción de margarina donde se necesita monoglicérido para sus propiedades de emulsificación y ésteres de estero vegetal para su efecto de reducción del colesterol.

Conclusión

La CGAT transferasa de *Aeromonas salmonicida* pudo catalizar la formación de ésteres de estero vegetales y de monoglicérido en la yema de huevo donde se añadió estero vegetal y glicerol. La misma enzima también catalizó la formación de ésteres de estero vegetal y monoglicérido en una mezcla de aceite de palma, lecitina, estero vegetal y glicerol. La enzima por lo tanto es de interés para la utilización en margarina y otros alimentos que contienen aceite donde se necesitan monoglicérido y lisolecitina para mejorar la emulsificación y el éster de estero vegetal para sus efectos de reducción del colesterol.

Ejemplo 15: Inmovilización de una lípido aciltransferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* y utilización en la síntesis de ésteres de estero

Una lípido aciltransferasa (en este caso una GCAT) procedente de *Aeromonas salmonicida* se inmovilizó en Celite por precipitación con acetona. Se agitaron lentamente 10 ml de solución enzimática en tampón TEA 20 mM pH 7 con 0,1 gramo de Celite 535 535 (de Fluka) durante 2 horas a temperatura ambiente.

Se añadieron 50 ml de acetona fría durante la agitación continuada.

El precipitado se aisló por centrifugación a 5.000 g durante 1 minuto.

El precipitado se lavó 2 veces con 20 ml de acetona fría.

Se probó el Celite a temperatura ambiente durante alrededor de 1 hora.

La transferasa inmovilizada se probó en una mezcla de aceite que contiene 13% de fosfatidilcolina y 7% de estero vegetal (Tabla 27).

Tabla 27

	%
Lecitina de Avanti	12,0
Esterol vegetal. Generol 122 N	6,6
Palm 43	71,4
Glicerol	5,0
Transferasa nº 178 inmovilizada, 45 U/g	2,0
Agua	3,0

Se calentó lecitina, estero vegetal y aceite de soja a 46°C y se disolvió el estero vegetal. Se añadió transferasa inmovilizada.

La reacción de la transferasa continuó a 46°C durante agitación suave con un agitador magnético. Se tomaron muestras para análisis después de 1/2, 1, 3, 6 y 24 horas y se analizaron por TLC. Se interrumpió la reacción después de 24 horas de reacción y se filtró la enzima inmovilizada.

Se analizaron las muestras por TLC como se muestra en la figura 65.

El análisis por TLC presenta claramente el efecto de la transferasa inmovilizada procedente de *A. salmonicida* en la transformación del colesterol en éster de colesterol. Se observó también que se forma una pequeña cantidad de monoglicérido. La enzima se había demostrado también que posee una actividad elevada en medios acuosos con alto contenido en agua (6-89%), la utilización de la transferasa y otras transferasas mediante la utilización en la invención puede por consiguiente utilizarse también en aplicaciones enzimáticas inmovilizadas con un significativo

contenido de agua. Esto permite la sustitución de los disolventes utilizados por las lipasas inmovilizadas actuales en la bioconversión de lípidos que utilizan transferasas.

Ejemplo 16. La transferasa de *Aeromonas hydrophila* puede transferir desde un fosfolípido hasta un estero para formar un éster de estero y/o una molécula de azúcar para formar un éster de azúcar

Una lipido aciltransferasa procedente de *Aeromonas hydrophila* expresada en *E. coli* (Hydro 0303 HVP) marcada nº 139 se purificó en una Sefarosa Quelante FF, HR2.5/10 columna y se analizó la actividad de fosfolipasa. La actividad de transferasa se evaluó en la yema de huevo para la actividad enzimática y funcionalidad en la yema de huevo. La enzima se probó también en la yema de huevo que contiene glucosa.

Actividad de fosfolipasa

La transferasa nº 139 aislada de una columna HR 2,5/10 de Sefarosa Quelante FF se ensayó por NEFA/PLU (pH 7). La actividad fue de 1,15 unidades de NEFA/PLU/ml.

Yema de huevo

En una aplicación inicial la transferasa nº 139 de ensayo se probó en la yema de huevo según el siguiente procedimiento.

Se pesó 1 gramo de yema de huevo fresca en un matraz de 10 ml con tapa de rosca. Se añadió la preparación enzimática y se mezcló en un mezclador Vortex. Se colocó la muestra a 37°C y se agitó con un agitador magnético.

La reacción se interrumpió añadiendo 7,5 ml de cloroformo:etanol (2:1) y se mezcló en un mezclador Whirley durante 30 segundos. Se aisló por centrifugación la fase de cloroformo y se transfirieron 2 µl de la fase de cloroformo a una placa TLC de sílice preactivada y se eluyó con tampón nº I corriente y otra placa TLC en tampón IV corriente.

El montaje experimental se presenta en la Tabla 28.

Tabla 28

Ensayo nº	Tiempo de reacción min.	Yema de huevo g	Transferasa nº 139 unidades
1	10	1	
2	10	1	0,75 NEFA-PLU
3	60	1	0,75 NEFA-PLU
4	300	1	0,75 NEFA-PLU
5	1200	1	
6	1200	1	0,75 NEFA-PLU

El análisis por TLC se muestra en la figura 66 y en la figura 67. El análisis por TLC demuestra claramente la reacción con transferasa de la transferasa nº 139. El colesterol se convierte en éster de colesterol y la cantidad de lecitina se reduce. Estos resultados indican sin embargo además que la lisolecitina se acumula solamente en muy pequeña cantidad porque la transferasa nº 139 es también activa en la lisolecitina. Esta observación está apoyada por la formación de ácidos grasos libres (FFA).

Yema de huevo y glucosa

Se demostró al principio que una transferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* (nº 138) podía utilizar glucosa como molécula receptora en una reacción con transferasa. Se ha probado también si la transferasa nº 139 puede utilizar glucosa como molécula receptora. El montaje experimental se observa en la Tabla 29.

Tabla 29

Ensayo nº	Tiempo de reacción Minutos	Yema de huevo g	Glucosa, 70% mg	Transferasa nº 139 units
1	10	1	500	
2	10	1	500	1 NEFA-PLU
3	60	1	500	1 NEFA-PLU
4	180	1	500	1 NEFA-PLU
5	300	1	500	1 NEFA-PLU
6	1200	1	500	1 NEFA-PLU
7	1200	1	500	

Los productos de la reacción se analizaron por TLC (figura 68 y figura 69).

El análisis por TLC indica la formación de éster de glucosa después de 220 min de tiempo de reacción (figura 69 banda 6) pero después de 1.200 min de tiempo de reacción no se aprecia éster de glucosa.

Debe concluirse por consiguiente que la transferasa nº 139 presenta actividad tanto de transferasa como hidrolítica. Esto está también apoyado por el hecho de que la cantidad de ácidos grasos libres aumenta regularmente en función del tiempo de reacción.

Resumen

La transferasa procedente de *Aeromonas hydrophila* se probó en la yema de huevo. Los resultados confirman que esta enzima cataliza la formación de éster de colesterol correspondiente con la formación de lisolecitina. Después de un tiempo de reacción prolongado cuando la mayor parte del colesterol se consume se forman también ácidos grasos. Por consiguiente puede concluirse que la enzima tiene actividad primaria de transferasa pero también se observó actividad hidrolítica cuando estaba disponible solo agua como molécula donante.

En un experimento con yema de huevo y glucosa se ha observado que la transferasa de *Aeromonas hydrophila* puede catalizar la formación de éster de glucosa *in situ* en un medio alimenticio con alto contenido en agua (figura 70).

Ejemplo 17: Variantes de una lípido aciltransferasa procedente de *Aeromonas hydrophila* (Ahyd2) (SEC. ID. nº 36 (véase la figura 71))

Se introdujeron mutaciones utilizando el kit QuikChange® de mutagénesis dirigida a varios sitios, La Jolla, CA 92037, USA siguiendo las instrucciones proporcionadas por Stratagene.

Las variantes en Tyr256 presentaban un aumento de actividad para con los fosfolípidos.

Las variantes en Tyr256 y Tyr260 presentaban un aumento de actividad para con los galactolípidos.

Las variantes en Tyr265 presentan un aumento de actividad de transferasa con los galactolípidos como el donante de acilo.

Los números indican posiciones en la secuencia siguiente: Una enzima procedente de la secuencia de aminoácidos de *Aeromonas hydrophila* de la que presenta como SEC. ID. nº 36 en la figura 71 (los aminoácidos subrayados muestran un péptido señal de xilanas). La secuencia nucleotídica es tal como muestra la SEC. ID. nº 54 en la FIGURA 72.

Ejemplo 18: Utilización de la reacción de acil-transferasa para la producción de un éster de estero vegetal y monoglicérido para la producción de margarina

Se probó una aciltransferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* presentada en *Bacillus subtilis* en una muestra de aceite de palma que contiene lecitina vegetal, estero vegetal y glicerol. La aciltransferasa presentaba capacidad para utilizar tanto estero vegetal como glicerol como moléculas receptoras durante la producción de un éster de estero vegetal y monoglicérido. La mezcla de reacción se utilizó para producir margarina de mesa de buena calidad basándose en el monoglicérido en la mezcla de reacción y al mismo tiempo la margarina se enriqueció con éster de estero vegetal, que se ha demostrado que tiene un efecto reductor de colesterol.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la probabilidad de producir monoglicérido y éster de estero vegetal por reacción enzimática de la lecitina, estero vegetal y glicerol disueltos en grasa vegetal.

Los experimentos iniciales han demostrado que era posible utilizar aciltransferasa procedente de *Aeromonas salmonicida* para producir monoglicérido y éster de estero vegetal procedente de de la lecitina, glicerol y estero vegetal.

En este experimento dicha mezcla de reacción se utilizó para producir margarina de mesa.

Materiales

Lípido aciltransferasa procedente de *Aeromonas salmonicida*, nº 196 C101, 18.6 PLU/g (Journal 2254-104)

Aceite de palma 43 de Aarhus United, DK
L-α fosfatidilcolina al 95% vegetal (Avanti nº 441601)
Estero vegetal: Generol N122 de Cognis, Alemania
Glicerol artículo nº 085915

Monoglicérido destilado, Dimodan HP de Danisco.

Producción de margarina

- 5 1. Se mezclan los ingredientes de la fase acuosa. (Si se requiere se pasteuriza la fase acuosa calentando a aprox. 80°C). Se ajusta el pH a 5,5.
2. Se derrite la fase grasa y se temple a aprox. 40-45°C.
- 10 3. Se calienta el emulsionante con algo de aceite en una proporción de una parte de emulsionante a 5 partes de aceite a una temperatura (75-80°C), que es de 5 a 10°C mayor que el punto de fusión del emulsionante. Cuando esta mezcla está totalmente derretida y bien agitada, se añade al aceite caliente restante, agitando continuamente.
- 15 4. Se añade el aromatizante.
5. Se añade la fase acuosa a la fase grasa agitando continuamente.
- 20 6. Se enfría en un refrigerante de tubos (capacidad normal, enfriamiento normal) hasta una temperatura externa entre 8 y 10°C.

Resultados

25 Se probó aciltransferasa procedente de *A. salmonicida* en una mezcla de aceite de palma como se muestra en la Tabla 30. La lecitina, estero vegetal, glicerol y aceite de palma se calentó a 60°C durante agitación para disolver el estero vegetal y la lecitina.

Tabla 30

Sustrato	%
Lecitina de Avanti	12
Esterol vegetal, Generol 122 N	6,6
Aceite de palma, punto de fusión 43	76,4
Glicerol	5

30 Se enfrió el sustrato a 48°C y se añadió aciltransferasa nº 196 en la cantidad mostrada en la Tabla 31. La mezcla de reacción se mantuvo a 48°C durante 24 horas en agitación lenta.

Tabla 31

Sustrato	gramos
Transferasa nº 196 C101, 18,6	220
PLU/g	15

40 Se tomaron muestras de la mezcla de reacción después de 1, 4 y 24 horas de tiempo de reacción y se analizaron por TLC en disolvente I (figura 73). Los resultados de TLC muestran claramente la formación del éster de estero vegetal y monoglicérido. En la figura 73, la primera banda es después de 1 hora de tiempo de reacción, la banda 2 es de 4 horas de tiempo de reacción, la banda 3 es de 24 horas de tiempo de reacción y la banda 4 es un estero vegetal.

45 La reacción se interrumpió después de 24 horas de tiempo de reacción y los residuos del estero vegetal no disuelto se eliminaron y la solución transparente se utilizó para producir margarina.

Margarina

50 La mezcla de reacción que contiene monoglicérido y éster de estero vegetal se utilizó para producir margarina de mesa según la receta mostrada en la Tabla 32

Tabla 32

Jour. nº 3734	1	2
Fase acuosa		
Fase acuosa	16	16
Sal	0,5	0,5
Crema de leche en polvo	1	1

Sorbato potásico	0,1	0,1
EDTA	0,015	0,015
pH	5,5	5,5
Fase acuosa total	16,6	16,6
Fase grasa		
Palma 43	25	25
Aceite de colza	75	75
Fase grasa total	83,2	78,4
Dimodan HP	0,2	
Mezcla de reacción		5

La margarina producida de la mezcla de reacción fue evaluada de buena calidad con buena extensibilidad y buen paladar y sin falta de sabor. La margarina fue comparada en un nivel de calidad haciendo referencia a la margarina producida utilizando monoglicérido destilado Dimodan HP.

La única diferencia observada fue que la margarina jour. 3734 nº 2 con la mezcla de reacción fue ligeramente más consistente, lo que se explicó por el hecho de que esta receta contenía más Palm 43 que la margarina de referencia.

Ejemplo 19: Utilización de una lipasa aciltransferasa durante la producción de pan

Una de las limitaciones de utilizar lipasas en la elaboración del pan es que se forma ácido graso libre durante la reacción de la lipasa. Es bien sabido que la formación de demasiado ácido graso libre tendrá un impacto negativo en el rendimiento de la cocción de la harina porque el gluten da también rigidez y se forma una masa esponjosa (es decir menos elástica) que no puede expandirse durante la fermentación y la cocción.

La formación del ácido graso libre debería evitarse también desde el punto de estabilidad oxidativa, porque los ácidos grasos libres son más propensos a la oxidación de los lípidos que el triglicérido correspondiente.

En la presente invención los problemas de formación de ácidos grasos libres al añadir una enzima lipolítica a una masa se ha superado utilizando una lipasa aciltransferasa que, en lugar de producir ácidos grasos libres, transfiere uno o más ácidos grasos desde el donante de lípidoacilo a una molécula receptora sin agua presente en la masa, tal como un carbohidrato, una proteína o un péptido, o si se utiliza en el pan con grasa de leche, un esteroide, alternativamente o combinado con otros receptores listados anteriormente puede añadirse a la masa, por ejemplo fitosteroles o fitostanoles. Preferentemente, la molécula receptora en una masa puede ser una o más de entre glucosa, sacarosa o maltosa y/o otros carbohidratos normalmente disponibles en una masa.

En los experimentos siguientes se prueba la aciltransferasa en experimentos de cocción a miniescala. La formación de productos de reacción, y los componentes lipídicos en la masa totalmente probada se extrae mediante butanol saturado en agua y se analiza por análisis de HPLC y GLC.

Materiales y procedimientos

Enzimas

Aciltransferasa, 550 PLU-7/ml

LipopanTM F BG, lipasa comercial de Novozymes, 12000 LIPU/g o Grindamyl Exel 16. 12000 LIPU/g.

Lecitina en polvo, 95% de fosfolípidos (disponible en Danisco A/S, Dinamarca)

Digalactosil diglicérido de harina de trigo integral (de Sigma D4651)

Harina: Sølvmeel nº 2001084 (harina de trigo Danish adquirida en Havnemøllerne, Odense, Dinamarca)

Prueba de minicocción

50 gramos de harina, 10 gramos de levadura anhidra, 0,8 gramos de glucosa, 0,8 gramos de sal, 70 ppm de ácido ascórbico y 400 unidades Brabender de agua se amasaron en un recipiente de mezclador Brabender de 50 g durante 5 min a 30°C.

El tiempo restante fue de 10 min. a 34°C. Se pesaron 15 gramos de masa. A continuación se moldeó en un dispositivo especial donde la masa se amasa con rodillos en una placa de madera y un marco de plexiglás. Las masas se enlataron herméticamente durante 45 min a 34°C y se cocieron en un horno doméstico Voss 8 min. a 225°C.

Después de la cocción se enfrían los panes a temperatura ambiente y después de 20 min. se pesan los panes y se determina el volumen por el método del desplazamiento de la semilla de colza. Se cortan además los panes y se evalúa la miga y la corteza.

5 Resultados y conclusión

Los resultados preliminares indican que la lipasa aciltransferasa demuestra claramente un efecto positivo tanto en el volumen del pan como en el aspecto del pan. En particular, los resultados preliminares indican que la lipasa aciltransferasa produce un aumento del volumen de pan específico en comparación con el obtenido con la referencia (sin enzima) y con el obtenido con la utilización de una enzima lipolítica disponible en el comercio, es decir Grindamyl Exel 16 o Lipopan FTM.

Ejemplo 20: Helado convencional con grasa de leche

La función de los emulsionantes utilizados en el helado es efectuar la cristalización controlada de la grasa y la desestabilización suave debido a la desorción de las proteínas durante el envejecimiento del helado. Este cambio mejora la calidad del helado. Los monodiglicéridos se utilizan normalmente para la producción del helado pero se sabe también utilizar emulsionantes polares como los polisorbatos y los ésteres de azúcar en la producción de helados combinados con monodiglicéridos para facilitar la desestabilización controlada de la grasa y producir helados con muy buena cremosidad y textura suave en la boca.

Los emulsionantes utilizados para helados se añaden normalmente a la mezcla de helados en polvo. Recientemente se ha demostrado sin embargo que pueden producirse monodiglicéridos por acción enzimática de la lipasa en la receta del helado utilizando lipasas. El problema de utilizar lipasas es sin embargo que las lipasas también catalizan la formación de ácidos grasos libres cuando el agua está disponible en la mezcla de reacción.

Se ha demostrado sin embargo sorprendentemente que la lipasa aciltransferasa supera la limitación por lipasa porque la aciltransferasa puede transferir ácido graso desde la lecitina y otros lípidos desde las moléculas receptoras como esteroles, colesterol, glucosa, glicerol y proteínas/péptidos sin la formación de una cantidad significativa de ácidos grasos libres.

Uno de los principales ingredientes en el helado es la crema de la leche que contiene 38% de grasa de leche. La crema de la leche contiene también cantidades mas pequeñas de lecitina que es una molécula donante para la aciltransferasa ("los lípidos complejos de la leche totalizan aproximadamente el 1% de la grasa total de la leche y están compuestos principalmente por fosfolípidos". Ref. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry Copyright[®] 2003 por Wiley VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.). La crema de la leche contiene también pequeñas cantidades de colesterol que es una molécula receptora de aciltransferasa.

A partir de los constituyentes del helado es posible de este modo producir tanto monoglicéridos como emulsionantes polares como liolecitina y éster de azúcar, que son conocidos por sus efectos beneficiosos en la producción de helados.

Un efecto beneficioso adicional de la reacción de la aciltransferasa en la crema de la leche es la formación del éster de colesterol, que puede rebajar la absorción del colesterol en el intestino.

Receta de helado

	Con emulsionante	Con enzima
Crema de leche, 38%	23,65	23,65
Leche descremada	53,30	53,30
Leche descremada en polvo	4,90	11,30
Azúcar	12,00	12,00
Jarabe de glucosa, DE 42, 75% TS	4,25	4,25
Glicerol	1,0	1,0
Mezcla estabilizante	0,2	0,2
Cremodan SE 30	0,6	
Lípido aciltransferasa, 500 PLU/g		0,1
Levadura Grindsted 2976	0,1	0,1
Color	+	+

Procedimiento de producción de helados

1. Se calienta crema de leche, jarabe de glucosa y glicerol a aprox. 40°C. Se añade la lipasa aciltransferasa y se deja accionar la mezcla durante 30 minutos. Se toma una muestra para análisis.
2. Se calientan todos los demás ingredientes líquidos a aprox. 40°C.

3. Se añaden los demás ingredientes secos. (la mezcla estabilizante se mezcla con azúcar antes de la adición).
4. Cuando los ingredientes secos están disueltos se añade la mezcla de crema de leche-glucosa
5. Se pasteuriza entre 80 a 85°C/20 a 40 segundos.
6. Se homogeneiza a 80°C (190 bares para la receta 1 y 175 bares para la receta 2)
7. Se enfría a la temperatura de envejecimiento, 4°C
8. Se congela en un congelador continuo para la sobreproducción deseada (recomendada del 100%)
9. Se endurece en un túnel a -40°C.
10. Se almacena por debajo de -25°C

Resultados

Las utilidades de aciltransferasa en la producción de helados contribuyen a la producción de helados con muy buen sabor y excelente sensación cremosa en el paladar comparable a los helados producidos utilizando un emulsionante comercial Cremodan Se 30. El derretido del helado producido por la lipido aciltransferasa mejora también.

Ejemplo 21: Aciltransferasa en quesos

El queso es el producto sólido o semisólido, fresco o madurado obtenido por coagulación de la leche, leche descremada, leche parcialmente descremada, crema, crema de suero o mantequilla, o por cualquier combinación de estos materiales, mediante la acción del cuajo o de otros agentes coagulantes adecuados y drenando parcialmente el suero lo que produce dicha coagulación.

El rendimiento en queso depende principalmente de los contenidos en grasa y proteína de la leche. La sal (particularmente sales de calcio) y las concentraciones de proteínas, así como la acidez, son muy importantes para la coagulación (ref. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry Copyright® 2003 por Wiley VCH Verlag GmbH & Co).

Dichos esfuerzos se han hecho para optimizar y aumentar el rendimiento en queso mediante la optimización del procedimiento de elaboración del queso (patente US nº 4.959.229) o utilizando el procedimiento mejorado de coagulación (patente US nº 4.581.240), que aumenta la cantidad de proteína del suero en el requesón.

En la presente invención la cantidad de proteínas del suero en el requesón aumenta por modificación enzimática de la proteína del suero por tratamiento de la leche durante la elaboración del queso con una lipido aciltransferasa.

Cuando un ácido graso está unido por enlace covalente a una proteína no membranaria como la β -lactoglobulina, las propiedades físicas y funcionales cambiarán drásticamente.

Para la producción de queso de la presente invención se añade aciltransferasa a la leche antes o al mismo tiempo que se añade el cuajo a la leche.

Durante la precipitación con caseína la aciltransferasa puede utilizar lecitina y otros lípidos en la leche como donante y péptidos o proteínas como molécula receptora durante la formación de la proteína acilada o de los péptidos acilados.

El cambio en las propiedades hidrófobas de la proteína de la leche contribuye a aumentar la precipitación de proteínas en el requesón durante la producción de queso.

Dado el aumento en el rendimiento en queso obtenido por la presente invención se origina a partir del aumento de retención en el coágulo de queso de las proteínas que se pierden normalmente en el suero, un procedimiento adecuado, directamente relacionado con el mecanismo de la invención, se basa en la determinación de la cantidad de proteína que acaba en el suero. Menor proteína en el suero significa necesariamente más proteína en el requesón y mayor rendimiento en queso.

El ensayo de la cantidad de proteína en electroforesis suero puede realizarse de la siguiente manera. Leche descremada o completa se calienta a una temperatura adecuada para la coagulación con cuajo, por lo general de 30 a 35°C en un vaso de precipitados de 100 ml. Opcionalmente se añade 1% de una bacteria iniciadora de ácido

láctico en su mayor parte, y se añade cuajo normal en una cantidad correspondiente a por ejemplo, 0,03 a 0,05%. Cuando la leche se ha convertido en un coágulo sólido suficiente para permitir que se pueda cortar en pequeños cubos con una hoja de aproximadamente 0,05 cm de longitud, dicho corte se realiza con un cuchillo afilado. Se inicia de este modo la sinéresis y después de 30 minutos de período de espera, lo que permite sedimentar el requesón, se extrae una muestra de suero, y se centrifuga en una centrifugadora de laboratorio durante 10 min. En esta muestra se analiza el contenido de proteínas, utilizando por ejemplo el método Kjeldahl. Alternativamente, y/o como complemento, la muestra puede analizarse por procedimientos que permiten establecer el tipo y cantidad de los componentes proteicos individuales.

Ejemplo 22 "Ensayo en medio con poco agua"

Reacciones con transferasa de enzimas lipolíticas en un medio con poco agua.

Procedimiento

Materiales

Colesterol Sigma cat. C 8503
L-alfa-fosfatidilcolina al 95% (vegetal) Aventi n° 441601
Aceite de soja, Aarhus United, DK
Cloroformo, calidad analítica

Enzimas

N° 179, GCAT de *A. salmonicida*
N° 2427, fosfolipasa A1 de *Fusarium oxysporum*, LIPOPAN® F de Novozymes, Dinamarca
N° 1991, fosfolipasa A2 del páncreas, LIPOMOD 22L de Biocatalysts, UK
N° 2373, lipasa de *Candida antarctica*, Novozyme 525 L de Novozymes, Dinamarca.

Análisis enzimático

Se disolvieron 13,1% de lecitina y 6,6% de colesterol en aceite de soja calentando a 60°C durante la agitación.

Se pesó el sustrato en un vaso de Wheaton de 20 ml y se calentó a 46°C

Se añadió agua y la solución enzimática y se puso en marcha un cronómetro.

A intervalos regulares se transfirieron muestras de 50 mg a un vaso Dram de 10 ml y se congelaron.

Los lípidos aislados se analizaron por GLC.

Análisis de GLC

El análisis de GLC se realizó tal como se describe en el Ejemplo 11.

Resultados

El experimento se efectuó como se muestra en la Tabla 33.

El sustrato a base de aceite de soja que contenía 13,1% de lecitina y 6,6% de colesterol se calentó a 46°C. La solución enzimática se añadió y se puso en marcha un cronómetro.

Después de 30, 60 y 120 minutos de tiempo de reacción se tomaron muestras para el análisis por GLC.

Tabla 33

	1	2	3	4	5
Sustrato	5	5	5	5	5
Transferasa n° 179-C72, 56 PLU-7/ml		0,3			
N° 2427, 200 PLU-7/ml			0,3		
Páncreas PLA2 n° 1991 6300 PLU/ml				0,3	
Novozymes 525 L, n° 2373, 200 LIPU/ml					0,3
Agua	0,3				
% de agua	6	6	6	6	6

Los resultados del análisis de GLC se muestran en la Tabla 34. Los resultados están expresados en tanto por ciento referidos a la composición total de la muestra. Basándose en los resultados de la GLC fue posible calcular la cantidad de ácidos grasos y de éster de colesterol producida por la reacción enzimática correspondiente a la muestra de referencia sin enzima añadida. En estas condiciones experimentales la actividad enzimática total se estimó como la actividad hidrolítica medida como la formación de ácido graso libre y la actividad de transferasa estimada como formación éster de colesterol. A partir de estos resultados y de la información acerca del peso molecular del ácido graso y del éster de colesterol fue posible calcular la actividad hidrolítica molar relativa y la actividad de transferasa molar relativa como se muestra en la Tabla 35.

Tabla 34

Control enzimático	Tiempo de reacción, minutos	Ácido graso, %	Colesterol, %	Éster de colesterol, %
Control	120	0,533	7,094	0,000
#179	30	0,770	5,761	2,229
#179	60	0,852	5,369	2,883
#179	120	0,876	4,900	3,667
#2427	30	3,269	7,094	0,000
#2427	60	3,420	7,094	0,000
#2427	120	3,710	7,094	0,000
#1991	30	2,871	7,094	0,000
#1991	60	3,578	7,094	0,000
#1991	120	3,928	7,094	0,000
#2373	30	1,418	7,094	0,000
#2373	60	1,421	7,094	0,000
#2373	120	1,915	7,094	0,000

Tabla 35

Enzima	Tiempo de reacción, minutos	Ácido graso producido	Colesterol utilizado	Éster de colesterol producido	Actividad hidrolítica, %	Actividad de transferasa, %
#179	30	0,238	1,334	2,229	20	80
#179	60	0,319	1,725	2,883	21	79
#179	120	0,343	2,195	3,667	18	82
#2427	30	2,737	0,000	0,000	100	0
#2427	60	2,887	0,000	0,000	100	0
#2427	120	3,177	0,000	0,000	100	0
#1991	30	2,338	0,000	0,000	100	0
#1991	60	3,046	0,000	0,000	100	0
#1991	120	3,395	0,000	0,000	100	0
#2373	30	0,885	0,000	0,000	100	0
#2373	60	0,888	0,000	0,000	100	0
#2373	120	1,383	0,000	0,000	100	0

Conclusión

En estos experimentos se observó que todas las enzimas probadas presentaban actividad hidrolítica debido a la cantidad aumentada de ácido graso. Sin embargo la única enzima que presentaba actividad de transferasa fue GCAT de *A. salmonicida*. Se concluye por consiguiente que el único sistema con lecitina y colesterol que contiene 6% de fosfolipasa A1 en agua de *Fusarium oxysporum*, la fosfolipasa A2 del páncreas y la lipasa de *Candida antarctica* únicamente presentaron actividad hidrolítica.

REIVINDICACIONES

1. Utilización de una lípido aciltransferasa para preparar a partir de un material alimenticio que contiene agua que comprende agua al 10-98% un producto de masa o un producto horneado que comprende un emulsionante, en la que el emulsionante es generado a partir de constituyentes del material alimenticio por la lípido aciltransferasa,

en la que la lípido aciltransferasa es una que cuando es sometida a prueba utilizando el ensayo de transferasa en sustrato tamponado presenta una actividad de aciltransferasa de por lo menos 2%; comprendiendo dicho ensayo de transferasa las etapas que consisten en:

- i) disolver 450 mg de fosfatidilcolina y 50 mg de colesterol en cloroformo, evaporar hasta sequedad al vacío;
- ii) transferir 300 mg de la mezcla de colesterol/fosfatidilcolina a un vaso Wheaton, añadir 15 ml de tampón HEPES 50mM pH 7 y dispersar el lípido en el tampón durante la agitación;
- iii) calentar el sustrato hasta 35°C durante la mezcla con un agitador magnético y añadir 0,25 ml de solución enzimática;
- iv) tomar muestras de 2 ml en el tiempo de reacción de 0, 5, 10, 15, 25, 40 y 60 minutos e interrumpir inmediatamente la reacción enzimática mediante la adición de 25 µl de HCl 4M para acidificar el ácido graso libre;
- v) añadir 3 ml de cloroformo y agitar vigorosamente durante 30 segundos, centrifugar y aislar 2 ml de la fase de cloroformo, filtrar a través de un filtro de 0,45 µl en un vaso Dram alquitranado de 10 ml;
- vi) evaporar el cloroformo bajo una corriente de nitrógeno a 60°C, y pesar las muestras;
- vii) analizar el lípido extraído mediante GLC.

2. Utilización según la reivindicación 1, en la que el producto de masa o el producto horneado es un pan, un producto frito, un aperitivo, pasteles, tortas, bizcochos de chocolate y nueces, pastas de té, fideos, artículos de aperitivo o pasta.

3. Utilización según la reivindicación 1 ó 2, en la que el producto de masa o el producto horneado es un pan.

4. Utilización según las reivindicaciones 1 a 3, en la que se producen por lo menos dos emulsionantes.

5. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que por lo menos uno de los emulsionantes es un éster de carbohidrato.

6. Utilización según la reivindicación 4, en la que por lo menos uno de los emulsionantes es un éster de proteína.

7. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que uno o más de entre un éster de esteroide o un éster de estanol o un éster de proteína o un éster de carbohidrato o un diglicérido o un monoglicérido se produce asimismo *in situ* en el alimento.

8. Utilización según la reivindicación 7, en la que el éster de esteroide es uno o más de entre éster de alfa-sitosterol, éster de beta-sitosterol, éster de estigmasterol, éster de ergosterol, éster de campesterol o éster de colesterol.

9. Utilización según la reivindicación 8, en la que el éster de estanol es uno o más beta-sitostanol o ss-sitostanol.

10. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la lípido aciltransferasa es una que cuando es sometida a prueba utilizando el ensayo de transferasa en yema de huevo con alto contenido de agua en una yema de huevo con 54% de agua, presenta hasta 10% de actividad de transferasa relativa; comprendiendo dicho ensayo de transferasa las etapas que consisten en:

- i) pesar 5 gramos de sustrato de yema de huevo líquida en un vaso Wheaton de 20 ml y calentar a 35°C;
- ii) añadir agua y solución enzimática;
- iii) transferir a intervalos regulares muestras de 0,5 g a un vaso Dram de 10 ml;
- iv) añadir 20 µl de HCl 4M para interrumpir la reacción enzimática y acidificar el jabón de ácidos grasos;
- v) añadir 3 ml de cloroformo, mezclar la muestra durante 30 segundos y centrifugar a 3.000 g durante 10 minutos;

vi) transferir 0,8 ml de la fase de cloroformo a un vaso Dram alquitranado, evaporar el cloroformo a 60°C bajo una corriente de nitrógeno; pesar el vaso Dram;

vii) analizar los lípidos aislados mediante GLC.

11. Utilización según la reivindicación 10, en la que la lípido aciltransferasa es una que presenta una actividad de aciltransferasa en porcentaje inicial medida tras un consumo de 10% de la molécula donadora de por lo menos 1% de actividad de transferasa relativa.

12. Utilización según la reivindicación 11, en la que la actividad de aciltransferasa en porcentaje inicial medida tras un consumo de 10% de la molécula donante es de por lo menos 5%.

13. Utilización según la reivindicación 1, en la que el sustrato receptor de acilo es un carbohidrato, una proteína, un esterol, un estanol o un glicerol.

14. Utilización según la reivindicación 1, en la que el sustrato receptor de acilo es un carbohidrato.

15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la lípido aciltransferasa es una que cuando es sometida a prueba utilizando el ensayo de transferasa en un medio con bajo contenido en agua presenta una actividad de transferasa relativa de por lo menos 1%; comprendiendo dicho ensayo de transferasa las etapas que consisten en:

i) disolver 13,1% de lecitina y 6,6% de colesterol en aceite de soja calentando hasta 60°C durante la agitación;

ii) pesar el sustrato en un vaso Wheaton de 20 ml y calentar hasta 46°C;

iii) añadir agua y solución enzimática;

iv) transferir a intervalos regulares unas muestras de 50 mg a un vaso Dram de 10 ml y congelar;

v) analizar los lípidos aislados mediante GLC.

16. Utilización según la reivindicación 15, en la que el sustrato receptor de acilo en el ensayo es un carbohidrato, una proteína, un esterol, un estanol o glicerol.

17. Utilización según la reivindicación 16, en la que el sustrato receptor de acilo es un carbohidrato.

18. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la lípido aciltransferasa está caracterizada como una enzima que presenta actividad de aciltransferasa y que comprende el motivo GDSX de la secuencia de aminoácidos, en la que X es uno o más de los restos de aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

19. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la enzima lípido aciltransferasa comprende H-309 o comprende un resto de histidina en una posición correspondiente a His-309 en la secuencia de aminoácidos de la enzima lipolítica de *Aeromonas hydrophila* presentada como SEC. ID. nº 2 o SEC. ID. nº 32.

20. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la lípido aciltransferasa puede obtenerse a partir de un organismo de uno o más de los géneros siguientes: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Candida*.

21. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la lípido aciltransferasa comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes: (i) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 2; (ii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 3; (iii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 4; (iv) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 5; (v) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 6; (vi) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 12, (vii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 20, (viii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 22, (ix) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 24, (x) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 26, (xi) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 28, (xii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 30, (xiii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 32, (xiv) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 34, o una secuencia de aminoácidos que presenta 75% o más de identidad con cualquiera de las secuencias presentadas como SEC. ID. nº 2, SEC. ID. nº 3, SEC. ID. nº 4, SEC. ID. nº 5, SEC. ID. nº 6, SEC. ID. nº 12, SEC. ID. nº 20, SEC. ID. nº 22, SEC. ID. nº 24, SEC. ID. nº 26, SEC. ID. nº 28, SEC. ID. nº 30, SEC. ID. nº 32 o SEC. ID. nº 34.

22. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el emulsionante es uno o más de los siguientes: un monoglicérido, una lisofosfatidilcolina, un digalactosil monoglicérido.

23. Procedimiento para la producción de un producto de masa o un producto horneado que comprende un emulsionante, en el que el procedimiento comprende la etapa que consiste en añadir una lipido aciltransferasa a un producto de masa que contiene 10 a 98% de agua, en el que la lipido aciltransferasa es una que cuando es sometida a prueba utilizando el ensayo de transferasa en sustrato tamponado presenta por lo menos 2% de actividad de aciltransferasa; comprendiendo dicho ensayo de transferasa las etapas que consisten en:

- i) disolver 450 mg de fosfatidilcolina y 50 mg de colesterol en cloroformo, evaporar hasta sequedad al vacío;
- ii) transferir 300 mg de la mezcla de colesterol/fosfatidilcolina a un vaso de Wheaton, añadir 15 ml de tampón HEPES 50mM pH 7 y dispersar el lipido en el tampón durante la agitación;
- iii) calentar el sustrato hasta 35°C durante la mezcla con un agitador magnético y añadir 0,25 ml de solución enzimática;
- iv) tomar muestras de 2 ml en el tiempo de reacción de 0, 5, 10, 15, 25, 40 y 60 minutos e interrumpir inmediatamente la reacción enzimática mediante la adición de 25 µl de HCl 4M para acidificar el ácido graso libre;
- v) añadir 3 ml de cloroformo y agitar vigorosamente durante 30 segundos, centrifugar y aislar 2 ml de la fase de cloroformo, filtrar a través de un filtro de 0,45 µl en un vaso Dram alquitranado de 10 ml;
- vi) evaporar el cloroformo bajo una corriente de nitrógeno a 60°C, y pesar las muestras;
- vii) analizar el lipido extraído mediante GLC.

24. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que el producto de masa o el producto horneado es un pan, un producto frito, un aperitivo, pasteles, tortas, bizcochos de chocolate y nueces, pastas de té, fideos, artículos de aperitivo o pasta.

25. Procedimiento según la reivindicación 23 ó 24, en el que el producto de masa o producto horneado es un pan.

26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 25, en el que son producidos por lo menos 2 emulsionantes.

27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 26, en el que la lipido aciltransferasa es una que puede transferir un grupo acilo de un lipido a uno o más de los receptores de acilo siguientes: un estero, un estanol, un carbohidrato, una proteína o su subunidad, glicerol.

28. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que por lo menos uno de los emulsionantes es un éster de carbohidrato.

29. Procedimiento según la reivindicación 24, en el que por lo menos uno de los emulsionantes es un éster de proteína.

30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 29, en el que uno o más de entre un éster de estero, un éster de estanol o un éster de proteína o un éster de carbohidrato o un diglicérido o un monoglicérido es producido *in situ* en el alimento.

31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que el éster de estero es uno o más de entre éster de alfa-sitosterol, éster de beta-sitosterol, éster de estigmasterol, éster de ergosterol, éster de campesterol o éster de colesterol.

32. Procedimiento según la reivindicación 31, en el que el éster de estanol es un o más beta-sitostanol o ss-sitostanol.

33. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 32, en el que la lipido aciltransferasa es una que cuando se somete a prueba utilizando el ensayo de transferasa en yema de huevo con alto contenido en agua en una yema de huevo con 54% de agua, presenta hasta 100% de actividad de transferasa relativa; comprendiendo dicho ensayo de transferasa las etapas que consisten en

- i) pesar 5 gramos de sustrato de yema de huevo líquida en un vaso Wheaton de 20 ml y calentar a 35°C;
- ii) añadir agua y solución enzimática;

iii) transferir a intervalos regulares muestras de 0,5 g a un vaso Dram de 10 ml;

iv) añadir 20 µl de HCl 4M para interrumpir la reacción enzimática y acidificar el jabón de ácidos grasos;

5 v) añadir 3 ml de cloroformo, mezclar la muestra durante 30 segundos y centrifugar a 3.000 g durante 10 minutos;

vi) transferir 0,8 ml de la fase de cloroformo a un vaso Dram alquitranado, evaporar el cloroformo a 60°C bajo una corriente de nitrógeno; pesar el vaso Dram;

10 vii) analizar los lípidos aislados mediante GLC.

34. Procedimiento según la reivindicación 33, en el que la lípido aciltransferasa es una que presenta una actividad de aciltransferasa en porcentaje inicial medida tras 10% de consumo de la molécula donante de por lo menos 1% de actividad de transferasa relativa.

15 35. Procedimiento según la reivindicación 34, en el que la actividad de aciltransferasa en porcentaje inicial es de por lo menos 5%.

20 36. Procedimiento según la reivindicación 23, en el que el sustrato receptor de acilo es un carbohidrato, una proteína, un esterol, un estanol o glicerol.

37. Procedimiento según la reivindicación 36, en el que sustrato receptor de acilo es un carbohidrato.

25 38. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 37 en el que la lípido aciltransferasa es una que cuando se somete a prueba utilizando el ensayo de transferasa en un medio con bajo contenido en agua presenta una actividad de transferasa relativa de por lo menos 1%, comprendiendo dicho ensayo de transferasa las etapas que consisten en:

30 i) disolver 13,1% de lecitina y 6,6% de colesterol en aceite de soja calentando hasta 60°C durante la agitación;

ii) pesar el sustrato en un vaso Wheaton de 20 ml y calentar hasta 46°C;

iii) añadir agua y solución enzimática;

35 iv) transferir a intervalos regulares unas muestras de 50 mg a un vaso Dram de 10 ml y congelar;

v) analizar los lípidos aislados mediante GLC.

40 39. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 38, en el que la lípido aciltransferasa está caracterizada como una enzima que presenta una actividad aciltransferasa y que comprende el motivo GDSX de la secuencia de aminoácidos, en el que X es uno o más de los restos de aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

45 40. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 39, en el que la enzima lípido aciltransferasa comprende H-309 o comprende un resto de histidina en una posición correspondiente a His-309 en la secuencia de aminoácidos de la enzima lipolítica de *Aeromonas hydrophila* presentada como SEC. ID. nº 2 o SEC. ID. nº 32.

50 41. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 40, en el que la lípido aciltransferasa puede obtenerse a partir de un organismo de uno o más de los géneros siguientes: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Candida*.

55 42. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 41, en el que la lípido aciltransferasa comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes: (i) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 2; (ii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 3; (iii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 4; (iv) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 5; (v) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 6; (vi) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 12, (vii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 20, (viii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 22, (ix) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 24, (x) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 26, (xi) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 28, (xii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 30, (xiii) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 32, (xiv) la secuencia de aminoácidos presentada como SEC. ID. nº 34, o una secuencia de aminoácidos que presenta 75% o más de identidad con cualquiera de las secuencias presentadas como SEC. ID. nº 2, SEC. ID. nº 3, SEC. ID. nº 4, SEC. ID. nº 5, SEC. ID. nº 6, SEC. ID. nº 12, SEC. ID. nº 20, SEC. ID. nº 22, SEC. ID. nº 24, SEC. ID. nº 26, SEC. ID. nº 28, SEC. ID. nº 30, SEC. ID. nº 32 o SEC. ID. nº 34.

65

43. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 47, en el que el emulsionante es uno o más de los siguientes: un monoglicérido, una lisofosfatidilcolina, un digalactosil monoglicérido.

- 5 44. Producto de masa u horneado que contiene agua, en el que el producto de masa u horneado comprende 10 a 98% de agua, que puede obtenerse mediante el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 23 a 43, en el que el alimento comprende una lípido aciltransferasa como se ha definido en la reivindicación 23 y un emulsionante.

Figura 1

SEC ID n° 1

```

1 ivafGDSlTd geayygdsgd ggwgagladr ltallrlrar prgvdvfnrg isGrtsdGrI
61 ivDalvallF laqslglpnL pPYLsgdflr GANFAsagAt Ilptsgpfli QvqFkdfksq
121 vlelrqalgl lgellrllpv ldakspdlvt imiGtNDlit saffgpkste sdrnvsvpef
181 kdnlrqlikr Lrsnngarii vlitlvilnl gplGCiPlkl alalassknv dasgclerln
241 eavadfneal relaiskled qlrkdglp dv kgadvpyvDl ysifqdldgi qnpsayvyGF
301 ettkaCCGyG gryNynrvCG naglcnvtaK aCnpssylls flfwDgfHps ekGykavAea
361 l

```

Figura 2

SEC ID n° 2

```

1 mkkwfvcllg lvaltvqaad srpafsrivm fgdsldstgk myskmrgylp ssppyyegrf
61 sngpvwleql tnefpgltia neaeggptav aynkiswnpk yqvinnldye vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlngakeill fnlpdlggnp
181 sarsqkvvea ashvsayhnq lllnlargla ptgmvkifei dkqfaemlrd pqnfglsdqr
241 nacyggsyvw kpfasrsast dsqlsafnpq erlaiagnpl laqavaspma arsastlnce
301 gkmfwdqvhp ttvvhaalse paatfiesqy eflah

```

Figura 3

SEC ID n° 3

```

1 mkkwfvcllg lialtvqaad trpafsrivm fgdsldstgk myskmrgylp ssppyyegrf
61 sngpvwleql tkqfpgltia neaeggatav aynkiswnpk yqvynnlde vtqflqkdsf
121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlngakqill fnlpdlggnp
181 sarsqkvvea vshvsayhnk lllnlargla ptgmvkifei dkqfaemlrd pqnfglsdve
241 npcydggyvw kpfatrsrst drqlsafspq erlaiagnpl laqavaspma rrsasplnce
301 gkmfwdqvhp ttvvhaalse raatfietqy eflahg

```

Figura 4

SEC ID n° 4

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclrsta nyphviadtt garltdvtcg aaqtadfta cypgvapqld algtgtdlvt
121 ltiggnndnst finaitacgt agvlsaggks pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgypwitpat adpscflklp laagdvpplr aiqahlnlav rraaetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgttr wiepllfghs lvpvhpnaig errmaehtmd vlgld

```

Figura 5

SEC ID n° 5

```

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
61 anllclrsta nyphviadt garltdvtcg aaqtadfttra qypgvapqld algtgtdlvt
121 ltiggndnst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
181 arapharvaa lgypwitpat adpscflklp laagdvpylr aiqahlndav rraaeetgat
241 yvdfsgvsdg hdaceapgtr wiepllfghs lvpvhpnalg errmaehtmd vlgld

```

Figura 6

SEC ID n° 6

```

1 mdyekfllfg dsitefafnt rpiedgkdqy algaalvney trkmdilqrg fkgysrwal
61 kilpeilkhe snivmatifl gandacsagp qsvplpefid nirqmvslmk syhirpiiig
121 pglvdrekwe kekseeialg yfrtnenfai ysdalaklan eekvpfvaln kafqqeggdgda
181 wqqlldglnh fsgkgykifh dellkvietf ypqyhpknmq yklkdwrdrv1 ddgsnims

```

Figura 7

Alineación de pfam00657.6 secuencia de consenso con P10480

```

*->ivafGDSLtdg.....eayygdsgggwgagladrL
iv+fGDSL+d+++ ++ ++ ++++++ ++s+g w ++l + +
P10480 28 IVMFGDSLSDTgkmyskmrgylpsppYYEGRFSNGP VWLEQLTNEF 74

tall..rlrarprgvdvfnrgisGrtsdGrlivDalvallFlagslgln
+ l + ++++++ +n+ +
P10480 75 PGLTIANEAEGGPTAVAYNKISWNPK----- 100

lpPYLsgdflrGANFAsagAtIlptsgpfliQvqFkdfksqvlelrqalg
++ ++
P10480 101 -----YQVINN 106

llqellrllpvlidakspdlvtimigtNDlitsaffgpkstesdrnvspe
l++e+ ++l +++ k+ dl+ +++G+ND+ ++ ++ ++++++
P10480 107 LDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLVWGANDY-----LAYGWNT EQDAKR 148

fkdnrlqlikrLrsnngariivlitlvilnlgplGC1Plklalalasskn
++d +++++r+ nga+ +++++nl+ lG+ P+
P10480 149 VRDAISDAANRMV-LNGAK-----EILLFNLPDLGQNPS----- 181

vdasgclerlneavadfnealrelaiskledqlrkdgldpdkgadpvyvD
+++ +e + ++a++n++l +la +ql+++g++++++d ++++
P10480 182 ARSQKVVEAASHVSAYHNQLLLNLA-----RQLAPTGMVKLF EIDKQFAE 226

lysifqldldgiqnpsayv.y....GFe.ttkaCCGyGgr.yNyn.rv.CG
+ +q+++ + + a+++++ +++ +aa++++++ +N+++r+ ++
P10480 227 MLRDPQNFGLSDQRNACYgGsyvwKPFaSRsASTDSQLSaFNPQeRLaIA 276

nag.1.c.nvtakaC.npsyll:sflfwDgfHpsekGykavAeal<-*
+++ l + +++++a+ +s+ +++++fwD++Hp+ ++a+ e
P10480 277 GNPLLaQaVASPMARrSASTLNCeGKMFWDQVHPTTVVHAALSEPA 322

```

Alineación de pfam00657.6 secuencia de consenso con AAG09804

```

*->ivafGDSLtdg.....eayygdsgggwgagladrL
iv+fGDSL+d+++ ++ ++ ++++++ ++s+g w ++l + +
AAG09804 28 IVMFGDSLSDTgkmyskmrgylpsppYYEGRFSNGP VWLEQLTKQF 74

tallrlrarprgvdvfnrgisGrtsdGrlivDalvallFlagslglnLp
+g+++ n + +G+t
AAG09804 75 -----PGLTIANEAEGGAT----- 88

PYLsgdflrGANFAsagAtIlptsgpfliQvqFkdfksqvlelrqa....
++++ + +++++ +
AAG09804 89 -----AVAYNKISWNpkyq 102

..lgllqellrllpvlidakspdlvtimigtNDlitsaffgpkstesdrn
++l++e+ ++l +++ k+ dl+ +++G+ND+ ++ ++ ++
AAG09804 103 vYNNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLVWGANDY-----LAYGWNT EQ 144

svpefkdnrlqlikrLrsnngariivlitlvilnlgplGC1Plklalala
+++++d +++++r+ nga+ +++++nl+ lG+ P+
AAG09804 145 DAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLFNLPDLGQNPS----- 181

ssknvdasgclerlneavadfnealrelaiskledqlrkdgldpdkgad
++++ +e + ++a++n++l +la +ql+++g++++++d
AAG09804 182 ----ARSQKVVEAVSHVSAYHNKLLNLA-----RQLAPTGMVKLF EIDK 222

pyvDlysifqldldgiqnpsayv.y....GFe.ttkaCCGyGgr.yNyn.r
+++++ +q+++ + ++ ++++++ +++ t++ +++ +++ + +++r
AAG09804 223 QFAEMLRDPQNFGLSDVENPCYdGgyvwKPFaTRSVSTDRQLSaFSPQeR 272

v.CGnag.1.c.nvtakaC.npsyll:sflfwDgfHpsekGykavAeal
+ +++++ l + +++++a+ +s +++++fwD++Hp+ ++a+ e+
AAG09804 273 LaIAGNPLLaQaVASPMARrSASPLNCEGKMFWDQVHPTTVVHAALSERA 322

<-*

```

AAG09804

Alineación de pfam00657.6 secuencia de consenso con NP_631558

```

*->ivafGDSLtDgeayygdsdgggwgagladrLtallrlrarprgvdvf
+va+GDS ++g          +g + +++L      + + + ++ +
NP_631558    42    YVALGDSYSAG-----SGVLPVDPANL----LCLRSTANYPHV 75

nrgisGrtsdGrlivD.a.l.vallFlagslglnLpPYLsgdflrGANF
+ ++G++          D + + +
NP_631558    76    IADTTGAR-----LTDvTcGaaQ----- 93

AsagAtIlptsgpfliQvqFkdfksqvlrlqalglqellrllpvldak
+++      ++ + ++ +++
NP_631558    94    -----TADFTRAQYPGVAPQLDALGT 114

spdlvtimiGtNDL.....itsaffgpkstesdrnsvvp
+ dlvt+ iG+ND ++ + + ++ + ++ + +k ++ + +++
NP_631558    115   GTDLVTLTIGGNDNstfinaitacgtagvLSGGKGSPPCKDRHGTSFDDEI 164

efkdn..lrqlikrLrs.nngariivlitlvilnlg.....plG
e +++ l++++ +r+++ +ar+ +l ++i+++ +++ + + G
NP_631558    165   EANTYpaLKEALLGVRARAPHARVAALGYPWITPATadpscfklplAAG 214

ClPlklalalassknvdasgcclerlneavadfnealrelaiskledqlrk
P+          l+ ++a n a+r a
NP_631558    215   DVPY-----LRAIQAHLNDAVRRAA----- 234

dglpdkvgadvpyvDlysifqldgiqnpsayvyGFettkaCCGyGgryN
++ + +yvD+ ++
NP_631558    235   -----EETGATYVDFSGVSDG----- 250

ynrvCGnaglcenvtakaC.npssyll.sflfwDgf...HpsekGykavAe
++aC+ p +++ + lf + + + Hp++ G +++Ae
NP_631558    251   -----HDACeAPGTRWIEPLLFHGS�vpvHPNALGERRMAE 286

al<-*
+
NP_631558    287   HT      288

```

Alineación de pfam00657.6 secuencia de consenso con CAC42140

```

*->ivafGDSLtDgeayygdsdgggwgagladrLtallrlrarprgvdvf
+va+GDS ++g          +g + +++L      + + + ++ +
CAC42140    42    YVALGDSYSAG-----SGVLPVDPANL----LCLRSTANYPHV 75

nrgisGrtsdGrlivD.a.l.vallFlagslglnLpPYLsgdflrGANF
+ ++G++          D + + +
CAC42140    76    IADTTGAR-----LTDvTcGaaQ----- 93

AsagAtIlptsgpfliQvqFkdfksqvlrlqalglqellrllpvldak
+++      ++ + ++ +++
CAC42140    94    -----TADFTRAQYPGVAPQLDALGT 114

spdlvtimiGtNDL.....itsaffgpkstesdrnsvvp
+ dlvt+ iG+ND ++ + + ++ + ++ + +k ++ + +++
CAC42140    115   GTDLVTLTIGGNDNstfinaitacgtagvLSGGKGSPPCKDRHGTSFDDEI 164

efkdn..lrqlikrLrs.nngariivlitlvilnlg.....plG
e +++ l++++ +r+++ +ar+ +l ++i+++ +++ + + G
CAC42140    165   EANTYpaLKEALLGVRARAPHARVAALGYPWITPATadpscfklplAAG 214

ClPlklalalassknvdasgcclerlneavadfnealrelaiskledqlrk
P+          l+ ++a n a+r a
CAC42140    215   DVPY-----LRAIQAHLNDAVRRAA----- 234

dglpdkvgadvpyvDlysifqldgiqnpsayvyGFettkaCCGyGgryN
++ + +yvD+ ++
CAC42140    235   -----EETGATYVDFSGVSDG----- 250

ynrvCGnaglcenvtakaC.npssyll.sflfwDgf...HpsekGykavAe
++aC+ p +++ + lf + + + Hp++ G +++Ae
CAC42140    251   -----HDACeAPGTRWIEPLLFHGS�vpvHPNALGERRMAE 286

```

```

                                al<-*
                                +
CAC42140    287 HT      288

Alineación de pfam00657.6 secuencia de consenso con P41734
      *->ivafGDSlTdg....eayygdsgggwgagladrLtallrlrarprg
      ++fGDS+T+   +++ + + d+  ga+l + +   +r+
P41734      6   FLLFGDSITEFafntRPIEDGKDQYALGAALVNEY-----TRK 43

      vdvfnrgisGrtsdGrlivDalvallFlagslglpnLpPYLsgdfllrGAN
      +d+  rg++G+t
P41734     44  MDILQRGFKGYT----- 55

      FAsagAtIlptsgpfliQvqFkdfksqvlrlrqalglilqellrllpvlda
      +r+al++l+e+l+   +
P41734     56  -----SRWALKILPEILKH-----E 70

      kspdlvtimiGtNDlitsaffgpkstesdrnsvpefkdnlrqliklrLrs
      + + ti++G+ND+   ++ +++ v++pef+dn+rq+++++s
P41734     71  SNIVMATIFLGANDA-----CSAGPQSVPLPEFIDNIRQMVSIMKS 111

      nngariivlitlviInlgplGC1Plklalalassknvdasgclerlneav
      ++++ii++++lv   ++   ++ k ++ + + r+ne +
P41734    112  YHIRPIIIGPGLVDREKW-----EKEKSEEIALGYFRTNENF 148

      adfnealrelaiskledqlrkdglpdkgadvpvDlysifqldlgignp
      a + al +la   ++ +vp+v l+++fq+ +g++++
P41734    149  AIYSDALAKLA-----NEEKVPPFVALNKAFQQEGGDAWQ 182

      sayvyGFettkaCCGyGgryNynrvCGnaglcnvtakaCnpssyllsflf
      +   1+
P41734    183  Q-----LL 185

      wDgfHpsekGykavAeal<-*
      Dg+H+s kGyk+++++l
P41734    186  TDGLHPSGKGYKIFHDEL      203

```

Figura 8

```

A.sal 1  MKKWFVCLLGLIALTVQAADTRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLPSSPPYYEGRF 60
          +           +
A.hyd 1  MKKWFVCLLGLVALTVQAADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLPSSPPYYEGRF 60

A. sal 61 SNGPVWLEQLTKQFPGLTIANEAEGGATAVAYNKISWNPKYQVINNLDYEVTQFLQKDSF 120
          ++           +
A. hyd 61 SNGPVWLEQLTNEFPGLTIANEAEGGPTAVAYNKISWNPKYQVINNLDYEVTQFLQKDSF 120

A. sal 121 KPDDLVLWVGANDYLAYGWNTAQDAKRVRDAISDAANRMVLNGAKQILLEFNLPDLGQNP 180
          +
A. hyd 121 KPDDLVLWVGANDYLAYGWNTAQDAKRVRDAISDAANRMVLNGAKEILLEFNLPDLGQNP 180

A. sal 181 SARSQKVVEAVSHVSAYHNKLLLNLARQLAPTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDVE 240
          +           +
A.hyd 181 SARSQKVVEAASHVSAYHNQLLLNLARQLAPTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDQR 240 ++

A. sal 241 NPCYDGGYVWKPFATRSVSTDRLSAFSPQERLAIAGNPLLAQAVASEPMARRSASPLNCE 300
          + ++ +           + + +           +
A. hyd 241 NACYGGSYVWKPFASRSASTDSQLSAFNPQERLAIAGNPLLAQAVASPMARSASTLNCE 300

A. sal 301 GKMPWDQVHPTTVVHAALSERAAFTIETQYEFLAH 335
          +           +
A. hyd 301 GKMPWDQVHPTTVVHAALSEPAATFIESQYEFLAH 335

```

Figura 9

```

1  ATGAAAAAAT GGTTTGTGTG TTTATTGGGA TTGGTCGCGC TGACAGTTCA GGCAGCCGAC
61  AGCCGTCCCG CCTTCTCCCG GATCGTGATG TTTGGCGACA GCCTCTCCGA TACCGGCAAG
121 ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC TCCAGCCCCC CCTACTATGA GGGCCGCTTC
181 TCCAACGGGC CCGTCTGGCT GGAGCAGCTG ACCAACGAGT TCCCGGGCCT GACCATAGCC
241 AACGAGGCGG AAGGCGGACC GACCGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
301 TATCAGGTCA TCAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCCTGCAAAA AGACAGCTTC
361 AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GCGGCCAACG ACTATCTGGC CTATGGCTGG
421 AACACAGAGC AGGATGCCAA GCGGGTGCGC GACGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG
481 GTGCTGAACG GCGCCAAGGA GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCCC
541 TCGGCCCCGA GCCAGAAGGT GGTGAGGCGG GCCAGCCATG TCTCCGCTA CCACAACCAG
601 CTGCTGCTGA ACCTGGCACG CCAGCTGGCT CCCACCGGCA TGGTGAAGCT GTTCGAGATC
661 GACAAGCAGT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT TCGGCCTGAG CGACCAGAGG
721 AACGCCTGCT ACGGTGGCAG CTATGTATGG AAGCCGTTTG CCTCCCGCAG CGCCAGCACC
781 GACAGCCAGC TCTCCGCCTT CAACCCGCAG GAGCGCCTCG CCATCGCCGG CAACCCGCTG
841 CTGGCCCAGG CCGTCGCCAG CCCCATGGCT GCCCGCAGCG CCAGCACCTT CAACTGTGAG
901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTCCACCCC ACCACTGTCTG TGCACGCCGC CCTGAGCGAG
961 CCCGCCGCCA CCTTCATCGA GAGCCAGTAC GAGTTCCTCG CCCAC

```

Figura 10

```

1  ATGAAAAAAT GGTTCGTTTG TTTATTGGGG TTGATCGCGC TGACAGTTCA GGCAGCCGAC
61  ACTCGCCCCG CCTTCTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA GCCTCTCCGA TACCGGCAAA
121 ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC TCCAGCCCGC CCTACTATGA GGGCCGTTTC
181 TCCAACGGAC CCGTCTGGCT GGAGCAGCTG ACCAAGCAGT TCCCGGGTCT GACCATCGCC
241 AACGAAGCGG AAGGCGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
301 TATCAGGTCT ACAACAACCT GGAATACGAG GTCACCCAGT TCTTGAGAA AGACAGCTTC
361 AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG ACTATCTGGC ATATGGCTGG
421 AATACGGAGC AGGATGCCAA GCGAGTTCGC GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG
481 GTACTGAACG GTGCCAAGCA GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCCG
541 TCAGCCCGCA GTCAGAAGGT GGTCGAGGCG GTCAGCCATG TCTCGCCTA TCACAACAAG
601 CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCC CCCACCGGCA TGGTAAAGCT GTTCGAGATC
661 GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT TCGGCCTGAG CGACGTCGAG
721 AACCCCTGCT ACGACGGCGG CTATGTGTGG AAGCCGTTTG CCACCCGAG CGTCAGCACC
781 GACCGCCAGC TCTCCGCCTT CAGTCCGCAG GAACGCCTCG CCATCGCCGG CAACCCGCTG
841 CTGGCACAGG CCGTTGCCAG TCCTATGSCC CGCCGCAGCG CCAGCCCCCT CAACTGTGAG
901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTCG TGCACGCAGC CCTGAGCGAG
961 CGCGCCGCCA CCTTCATCGA GACCCAGTAC GAGTTCCTCG CCCACGGATG A

```

Figura 11

```

1  ATGCCGAAGC CTGCCCTTCG CCGTGTCATG ACCGCGACAG TCGCCGCCGT CGGCACGCTC
61  GCCCTCGGCC TCACCGACGC CACCGCCAC GCGCGCCCCG CCCAGGCCAC TCCGACCCTG
121 GACTACGTCG CCCTCGGCGA CAGCTACAGC GCGGGCTCCG GCGTCCTGCC CGTCGACCCC
181 GCCAACCTGC TCTGTCTGCG CTCGACGGCC AACTACCCCC ACGTCATCGC GGACACGACG
241 GCGGCCCGCC TCACGGACGT CACCTGCGGC GCGCGCAGA CCGCCGACTT CACGCGGGCC
301 CAGTACCCGG GCGTCGCACC CCAGTTGGAC GCGCTCGGCA CCGGCACGGA CCTGGTCACG
361 CTCACCATCG GCGGCAACGA CAACAGCACC TTCATCAACG CCATCACGGC CTGCGGCACG
421 GCGGGTGTCC TCAGCGGCGG CAAGGGCAGC CCCTGCAAGG ACAGGCACGG CACCTCCTTC
481 GACGACGAGA TCGAGGCCAA CACGTACCCC GCGCTCAAGG AGGCGCTGCT CGGCGTCCGC
541 GCCAGGGCTC CCCACGCCAG GGTGGCGGCT CTCGGCTACC CGTGGATCAC CCCGGCCACC
601 GCGGACCCGT CCTGCTTCCT GAAGCTCCCC CTCGCCCGCG GTGACGTGCC CTACCTGCGG
661 GCCATCCAGG CACACCTCAA CGACGCGGTC CCGCGGGCCG CCGAGGAGAC CGGAGCCACC
721 TACGTGGACT TCTCCGGGGT GTCCGACGGC CACGACGCCT GCGAGGCCCC CGGCACCCGC
781 TGGATCGAAC CGCTGCTCTT CGGGCACAGC CTCGTTCCCG TCCACCCAA CGCCCTGGGC
841 GAGCGGCGCA TGGCCGAGCA CACGATGGAC GTCCTCGGCC TGGACTGA

```

Figura 12

```

1 TCAGTCCAGG CCGAGGACGT CCATCGTGTG CTCGGCCATG CGCCGCTCGC CCAGGGCGTT
61 GGGGTGGACG GGAACGAGGC TGTGCCCGAA GAGCAGCGGT TCGATCCAGC GGGTGCCGGG
121 GGCCTCGCAG GCGTCGTGGC CGTCGGACAC CCCGGAGAAG TCCACGTAGG TGGCTCCGGT
181 CTCCTCGGCG GCCCGCCGGA CCGCGTCGTT GAGGTGTGCC TGGATGGCCC GCAGGTAGGG
241 CACGTCACCG GCGGCGAGGG GGAGCTTCAG GAAGCAGGAC GGGTCGGCGG TGGCCGGGGT
301 GATCCACGGG TAGCCGAGAG CCGCCACCCT GGCCTGGGGA GCCCTGGCGC GGACGCCGAG
361 CAGCGCCTCC TTGAGCGCGG GGTACGTGTT GGCCTCGATC TCGTCGTCGA AGGAGGTGCC
421 GTGCCTGTCC TTGCAGGGGC TGCCCTTGCC GCCGCTGAGG ACACCCGCCG TGCCGCAGGC
481 CGTGATGGCG TTGATGAAGG TGCTGTTGTC GTTGCCGCCG ATGGTGAGCG TGACCAGGTC
541 CGTGCCGGTG CCGAGCGCGT CCAACTGGGG TGCGACGCCC GGGTACTGGG CCCGCGTGAA
601 GTCGGCGGTC TGCGCGGCGC CGCAGGTGAC GTCCTGTGAG CGGGCGCCCG TCGTGTCCGC
661 GATGACGTGG GGGTAGTTGG CCGTCGAGCG CAGACAGAGC AGGTTGGCGG GGTGACGGG
721 CAGGACGCCG GAGCCGGCGC TGTAGCTGTC GCCGAGGGCG ACGTAGTCCA GGGTCGGAGT
781 GGCCTGGGCG GGC CGGCGT GGGCGGTGGC GTCGGTGAGG CCGAGGGCGA GCGTGCCGAC
841 GGCGGCGACT GTCGCGGTCA TGACACGGCG AAGGGCAGGC TTCGGCAT

```

Figura 13

```

1  ATGGATTACG AGAAGTTTCT GTTATTTGGG GATTCATTGA CTGAATTTGC TTTTAATACT
61  AGGCCCATTTG AAGATGGCAA AGATCAGTAT GCTCTTGGAG CCGCATTAGT CAACGAATAT
121 ACGAGAAAAA TGGATATTCT TCAAAGAGGG TTCAAAGGGT ACACTTCTAG ATGGGCGTTG
181 AAAATACTTC CTGAGATTTT AAAGCATGAA TCCAATATTG TCATGGCCAC AATATTTTGG
241 GGTGCCAACG ATGCATGCTC AGCAGGTCCC CAAAGTGTCC CCTCCCCGA ATTTATCGAT
301 AATATTCGTC AAATGGTATC TTTGATGAAG TCTTACCATA TCCGTCCTAT TATAATAGGA
361 CCGGGGCTAG TAGATAGAGA GAAGTGGGAA AAAGAAAAAT CTGAAGAAAT AGCTCTCGGA
421 TACTTCCGTA CCAACGAGAA CTTTGCCATT TATTCCGATG CCTTAGCAAA ACTAGCCAAT
481 GAGGAAAAAG TTCCCTTCGT GGCTTTGAAT AAGGCGTTTC AACAGGAAGG TGGTGATGCT
541 TGGCAACAAC TGCTAACAGA TGGACTGCAC TTTTCCGAA AAGGGTACAA AATTTTTCAT
601 GACGAATTAT TGAAGGTCAT TGAGACATTC TACCCCAAT ATCATCCAA AAACATGCAG
661 TACAACTGA AAGATTGGAG AGATGTGCTA GATGATGGAT CTAACATAAT GTCTTGA

```

Figura 14

(SEC ID nº 12)

10	20	30	40	50	60
MNLRQWMGAA	TAALALGLAA	CGGGGTDQSG	NPNVAKVQRM	VVFGDSLSDI	GTYPVQAQAV
70	80	90	100	110	120
GGGKFTTNPG	PIWAETVAAQ	LGVTLTPAVM	GYATSVQNCP	KAGCFDYAQQ	GSRVTDPNGI
130	140	150	160	170	180
GHNGGAGALT	YPVQQQLANF	YAASNNTFNG	NNDVVFVLAG	SNDIFFWTTA	AATSGSGVTP
190	200	210	220	230	240
AIATAQVQQA	ATDLVGYVKD	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 15

(SEC ID n° 13)

atgaacctgc	gtcaatggat	gggcgcgcgc	acggctgccc	ttgccttggg	cttggccgcg	60
tgcgggggcg	gtgggaccga	ccagagcggc	aatcccaatg	tgcceaaggt	gcagcgcgatg	120
gtggtgttcg	gcgacagcct	gagcgatata	ggcacctaca	cccccgtcgc	gcaggcgggtg	180
ggcggcggca	agttcaccac	caaccctggc	ccgatctggg	ccgagaccgt	ggccgcgcaa	240
ctgggcgtga	cgctcacgcc	ggcgggtgatg	ggctacgcca	cctccgtgca	gaattgcccc	300
aaggccggct	gcttcgacta	tgcgcagggc	ggctcgcgcg	tgaccgatcc	gaacggcatc	360
ggccacaacg	gcggcgcggg	ggcgttgacc	taccgggttc	agcagcagct	cgccaacttc	420
tacgcggcca	gcaacaacac	attcaacggc	aataacgatg	tgtcttctgt	gctggccggc	480
agcaacgaca	ttttcttctg	gacctctggc	gcggccacca	gcggctccgg	cgtgacgccc	540
gccattgcca	cggcccaggt	gcagcaggcc	gcgacggacc	tggtcggcta	tgtcaaggac	600
atgatcgcca	aggggtgcgac	gcaggtctac	gtgttcaacc	tgcccgacag	cagcctgacg	660
ccggacggcg	tggcaagcgg	cacgaccggc	caggcgtctg	tgacgcgct	ggtgggcacg	720
ttcaacacga	cgctgcaaag	cgggctggcc	ggcacctcgg	cgcgcacatc	cgacttcaac	780
gcacaactga	ccgcggcgat	ccagaatggc	gcctcgttcg	gcttcgcca	caccagcgcc	840
cgggcctgcg	acgccaccaa	gatcaatgcc	ctggtgccga	gcgccggcgg	cagctcgctg	900
ttctgctcgg	ccaacacgct	ggtggcttcc	ggtgcggacc	agagctacct	gttcgcccgc	960
ggcgtgcacc	cgaccacggc	cggccatcgc	ctgatcgcca	gcaacgtgct	ggcgcgcctg	1020
ctggcggata	acgtcgcgca	ctga				1044

Figura 16 (SEC ID n° 20)

```

1 migsyvavgd sftegvvdpg pdgafvgwad rlavlladrr pegdftytnl avrgrlldqi
61 vaeqvprvvg lapdlvsfaa ggndiirpgt dpdevaerfe lavaaltaaa gtvltvtgfd
121 trgvvpvlkhl rgkياتyngh vraiadrygc pvldlwsllrs vqdrrawdada rhlhspeght
181 rvalraggal glrvpadpdq pwpplpprgt ldvrrddvhw areylvpwig rrlrgessgd
241 hvtakgtlsp daiktriaav a

```

Figura 17 (SEC ID n° 21)

```

1 gtgacgggt cgtaacgtggc ggtgggggac agcttcaccg agggcgctcg cgaccccggc
61 cccgacgggg cgttcgctcg ctggggccgac cggctcgccg tactgctcgc ggaccggcgc
121 cccgagggcg acttcacgta cacgaacctc gcgctgcgcg gcaggctcct cgaccagatc
181 gtggcggaac aggtcccgcg ggtcgctcgga ctgcgcgccg acctcgctctc gttcgcggcg
241 ggcggaacg acatcatccg gcccgccacc gatcccgacg aggtcgccga gcggttcgag
301 ctggcggtgg ccgcgctgac cgccgcggcc ggaaccgtcc tggtagaccac cgggttcgac
361 acccgggggg tgcccgctct caagcacctg cgcggcaaga tcgccacgta caacgggcac
421 gtccgcgcca tcgcgcaccg ctacggctgc ccggtgctcg acctgtgggc gctgcggagc
481 gtccaggacc gcaggcgctg ggacgcccac cggctgcacc tgtcgcccga ggggcacacc
541 cgggtggcgc tgcgcgcggg gcaggccctg ggcctgcgcg tccgggcga ccctgaccag
601 ccctggccgc ccctgccgcc gcgcggcacg ctgcacgtcc ggcgcgacga cgtgcactgg
661 gcgcgcgagt acctggtgcc gtggatcggg cgcggctgc ggggcgagtc gtcgggcgac
721 cacgtgacgg ccaaggggac gctgtcgccg gacgccatca agacgcggat cgccgcgggtg
781 gcctga

```

Figura 18
(SEC ID n° 22)

```

1  mqtncpytsl vavgdsfteg msdlldgsy rgwadllatr maarspgfry anlavrgkli
61  gqivdeqvdy aaamgadvit lvvgldntlr pkcdmarvrd lltgaverla phceqlvlmr
121 spgrqgvpvl rfrprmealf aviddlagrh gavvvdlyga qsladprmwv vdrhlhtaeg
181 hrrvaeavwq slghapedpe whapipatpp pgwvtrrtad vrfarqhlhp wigrrltgrs
241 sgdglpakrp dllpyedpar

```

Figura 19 (SEC ID n° 23)

```

1  atgcagacga acccccgcgta caccagctctc gtcgcccgtcg gcgactcctt caccgagggc
61  atgtcggacc tgctgcccga cggtccttac cgtggctggg ccgacctcct cgccaccggg
121 atggcgggccc gctccccggg cttccggtag gccaacctgg cggcgcgcgg gaagctgatc
181 ggacagatcg tcgacgagca ggtggacgtg gccgcccga tgggagccga cgtgatcacg
241 ctggctcggcg ggctcaacga cacgctgcgg cccaagtgcg acatggcccg ggtgcgggac
301 ctgctgacct aggccgtgga acggctcgcc ccgcactgcg agcagctggt gctgatgcgc
361 agtcccggtc gccagggtcc ggtgctggag cgttccggc cccgcatgga ggccctgttc
421 gccgtgatcg acgacctggc cgggcggcac ggcccgctgg tcgtcgacct gtacggggcc
481 cagtcgctgg ccgacctcg gatgtgggac gtggaccggc tgcacctgac cgccgagggc
541 caccgcccgg tcgcgaggc ggtgtggcag tcgctcggcc acgagcccga ggaccccag
601 tggcacgcgc cgatcccggc gacgcgcgcg ccggggtggg tgacgcgcag gaccgcggac
661 gtccgggttcg ccgcgcagca cctgctgccc tggataggcc gcaggctgac cgggcgctcg
721 tccggggacg gcctgcccgc caagcgcgcg gacctgctgc cctacagga cccgcacgg
781 tga

```

Figura 20 (SEC ID n° 24)

```

1 mtrgrdggag apptkhrall aaivtlivai saaiyagasa ddgardhalq aggrlprgda
61 apastgawvg awatapaaae pgtettglag rsvrnvvhts vggtagaritl snlygqsplt
121 vthasialaa gpdtaaaiaa tmrrltfggs arviipaggq vmsdtarlai pyganvlvtt
181 yspipsgpvt yhpqarqtsy ladgdrtadv tavayttptp ywryltaldv lsheadgtvv
241 afgdsitdga rsqsdanhrw tdvlaarlhe aagdgrdtpy ysvvnegisg nrlltsrpgr
301 padnpsglsr fqrdrvlerln vkavvvvlgv ndvlnspela drdailtqlr tlvdraharg
361 lrvvgatitp fggyggytea retmrqevne eirsgrvfdt vvdfdkalrd pydprmrdsd
421 ydsgdhlpq dkgymarmgav idlaalkgaa pvka

```

Figura 21 (SEC ID n° 25)

```

1 atgaccgagg gtcgtgacgg ggggtgagggg gcgcccccca ccaagcaccg tgccctgtct
61 gcggcgatcg tcaccctgat agtggcgatc tccgaggcca tatacgccgg agcgtccgcg
121 gacgacggca gcagggacca cgcgctgcag gccggaggcc gtctcccacg aggagacgcc
181 gcccccgct ccaccggtgc ctgggtgggc gcctgggcca ccgcaccggc cggcgccgag
241 cggggcaccg agacgaccgg cctggcgggc cgtccgtgc gcaacgtcgt gcacacctcg
301 gtcggcgagg cggcgcgcg gatcacctc tcgaacctgt acgggcagtc gccgctgacc
361 gtcacacacg cctcgatcgc cctggcgccg gggcccgaca ccgcggccgc gatcgccgac
421 accatgcgcc ggctcacctt cggcggcagc gcccggtga tcatccggc gggcgggcag
481 gtgatgagcg acaccgccc cctcgccatc ccctacgggg cgaacgtcct ggtcaccacg
541 tactccccca tccggtccgg gccggtgacc taccatccgc agggccggca gaccagctac
601 ctggccgacg gcgaccgcac ggcgagcgtc accgcccgtc cgtacaccac cccacgccc
661 tactggcgct acctgaccgc cctcgacgtg ctgagccaag aggcggagcg caccgctgtg
721 gcgttcggcg actccatcac cgacggcgcc cgtcgcaga gcgacgcca ccaccgctgg
781 accgacgtcc tcgcccacg cctgcacgag gcggcgggcg acggccggga cagccccgc
841 tacagcgtcg tcaacgaggg catcagcggc aaccggctcc tgaccagcag gccggggcgg
901 ccggccgaca acccgagcgg actgagccgg ttccagggg acgtgctgga acgcaccaac
961 gtcaaggccg tcgtcgtcgt cctcgcgctc aacgacgtcc tgaacagccc ggaactcgcc
1021 gaccgcgacg ccacctgac cggcctgcgc accctcgtcg accggggcga cggccgggga
1081 ctgcgggctg tcggcgccac gatcacgcc ttcgggggt acggcggtc caccgaggcc
1141 cgcgagacga tgcggcagga ggtcaacgag gagatccgt ccggccgggt cttcgacacg
1201 gtcgtcgact tcgacaaggc cctgcgcgac ccgtacgacc cgcgcggat gcgctccgac
1261 tacgacagcg gcgaccacct gcaccccgcc gacaaggggt acgcgcgat gggcgcggtc
1321 atcgacctgg ccgcgctgaa gggcgcgggc ccggtcaagg cgtag

```

Figura 22 (SEC ID nº 26)

```

1  mtsmsrarva rriaagaayg gggiglagaa avglvvaevq larrrvvgvt ptrvpnaqgl
61  yggtilptagd pplrlmmlgd staagqgvhr agqtpgalla sglaavaerp vrlgsvaqpg
121 acsddldrqv alvlaepdrv pdicvimvga ndvthmpat rsvrhlssav rrlrtagaev
181 vvgtecpdlgt iervrqplrw larrasrqla aaqtigaveq ggtrvslgdl lgpefaqnpr
241 elfgpdnyhp saegyataam avlpsvcaal glwpadeehp dalrregflp varaaaaeas
301 eagtevaaam ptgprgpwal lkrrrrrrvs eaepsspsgv

```

Figura 23 (SEC ID nº 27)

```

1  atgacgagca tgtcgagggc gaggggtggcg cggcgatcg cggccggcgc ggcgtacggc
61  ggcggcgcca tcggcctggc gggagcggcg gcggtcggtc tgggtggtggc cgaggtgcag
121 ctggccagac gcaggggtggg ggtgggcaag ccgaccggg tgccgaacgc gcagggactg
181 tacggcgcca ccctgcccac ggccggcgac ccgcgcgtgc ggctgatgat gctggcgac
241 tccacggccg ccgggcaggg cgtgcaccgg gccgggcaga cgcggggcgc gctgctggcg
301 tccgggctcg cggcggtggc ggagcggccg gtgcggctgg ggtcggtcgc ccagccgggg
361 gcgtgctcgg acgacctgga ccggcagggtg gcgctggtgc tcgccagacc ggaccgggtg
421 cccgacatct gcgtgatcat ggtcggcgcc aacgacgtca cccaccggat gccggcgacc
481 cgctcgggtc ggcacctgtc ctcgcggtta cggcggtgc gcacggccgg tgcggagggtg
541 gtggtcggca cctgtccgga cctgggcacg atcgagcggg tcgggcagcc gctgcgtgg
601 ctggcccggc gggcctcacg gcagctcgcg gcggcacaga ccatcggcgc cgtcgagcag
661 ggcgggcgca cgggtgcgct gggcgacctg ctgggtcgg agttcgcgca gaaccccgcg
721 gagctcttcg gccccgaaa ctaccacccc tccgcgagg ggtacgccac ggccgcgatg
781 gcggtactgc cctcgggtgtg cgcgcgctc ggctgtggc cggccgacga ggagcaccgg
841 gacgcgctgc gccgcgaggg ctctctgcg gtggcgcgcg cggcgccgga ggcggcgctc
901 gaggcgggta cggagggtcg cgcgcgcatg cctacggggc ctcgggggcc ctgggcgctg
961 ctgaagcgcc ggagacggcg tcgggtgtcg gaggcggaac cgtccagccc gtccggcgctt
1021 tga

```

Figura 24 (SEC ID nº 28)

```

1 mgrgtdqrtr ygrrrarval aaltaavlgv gvagcdsvgg dspapsqspg krtrtapawd
61 tspasvaavg dsitrqfdac avlsdcpevs watgssakvd slavrllgka daaehswnya
121 vtgarmadlt aqvtraagre pelvavmaga ndacrsttsa mtpvadifraq feeamatlrk
181 klpkavvyvs sipdlkrlws qgrtnplgkq vwklglcpsm lgdadslds atlrntvrd
241 rvadynevlr evcakdrrecr sddgavhefr fgtdqlshwd wfhpssvdgga rlaeiayrav
301 taknp

```

Figura 25 (SEC ID nº 29)

```

1 atgggtcgag ggacggacca ggggacgcgg tacggccgtc gccgggcgcg tgtcgcgctc
61 gccgccctga ccgccgccgt cctgggcgtg ggcgtggcgg gctcgactc cgtgggcggc
121 gactaccccg ctcttccgg cagcccgctg aagcggacga ggacggcgcc cgcctgggac
181 accagcccg cgcccgctgc cgcctggggc gactccatca cgcggcgctt cgacgcctgt
241 gcggtgctgt cggactgccc ggaggtgtcg tgggcgaccg gcagcagcgc gaaggtcgac
301 tcgctggcgg tacggctgct ggggaaggcg gacgcggccg agcacagctg gaactacgcg
361 gtcaccgggg ccgggatggc ggacctgacc gctcaggtga cgcgggcggc gcagcgcgag
421 ccggagctgg tggcggtgat gggcgggggc aacgacgcgt gccgggtccac gacctcggcg
481 atgacgcggg tggcggactt ccgggcgcag ttcgaggagg cgatggccac cctgcgcaag
541 aagctcccca aggcgcaggt gtacgtgtcg agcatcccgg acctcaagcg gctctggtcc
601 cagggccgca ccaaccgcgt gggcaagcag gtgtggaagc tcggcctgtg ccgctcgatg
661 ctgggcgacg cggactccct ggactcggcg gcgaccctgc ggcgcaacac ggtgcgcgac
721 cgggtggcgg actacaacga ggtgctgcgg gaggtctgcg cgaaggaccg gcggtgccgc
781 agcgacgacg gcgcggtgca cgagttccgg ttcggcacgg accagttgag ccactgggac
841 tggttccacc cgagtggtga cggccaggcc cggctggcgg agatcgccca ccgcgcggtc
901 accgcgaaga atccctga

```

Figura 26 (SEC ID nº 30)

```

1 mrlsrraata sallltpala lfgasaavsa priqatdyva lgdsyssgvv agsydsssgs
61 ckrstksypa lwaashtgtr fnftacsgar tgdvlakqlt pvnsqtdlvs itiggndagf
121 adtmittcnlq gesaclaria karayiqqtl paqldqvyda idsrapaaqv vvlgyprfyk
181 lggscavglg ekeraainaa addinavtak raadhgfafg dvnttfaghe lcsgapwlhs
241 vtlpvensyh ptangqskgy lpvlinsat

```

Figura 27 (SEC ID nº 31)

```

1 ttcatcacia cgaatgcaca acaccggcca tccgggtcat ccctgatcgt gggaatgggt
61 gacaagcctt cccgtgacga aagggtcctg ctacatcaga aatgacagaa atcctgctca
121 gggaggttcc atgagactgt cccgacgcgc ggccacggcg tccgcgtcc tcctcacccc
181 ggcgctcgcg ctcttcggcg cgagcgccgc cgtgtccgcg ccggaatcc aggccaccga
241 ctacgtggcc ctggcgact cctactcctc ggggggtcggc gcgggcagct acgacagcag
301 cagtggctcc tgtaagcgca gcaccaagtc ctaccggcc ctgtgggccc cctcgcacac
361 cggtagcgcg ttcaacttca ccgcctgttc gggcgccgc acaggagacg tgctggccaa
421 gcagctgacc ccggtcaact ccggcacga cctggtcagc attaccatcg gcggcaacga
481 cgcgggcttc gccgacacca tgaccacctg caacctccag ggcgagagcg cgtgcctggc
541 gcggatcgcc aaggcgcgcg cctacatcca gcagacgctg cccgcccagc tggaccaggt
601 ctacgacgcc atcgacagcc gggccccgc agcccaggtc gtcgtcctgg gctaccgcg
661 cttctacaag ctggggcgca gctgcgcgt cgggtctctg gagaagtccc gcgcggccat
721 caacgcgcgc gccgacgaca tcaacgccgt caccgccaag cgcgcgcgc accacggctt
781 cgccttcggg gacgtcaaca cgacctcgc cgggcacgag ctgtgctccg gcgccccctg
841 gctgcacagc gtcacccttc ccgtggagaa ctctaccac cccacggcca acggacagtc
901 caagggtac ctgcccgtcc tgaactccgc cacctgatct cgcggctact ccgcccctga
961 cgaagtccc cccccggcg gggcttcgcc gtaggtgcgc gtaccgcgt cgcgcgtcgc
1021 gccggtggcc ccgcgctacg tgccgcgcgc cccggacgcg gtcgggtc

```

Figura 28 (SEC ID nº 32)

```

1   MKKWFVCLLG LVALTVQAAD SRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
51  SSPPYEGRF SNGPVWLEQL TKQPPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNP
101 YQVINNL DYE VTQFLQKDSF KPDDLVLWV GANDYLAYGW NTEQDAKVR
151 DAISDAANRM VINGAKQILL FNLPDLGQNP SARSQKVVEA VSHVSAYHNO
201 LLLNLARQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNEL LAQAVASPM RRSASPLNCE
301 GKMFWDQVHP TTVVHAALSE RAATFIANQY EFLAH*

```

Figura 29 (SEC ID n°33)

```

1  ATGAAAAAAT GGTTCGTGTG TTTATTGGGA TTGGTCGCGC TGACAGTTCA
   TACTTTTTTA CCAAACACAC AAATAACCCT AACCAGCGCG ACTGTCAAGT

51  GGCAGCCGAC AGTCGCCCCG CCTTTTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG TCAGCGGGGC GGAAAAGGGC CTAGCACTAC AAGCCGCTGT

101 GCCTCTCCGA TACCGGCAAA ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT ATGGCCGTTT TACATGTCTG TCTACGCGCC AATGGAGGGG

151 TCCAGCCCGC CCTACTATGA GGGCCGTTTC TCCAACGGAC CCGTCTGGCT
   AGGTCGGGCG GGATGATACT CCCGGCAAAG AGGTTGCCTG GGCAGACCGA

201 GGAGCAGCTG ACCAAACAGT TCCCGGGTCT GACCATCGCC AACGAAGCGG
   CCTCGTCGAC TGGTTTGTCA AGGGCCAGA CTGGTAGCGG TTGCTTCGCC

251 AAGGCGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
   TTCCGCCACG GTGACGGCAC CGAATGTTGT TCTAGAGGAC CTTAGGGTTC

301 TATCAGGTCA TCAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCTTGAGAA
   ATAGTCCAGT AGTTGTTGGA CCTGATGCTC CAGTGGGTCA AGAACGTCTT

351 AGACAGCTTC AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG
   TCTGTGCAAG TTCGGCCTGC TAGACCACTA GGAGACCCAG CCACGGTTAC

401 ACTATCTGGC CTATGGCTGG AACACGGAGC AGGATGCCAA GCGGGTTCGC
   TGATAGACCG GATACCGACC TTGTGCCTCG TCCTACGGTT CGCCCAAGCG

451 GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG GFACTGAACG GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT CGTACGCCG GTTGGCGTAC CATGACTTGC CACGGTTCGT

501 GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCCG TCAGCTCGCA
   CTATGACGAC AAGTTGGACG GCCTAGACCC GGTCTTGGGC AGTCGAGCGT

551 GTCAGAAGGT GGTCGAGGCG GTCAGCCATG TCTCCGCCTA TCACAACCAG
   CAGTCTTCCA CCAGCTCCGC CAGTCGGTAC AGAGGCGGAT AGTGTGGGTC

601 CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCC CCCACCGGCA TGGTAAAGCT
   GACGACGACT TGGACCGTGC GGTGACCCGG GGGTGGCCGT ACCATTTCGA

651 GTTCGAGATC GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG CTGTTCTGTA AACGGCTCTA CGACGCACTA GGCGTCTTGA

701 TCGGCCTGAG CGACGTCGAG AACCCTGCT ACGACGGCGG CTATGTGTGG
   AGCCGGACTC GTCGAGCTC TTGGGGACGA TGCTGCCGCC GATACACACC

751 AAGCCGTTTG CCACCCGAGC CGTCAGCACC GACCGCCAGC TCTCCGCCTT
   TTCGGCAAAC GGTGGGCGTC GCAGTCGTGG CTGGCGGTCT AGAGGCGGAA

801 CAGTCCGAGC GAACGCCTCG CCATCGCCGG CAACCCGCTG CTGGCACAGG
   GTCAGGCGTC CTGCGGAGC GGTAGCGGCC GTTGGGCGAC GACCGTCTCC

851 CCGTTGCCAG TCCTATGGCC CGCCGAGCG CCAGCCCCCT CAACTGTGAG
   GGCAACGGTC AGGATACCGG GCGGCGTCCG GGTGCGGGGA GTTGACACTC

901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTCTG TGCACGCAGC
   CCGTTCTACA AGACCCTAGT CCATGTGGGC TGGTGACAGC ACGTGCGTCTG

951 CCTGAGCGAG CGCGCCGCCA CCTTCATCGC GAACCACTAC GAGTTCCTCG
   GGACTCGCTC GCGCGGCGGT GGAAGTAGCG CTTGGTCATG CTCAAGGAGC

1001 CCCAC TGA
      GGGTG ACT

```

Figura 30 (SEC ID nº 34)

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

Figura 31 (SEC ID nº 35)

```

1  ATGAAAAAAT GGTGTTGTTT TTTATTGGGG TTGATCGCGC TGACAGTTCA
   TACTTTTTTA CCAAACAAAC AAATAACCCC AACTAGCGCG ACTGTCAAGT

51  GGCAGCCGAC ACTCGCCCCG CTTTCTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG TGAGCGGGGC GGAAGAGGGC CTAGCACTAC AAGCCGCTGT

101 GCCTCTCCGA TACCGGCAAA ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT ATGGCCGTTT TACATGTCGT TCTACGCGCC AATGGAGGGG

151 TCCAGCCCCG CCTACTATGA GGGCCGTTTC TCCAACGGAC CCGTCTGGCT
   AGGTCGGGCG GGATGATACT CCCGGCAAAG AGGTTGCCTG GGCAGACCGA

201 GGAGCAGCTG ACCAAGCAGT TCCCAGGTCT GACCATCGCC AACGAAGCGG
   CCTCGTCGAC TGGTTCGTCA AGGGCCGAGA CTGGTAGCGG TTGCTTCGCC

251 AAGGCGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
   TTCGCCACG GTGACGGCAC CGAATGTTGT TCTAGAGGAC CTTAGGGTTC

301 TATCAGGTCA TCAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCTTGAGAA
   ATAGTCCAGT AGTTGTTGGA CCTGATGCTC CAGTGGGTCA AGAACGTCTT

351 AGACAGCTTC AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG
   TCTGTGCAAG TTCGGCCTGC TAGACCACTA GGAGACCCAG CCACGGTTAC

401 ACTATCTGGC ATATGGCTGG AATACGGAGC AGGATGCCAA GCGAGTTCCG
   TGATAGACCG TATACCGACC TTATGCCTCG TCCTACGGTT CGCTCAAGCG

451 GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG GTACTGAACG GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT CGCTACGCGG GTTGGCGTAC CATGACTTGC CACGGTTCGT

501 GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG CCAGAACCCG TCAGCCCCGA
   CTATGACGAC AAGTTGGACG GCCTAGACCC GGTCTTGGGC AGTCGGGCGT

551 GTCAGAAAGT GGTGAGGGCG GTCAGCCATG TCTCCGCCTA TCACAACAAG
   CAGTCTTCCA CCAGCTCCGC CAGTCGGTAC AGAGGCGGAT AGTGTGTTTC

601 CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCC CCCACCGGCA TGGTAAAGCT
   GACGACGACT TGGACCGTGC GGTGACCGG GGGTGGCCGT ACCATTTCGA

651 GTTCGAGATC GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG CTGTTGTTA AACGGCTCTA CGACGCACTA GGCGTCTTGA

701 TCGGCCTGAG CGACGTCGAG AACCCCTGCT ACGACGGCGG CTATGTGTGG
   AGCCGGACTC GCTGCAGCTC TTGGGGACGA TGCTGCCGCC GATACACACC

751 AAGCCGTTTG CCACCCGCAG CGTCAGCACG GACCGCCAGC TCTCCGCCTT
   TTCGGCAAAC GGTGGGCGTC GCAGTCGTGG CTGGCGGTG AGAGGCGGAA

801 CAGTCCGCAG GAACGCCTCG CCATCGCCGG CAACCCGCTG CTGGCACAGG
   GTCAGGCGTC CTTGCGGAGC GGTAGCGGCC GTTGGGCGAC GACCGTGTCC

851 CCGTTGCCAG TCCTATGGCC CGCCGACGCG CCAGCCCCCT CAACTGTGAG
   GGCAACGGTC AGGATACCGG GCGGCGTCGC GGTGGGGGGA GTTGACACTC

901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTGCG TGCACGCAGC
   CCGTTCTACA AGACCCTAGT CCATGTGGGC TGGTGACAGC ACGTGCCTCG

951 CCTGAGCGAG CGCGCCGCCA CCTTCATCGA GACCCAGTAC GAGTTCCTCG
   GGACTCGCTC GCGCGGCGGT GGAAGTAGCT CTGGGTCATG CTCAAGGAGC

1001 CCCACGGATG A
     GGGTGCCTAC T

```

Figura 32

	1	10	20	30	40	50
	-----+-----+-----+-----+-----					
satA	ADTRPAFSRIYHFGDSLSDTGKMYSKHRGYLPSSPPYYEGRFSN--G					
R.sol	QSGNPNYAKVQRMVYVFGDSLSDIGT-----YTPVAQAYGGGKFTTNP					
Consenso	...adnraafqRiYnFGDSLSDiGk.....YlPsaqaygeGrFsn..G					
	51	60	70	80	90	100
	-----+-----+-----+-----+-----					
satA	PYWLEQLTKQFPGLTIANEAEAGGATAYAYNKISWNPKYQVINNLQYEYVQ					
R.sol	PIWAETVAAQL-GVTLTPAYHGYATSVQNCPKAGCFDYAQGGSRVTPNG					
Consenso	P!WaEqlaaQL,GlTianaaeGgATaYannkiagnfdYaqgnnrdt#pnq					
	101	110	120	130	140	150
	-----+-----+-----+-----+-----					
satA	FLQKDSFKPDDLVIHVGANDYLAYG--HNTAQDAKRYRDAISDAANRMV					
R.sol	IGHNGGAGALTYPYQQQLANFYAASNNTFNGHNDVYVYLAGSNDIFFWTT					
Consenso	igqndgagaddlp!qqqgANdYaasn..fNg##DakrYraainDaanrnt					
	151	160	170	180	190	200
	-----+-----+-----+-----+-----					
satA	LNGAKQILLFNLPLDQGQNPSSARSQKYVEAYSHVSAYHNKL-LLNLARQLA					
R.sol	AAATSGSGVTPAIATAQYQQAAATDLVGYVKDHIKAGATQYVYFNLPSL					
Consenso	aaaakqiglfnaialaQnqqAas#lVgeakdh!aaganql,11NLarqla					
	201	210	220	230	240	250
	-----+-----+-----+-----+-----					
satA	PTGMVYKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDVENPCYDGGYVYKPFATRSYST					
R.sol	TPDGVASGTTGQALLHALYGTFTNTTLQSGLAGTSARIIDFNAQLTAAIQN					
Consenso	ppdgValgeidqalaeaLrdpqNfgLqdgeagcsargidfnagaTaa!qn					
	251	260	270	280	290	300
	-----+-----+-----+-----+-----					
satA	DRQLSAFSPQERLAIAG--NPLLAQAYASPM---ARRSASPLNCEGKMFH					
R.sol	GASFGFANTSARACDARKINALYPSAGGSSLFCSANTLYASGADQSYLFA					
Consenso	daqlgaanpqaRaadAg..NaLlaqAgaSp\$...Arrlaapgad#gk\$Fa					
	301	310	320	330		
	-----+-----+-----					
satA	DQYHPTTVYHAALSERATFIETQYEFLAH					
R.sol	DGVHPTTAGHRLIASNVLARLLA--DNVAH					
Consenso	DqYHPTTagHaaiaeraaariae..#nLAH					

Figura 33

Pfam	*->ivafGDSltddggg.....ayygdsdgggwgagladrltsla..rlrargrgvdv	
Srim1	38	YVALGDSYSSGVG.....agSYDSSSGSCKRSTKSYPALWAAS.....HTGTRF 81
Scoe1	5	YVAVGDSFTEG-----VGDPGPDGAFVGWADRLAVLL..ADRRPEGDFTY 47
Scoe2	10	LVAVGDSFTEG-----MSDLLPDGSYRGWADLLATRM...AARSPGFRY 50
Scoe3	239	VVAFGDSITDG-----ARSQSDANHRWTDVLAARLHEAA..GDGRDTPRYSV 283
Scoe4	75	LMMLGDSTAAG-----QGVHRAGQTPGALLASG..LAAVAERPVR 113
Scoe5	66	VAAVGDSITRGFD.....acAVLSDCPEVSWATGSSAKVDSLavlLGKADAAEHS 116
Ahyd1	28	IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpssppyYEGRFSGNPVWLEQLTNEFPGLTiaNEAEGGPTAVA 91
Asa11	28	IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpssppyYEGRFSGNPVWLEQLTKQF-----PGLTI 79
Ahyd2	40	IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpssppyYEGRFSGNPVWLEQLTKQFPGLTiaNEAEGGATAVA 103

Pfam	fnrgisGrtsdGrlvvDarlvatl1FlagflGlnlpPYLsgdflrGANFasagAtilgtslipflni	
Srim1	82	NFTACSGAR----- 90
Scoe1	48	TNLAVRGRL----- 56
Scoe2	51	ANLAVRGKL----- 59
Scoe3	284	VNEGISGNR----- 292
Scoe4	114	GSVAQPGAC----- 122
Scoe5	117	WNYAVTGAR----- 125
Ahyd1	92	YNKISWNPK----- 100
Asa11	80	ANEAEGGAT----- 88
Ahyd2	104	YNKISWNPK----- 112

Pfam	QvqFkdfkskvlelrqa.....lgllqellrlvpvldakspdlvtimiGtNDl...itvakfgpks	
Srim1	91	-----TGDVLAKQLTPVNSGTDLVSITIGNDagfaDTMTTCNLQG 131
Scoe1	57	-----LDQIVAEQVPRVVG LAPDLVSFAAGNDI.....I----- 86
Scoe2	60	-----IGQIVDEQVDVAAAMGADVITLVGGLNDT..... 88
Scoe3	293	-----LLTSRPGRPA.....DNPSGLSRFQRDVLERTNVKAVVVVLGVNDV..... 333
Scoe4	123	-----SDDLDRQVALVLAEPDRVPDICVIMVGANDV..... 153
Scoe5	126	-----MADLTAQVTRAAQREPELVAVMAGANDA.....CR 155
Ahyd1	101	-----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY.....LA 137
Asa11	89	-----AVAYNKISWNpkyqyNNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY.....LA 137
Ahyd2	113	-----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY.....LA 149

Pfam	tksdrrnsvpefrdnlrklkrLrsangariil1tlvllnpl.....plGC1	
Srim1	132	esacIARAYIQQTLPAQLDQVYDAIDSRAPAA-----QVVVLGYP..... 176
Scoe1	87	-----RPGTDPDEVAERFELAVAALT-AAAGTVLVTGFDTRGVP..... 125
Scoe2	89	-----LRPKCDMARVRDLLTQAVERLAPHCEQLVLMRSP..... 122
Scoe3	334	-----LNSPELADRDAILTGLRTLVDRAHARGLRVVGATITPFGGYGG..... 376
Scoe4	154	-----THRMPATRSVRHLSSAVRRLR-TAGAEVVVGTCPDLTGIE..... 192
Scoe5	156	-----STTSAMTPVADFRAQFEEAMATLR-KKLPKAQVYVSSIPDLKRLwsqgrtnplgkQVWK 214
Ahyd1	138	-----YGWNTQDAKVRDAISDAANRMV-LNGAK-----EILLENLP..... 174
Asa11	138	-----YGWNTQDAKVRDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLENLP..... 174
Ahyd2	150	-----YGWNTQDAKVRDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLENLP..... 186

Pfam	pq.klalalassknvdatgclerlneavadynealrelaei.ek.l.q.aqlrkdgldpdlkeanvpy	
Srim1	177	--RFYKLGGSACVGLSEKSRAAINAADDINAVTAKRA-----ADHGFAF 219
Scoe1	126	-----VLKHLRGKIATYNHVRRAIA-----DRYGCVP 152
Scoe2	123	-----GRQGPVLERFRPRMEALFAVIDDLA-----GRHGAVV 154
Scoe3	377	--YTEARETMREQVNEEIRSGRVFDTVDFDKALRDPY----- 412
Scoe4	193	-----RVRQPLRWLaRRaSrQLAAQTIGAVEQGGRTVSL 227
Scoe5	215	GLcPSMLGDADSLDSAAATLRRNTVRDRVADYNEVLREVC-----AkDRRCRSDDGAVHEFRFGT 273
Ahyd1	175	-----DLGQNPSARSQKVVEASHVSAYHNQLLLNLA-----RQLAPTGMVKLFEIDKQF 224
Asa11	175	-----DLGQNPSARSQKVVEASHVSAYHNQLLLNLA-----RQLAPTGMVKLFEIDKQF 224
Ahyd2	187	-----DLGQNPSARSQKVVEASHVSAYHNQLLLNLA-----RQLAPTGMVKLFEIDKQF 236

Pfam	VDlysifqldigiqnpsayv.y...Gfeet.kaCCGyGgr.yNyn.rv.CGnag.l.chk.vtakac	
Srim1	220	GDVNT-----TFAGHElCSGAPwL.HS.VT----- 242
Scoe1	153	LDLWSLRSVQDRRA----- 166
Scoe2	155	VDLYGAQSLADPRM----- 168
Scoe3	413	----- 413
Scoe4	228	GDLLGPEFAQNPREL----- 242

Scoe5 274 DQL----- 276

Ahyd1 225 AEMLRDPQNFGFLSDQRNACYgGsyvwwKPFASrSASTDSQLSaFNPQerLaIAGNPfLaQAvASPMaa 291

Asa11 225 AEMLRDPQNFGFLSDVENPCYdGgyvwwKPFATrSVSTDRQLSaFSPQerLaIAGNPfLaQAvASPMAR 291

Ahyd2 237 AEMLRDPQNFGFLSDVENPCYdGgyvwwKPFATrSVSTDRQLSaFSPQerLaIAGNPfLaQAvASPMAR 303

Pfam		.dassyll.atl1fwDgf.hpsekGykavAeal<-*	
Srim1	243	-----LPVENSyHPTANGOSKGYLPV	263
Scoe1	167	-----WDADRL.HLSPEGHTRVALRA	186
Scoe2	169	-----WDVDRL.HLTAEGHRRVAEAV	188
Scoe3	413	-----DPRMRsDYDSGDHL.HPGDKGYARMGAVI	441
Scoe4	243	-----FGPDNY.HPSAEGYATAAMAV	262
Scoe5	277	-----SHWDWF.HPSVDGQARLAEIA	296
Ahyd1	292	rSASTLNCeGKMFWDDQV.HPTTVVHAALSEPA	322
Ahyd1	292	rSASPLNCeGKMFWDDQV.HPTTVVHAALSEPA	322
Ahyd2	304	rSASPLNCeGKMFWDDQV.HPTTVVHAALSEPA	334

Figura 34

Pfam	*->ivafGDSltldggg.....ayygdsgggwgagladrltsla..rlrargrgv		
Srim1	38	YVALGDSYSSGVG.....agSYDSSSGSCKRSTKSYPALWAAS.....HTGTRF	81
Scoe1	5	YVAVGDSFTEG-----VGDPGPDGAFVGVADRLAVLL..ADRRPEGDFTY	47
Scoe2	10	LVAVGDSFTEG-----MSDLLPDGSYRGWADLLATRM...AARSPGFRY	50
Ahyd1	28	IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpspppyYEGRFSGNPVWLEQLTNEFFGLTiaNEAEGGPTAVA	91
Asa11	28	IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpspppyYEGRFSGNPVWLEQLTKQF-----PGLTI	79
Ahyd2	40	IVMFGDSLSDTGKmyskmrgylpspppyYEGRFSGNPVWLEQLTKQFPGLTiaNEAEGGATAVA	103

Pfam	fnrgisGrtsdGr1vvDarlvat1lFlaqflGlnlpPYLsgdflrGANFasagAt1lgtslipflni		
Srim1	82	NFTACSGAR-----	90
Scoe1	48	TNLAVRGRL-----	56
Scoe2	51	ANLAVRGKL-----	59
Ahyd1	92	YNKISWNPk-----	100
Asa11	80	ANEAEAGGAT-----	88
Ahyd2	104	YNKISWNPk-----	112

Pfam	QvqFkdfkskvlelrqa.....lgllqellrlvpvldakspdlvtimiGtNDl...itvakfgpks		
Srim1	91	-----TGDVLAKQLTPVNSGTDLVSTITIGGNDagfaDTMTTCNLQG	131
Scoe1	57	-----LDQIVAEQVPRVVGLAPDLVSFAAGGNDI.....I-----	86
Scoe2	60	-----IGQIVDEQVDVAAAMGADVITLVGGNLNDT.....	88
Ahyd1	101	-----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY.....LA	137
Asa11	89	-----AVAYNKISWNPkyqvyNNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY.....LA	137
Ahyd2	113	-----YQVI.....NNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDY.....LA	149

Pfam	tksdnrvsvpefrdnlrklikrLrsangariiiitl1vllnlp1p1GCl		
Srim1	132	esac1arIAKARAYIQQTLPALQLDQVYDAIDSRAAPAA-----QVVVLGYP-----	176
Scoe1	87	-----RPGTDPDEVAERFELAVAALT-AAAGTVLVTTGFDTRGVP-----	125
Scoe2	89	-----LRPKCDMARVRDLLTQAVERLAPHCEQLVLMRSP-----	122
Ahyd1	138	YGWNTQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK-----EILLFNLP-----	174
Asa11	138	YGWNTQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLFNLP-----	174
Ahyd2	150	YGWNTQDAKRVRDAISDAANRMV-LNGAK-----QILLFNLP-----	186

Pfam	pqklalalassknvdatgclerlneavadynealrelaeieklqaqlrkdgldpdlkeanvpy		
Srim1	177	--RFYKLGGSACVGLSEKSRAAINAAADDINAVTAKRA-----ADHGFAF	219
Scoe1	126	-----VLKHLRGKIATYNGHVRAIA-----DRYGCVP	152
Scoe2	123	-----GRQGPVLERFRPRMEALFAVIDDLA-----GRHGAVV	154
Ahyd1	175	-----DLGQNPSARSQKVVEAASHVSAYHNQLLNLNLA-----RQLAPTGMVKLFEDKQF	224
Asa11	175	-----DLGQNPSARSQKVVEAASHVSAYHNQLLNLNLA-----RQLAPTGMVKLFEDKQF	224
Ahyd2	187	-----DLGQNPSARSQKVVEAASHVSAYHNQLLNLNLA-----RQLAPTGMVKLFEDKQF	236

Pfam	VDlysifqldldgignpsayv.y....GFeet.kacCGyGgr.yNyn.rv.CGnag.l.ck.vtakaC		
Srim1	220	GDVNT-----TFAGHElCSGAPwL.HS.VT----	242
Scoe1	153	LDLWSLRSVQDRRA-----	166
Scoe2	155	VDLYGAQSLADPRM-----	168
Ahyd1	225	AEMLRDPQNFGLSQDQNCYgGsyvWKPFASrSASTDSQLSaFNPQeRLaIAGNP1LaQAvASPMAR	291
Asa11	225	AEMLRDPQNFGLSQDVENPCYdGgyvWKPFATrSVSTDRQLSaFSPQeRLaIAGNP1LaQAvASPMAR	291
Ahyd2	237	AEMLRDPQNFGLSQDVENPCYdGgyvWKPFATrSVSTDRQLSaFSPQeRLaIAGNP1LaQAvASPMAR	303

Pfam	.dassyll.atl1fwDgf.HpsekGykavAeal<-*		
Srim1	243	-----LPVENSyHPTANGQSKGYLPV	263
Scoe1	167	-----WDADRL.HLSPEGHTRVALRA	186
Scoe2	169	-----WDVDRL.HLTAEGHRRVAEAV	188
Ahyd1	292	rSASTLNCeGKMFWQDV.HPTTVVHAALSEPA	322
Asa11	292	rSASPLNCeGKMFWQDV.HPTTVVHAALSERAS	322
Ahyd2	304	rSASPLNCeGKMFWQDV.HPTTVVHAALSERAS	334

Figura 35

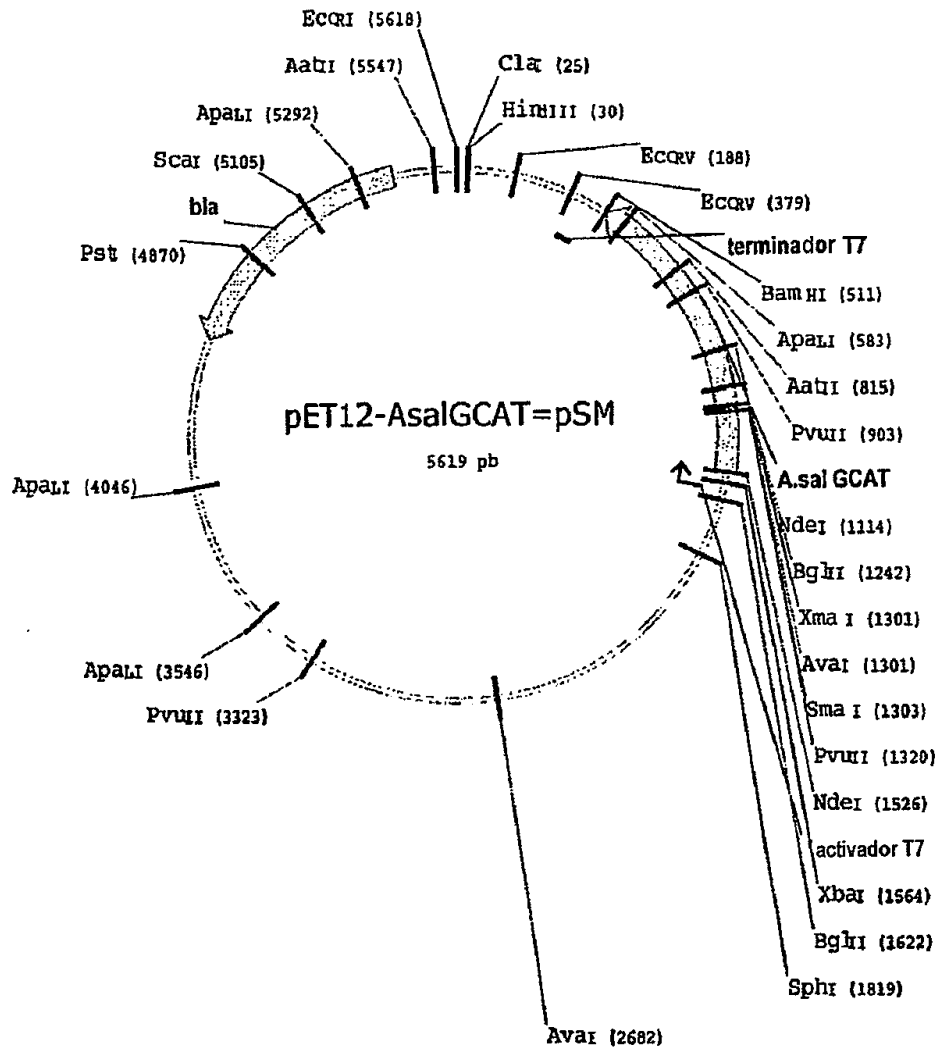


Figura 36

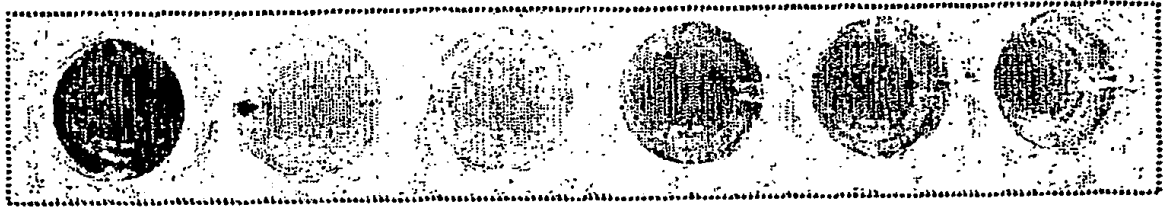


Figura 37



Figura 38

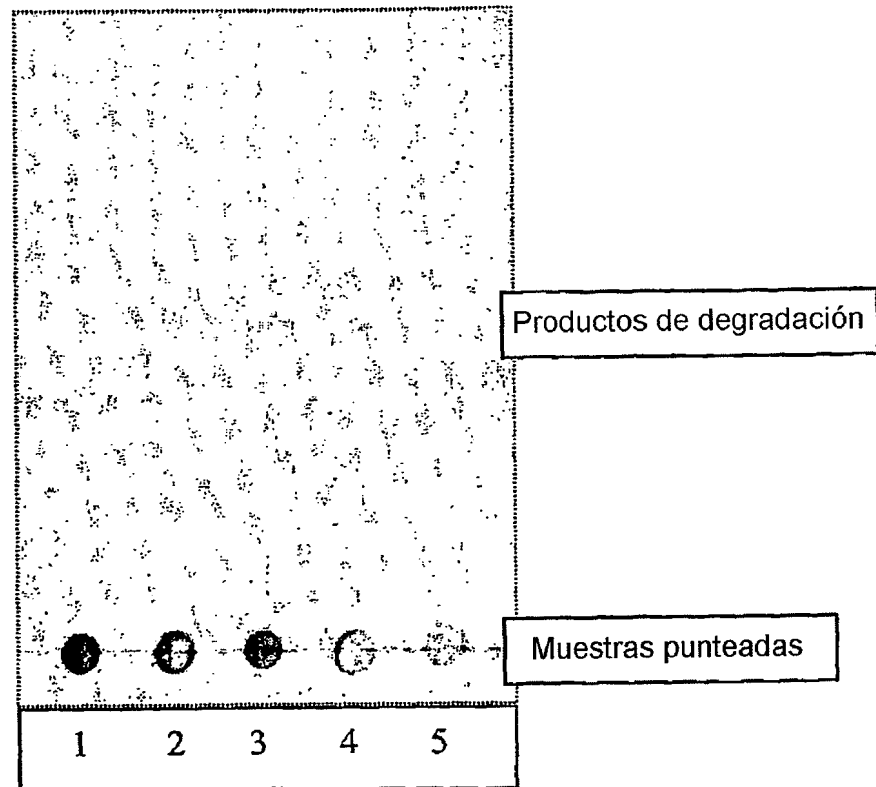


Figura 39

Referencias

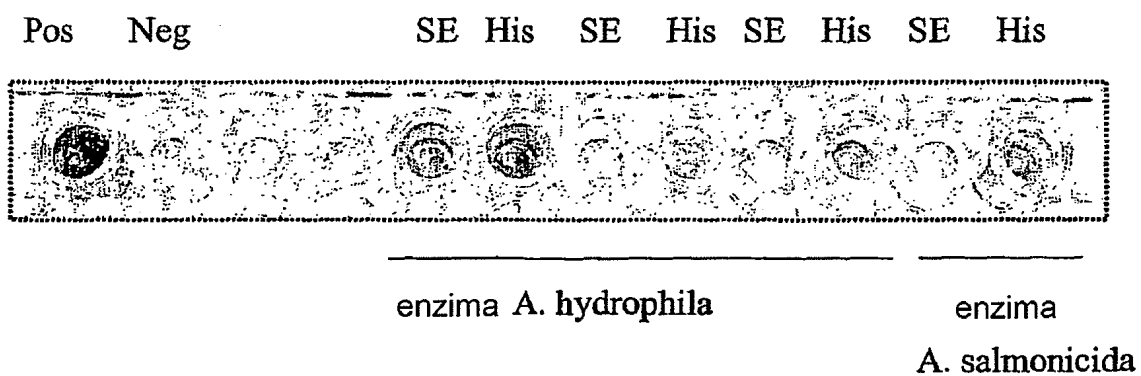


Figura 40.

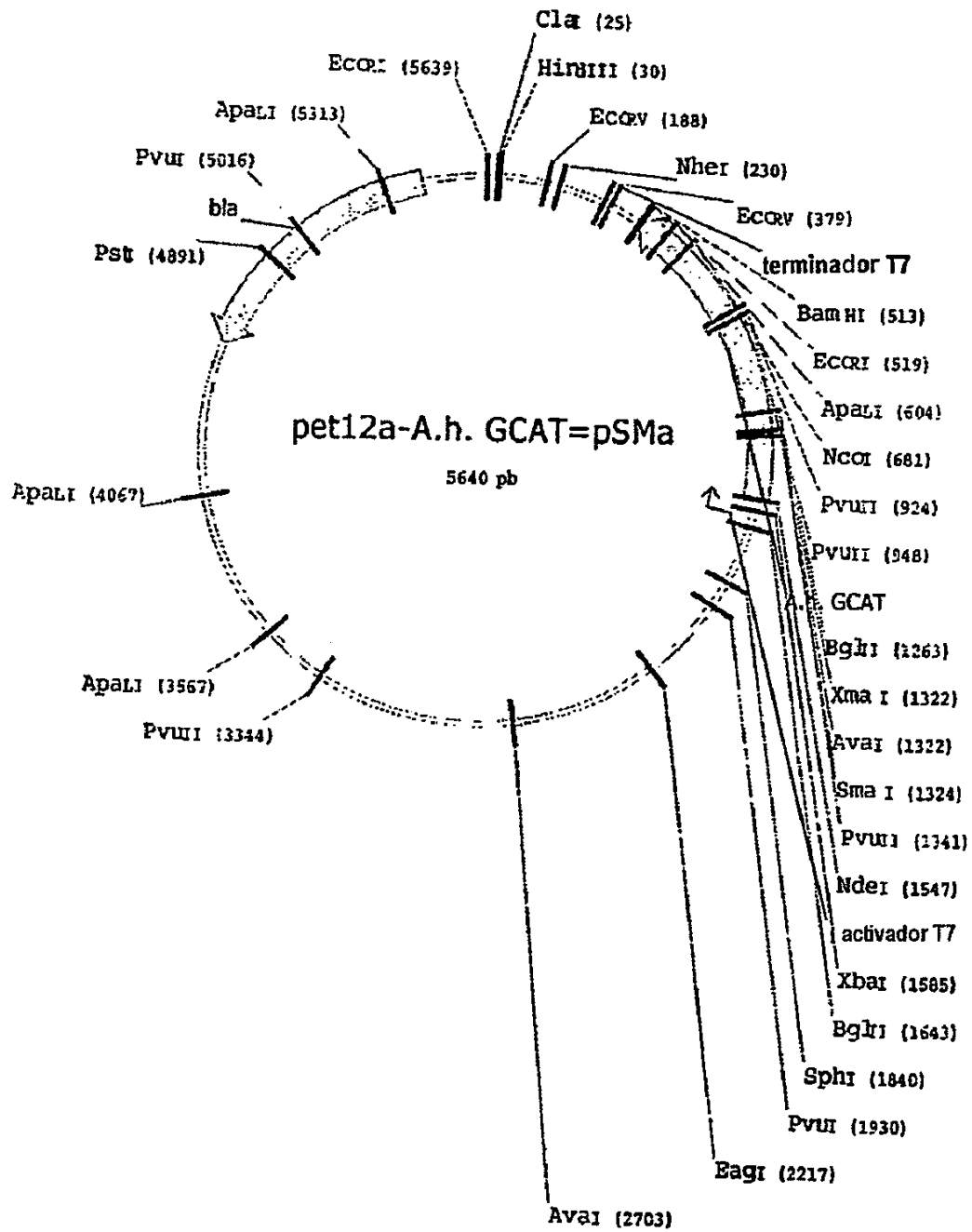


Figura 41:

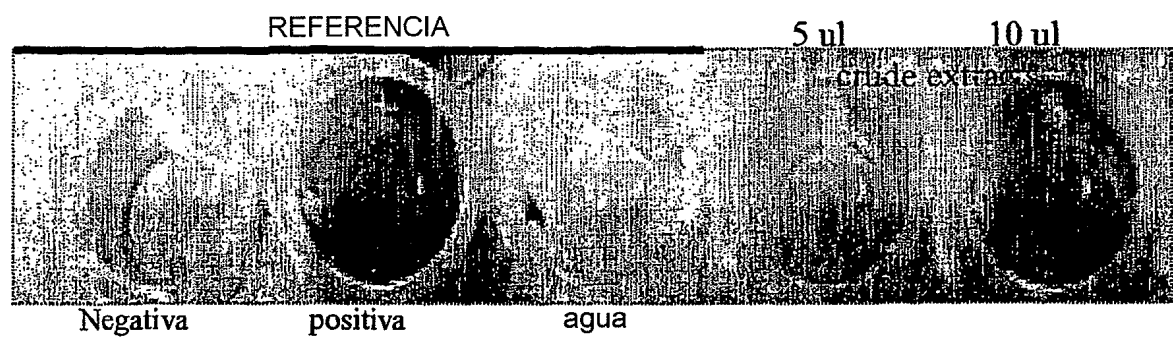


Figura 42

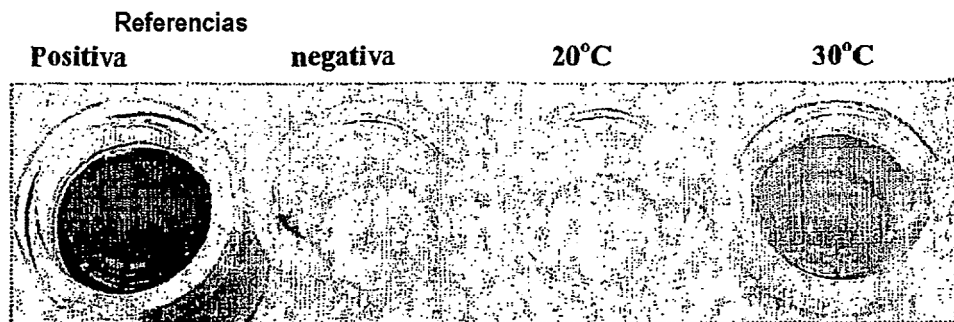


Figura 43

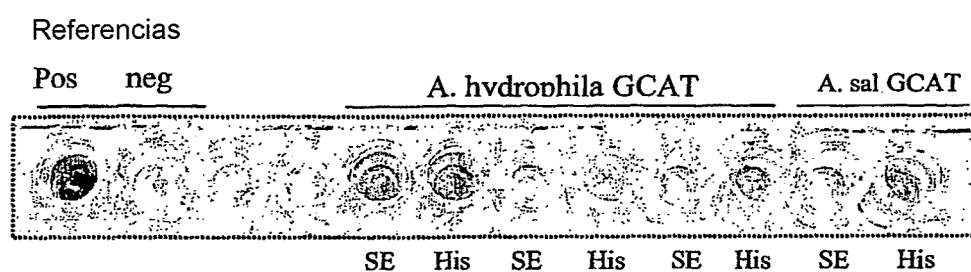


Figura 44

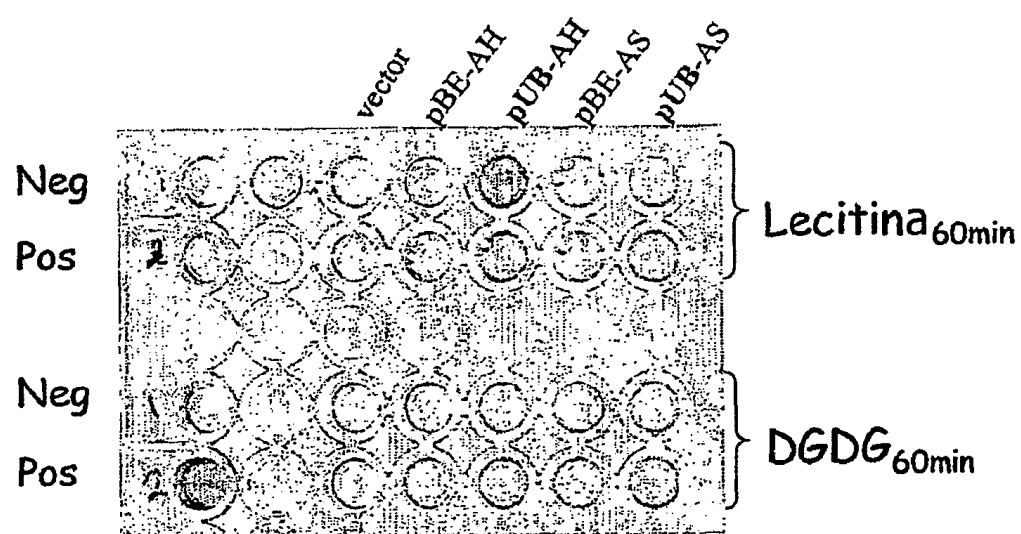


Figura 45

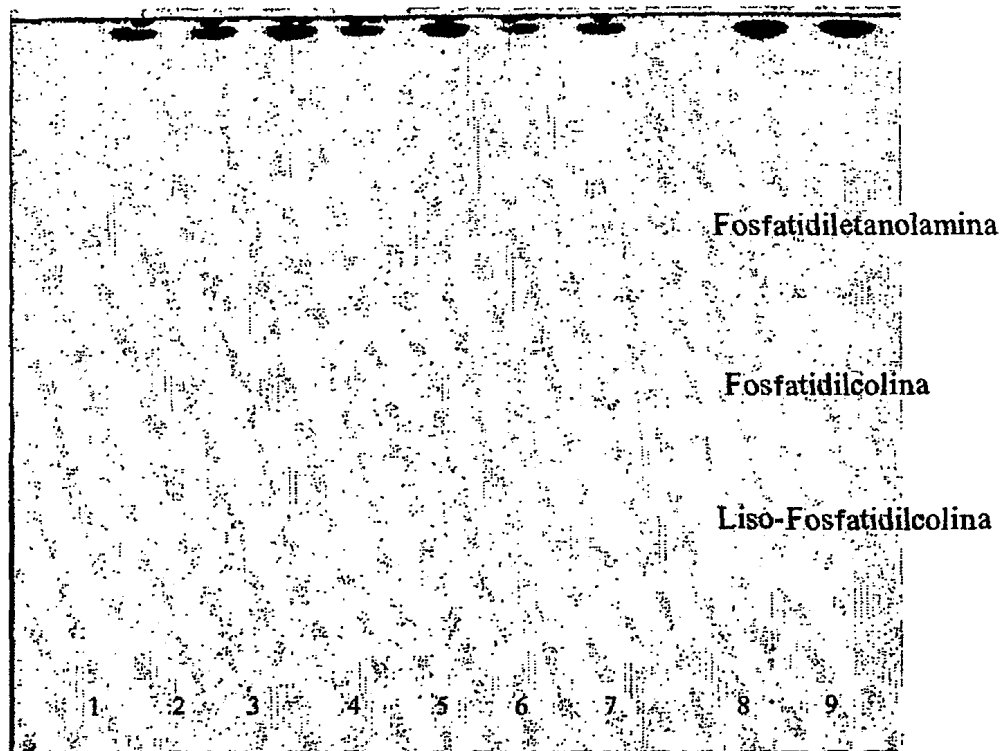


Figura 46

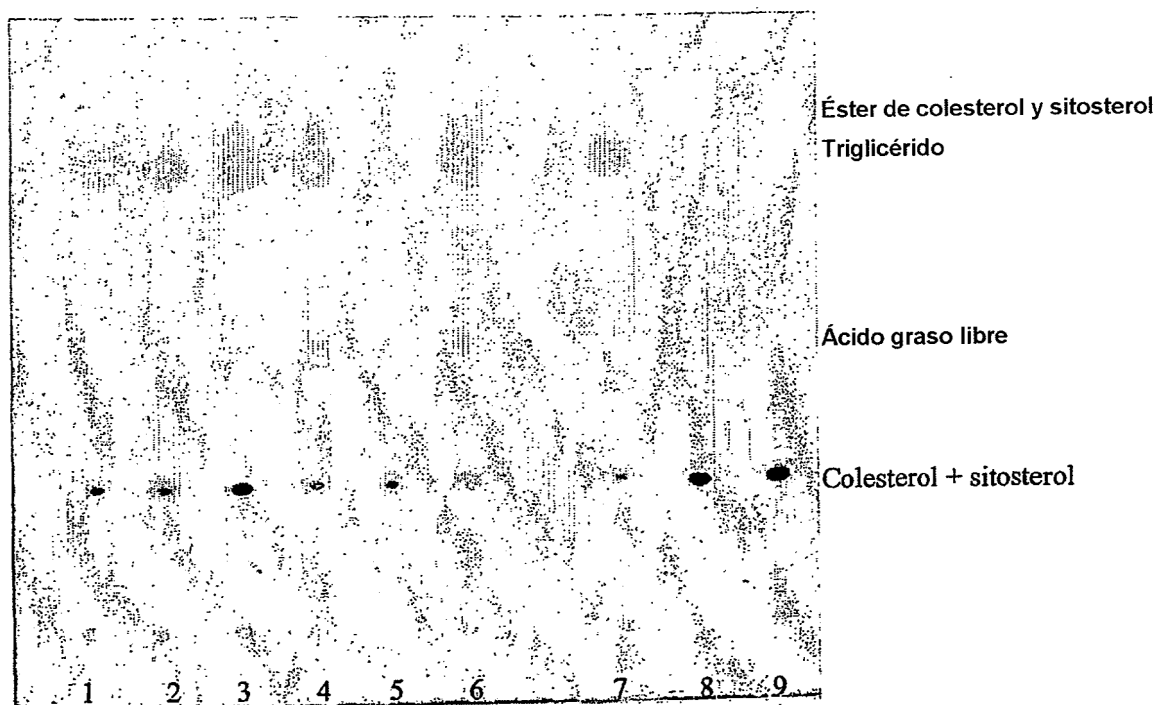


Figura 47

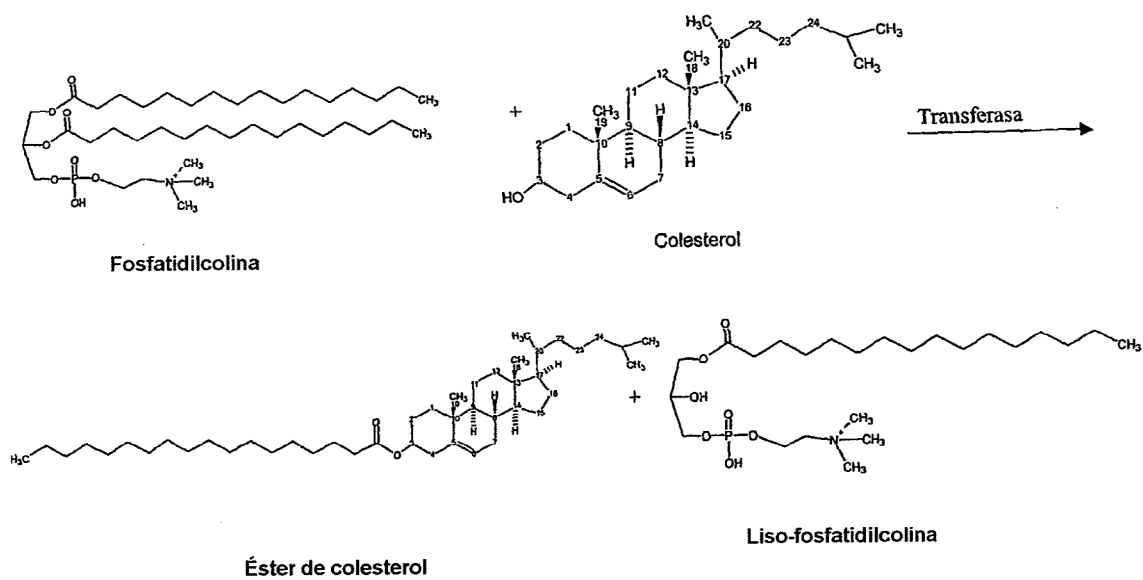


Figura 48

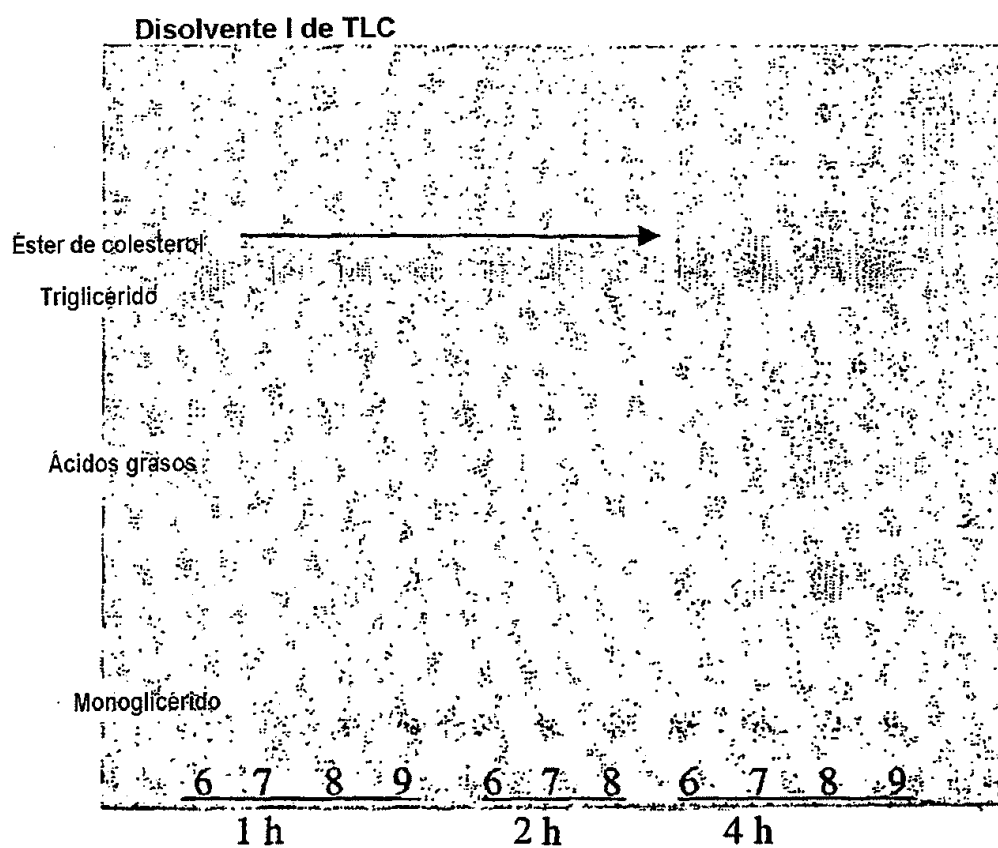


Figura 49

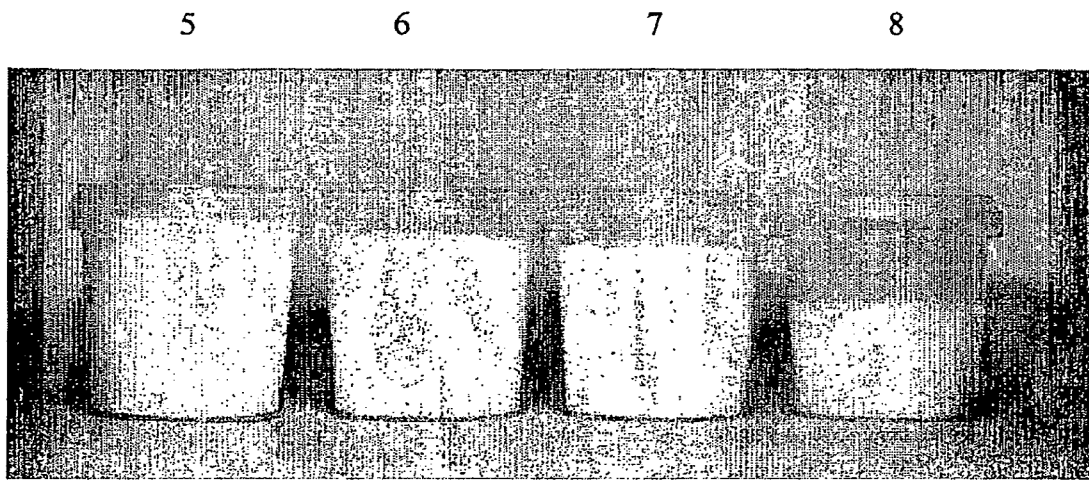


Figura 50

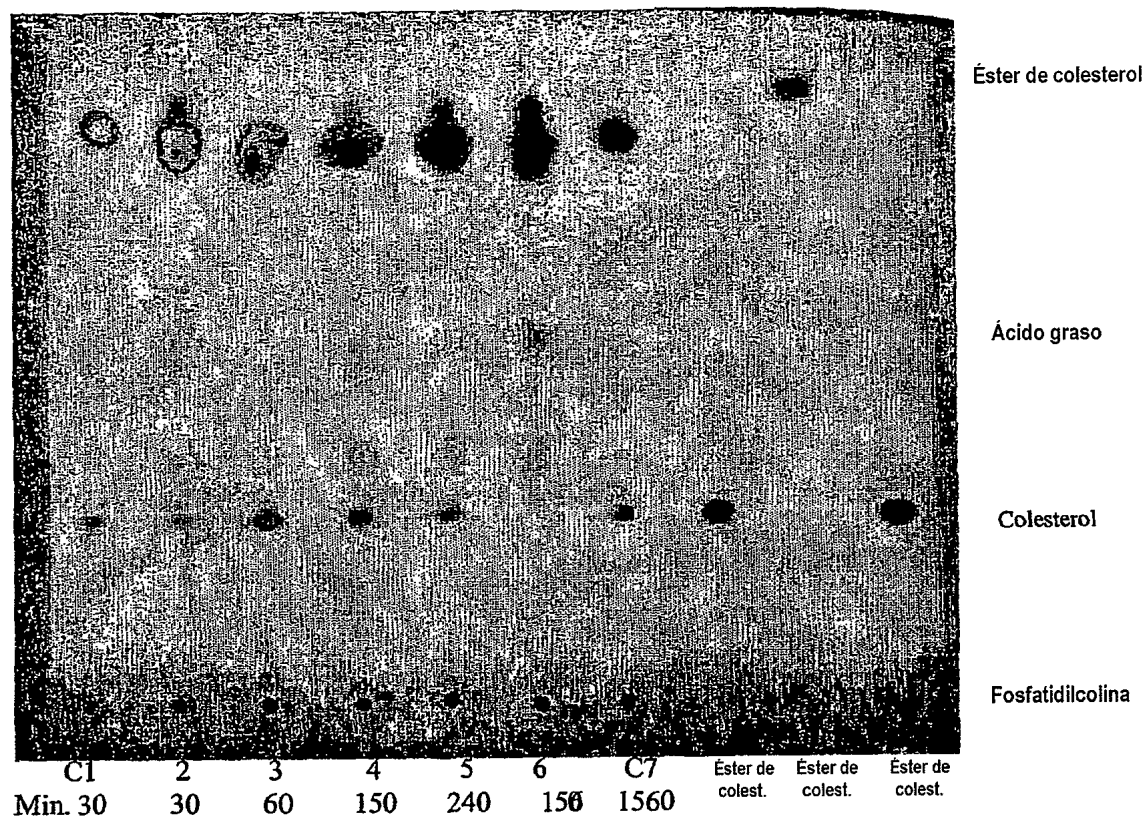


Figura 51

2254-82-5. TLC de lípido de yema de huevo tratado con transferasa nº 135

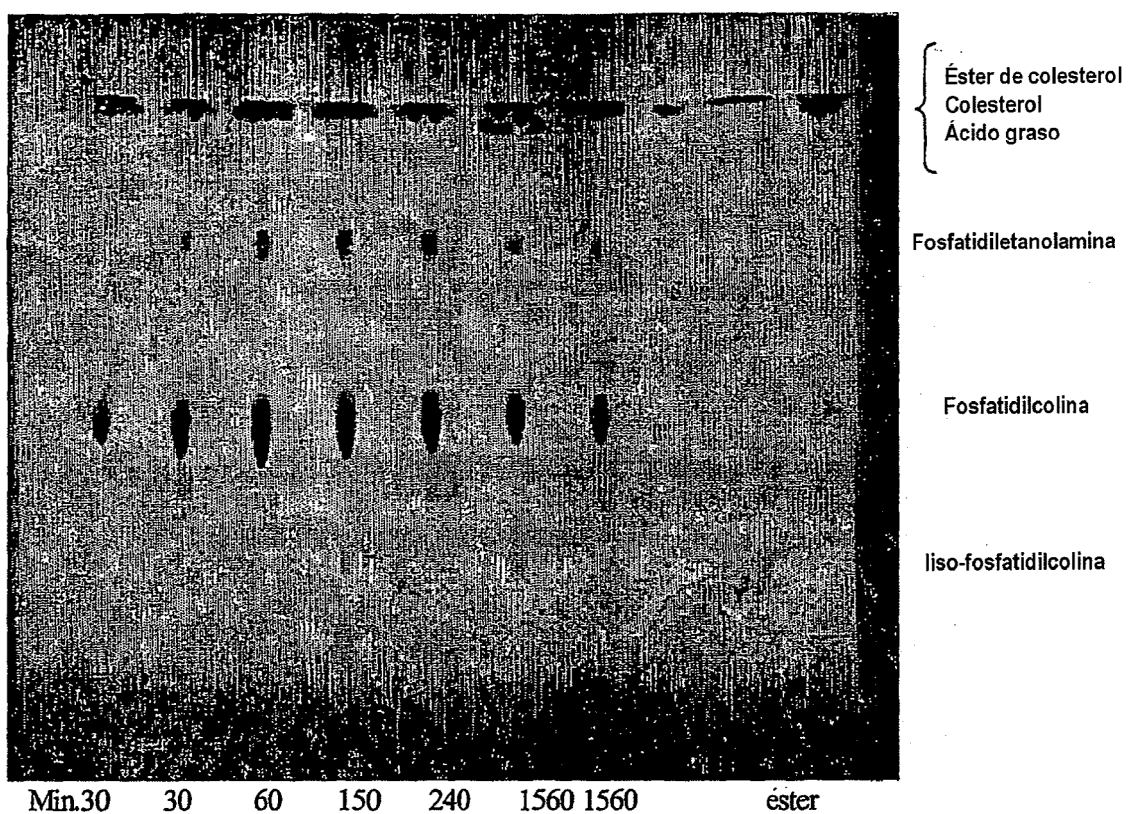


Figura 52

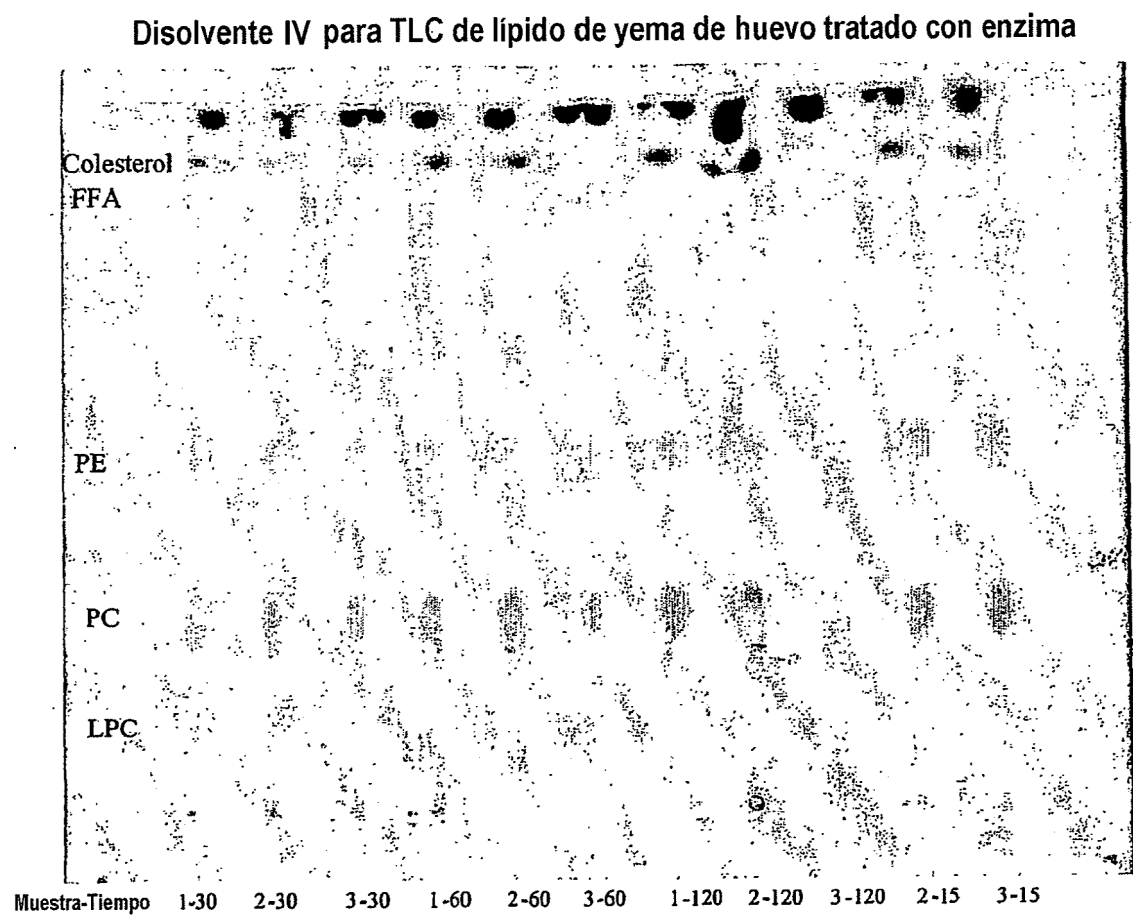


Figura 53

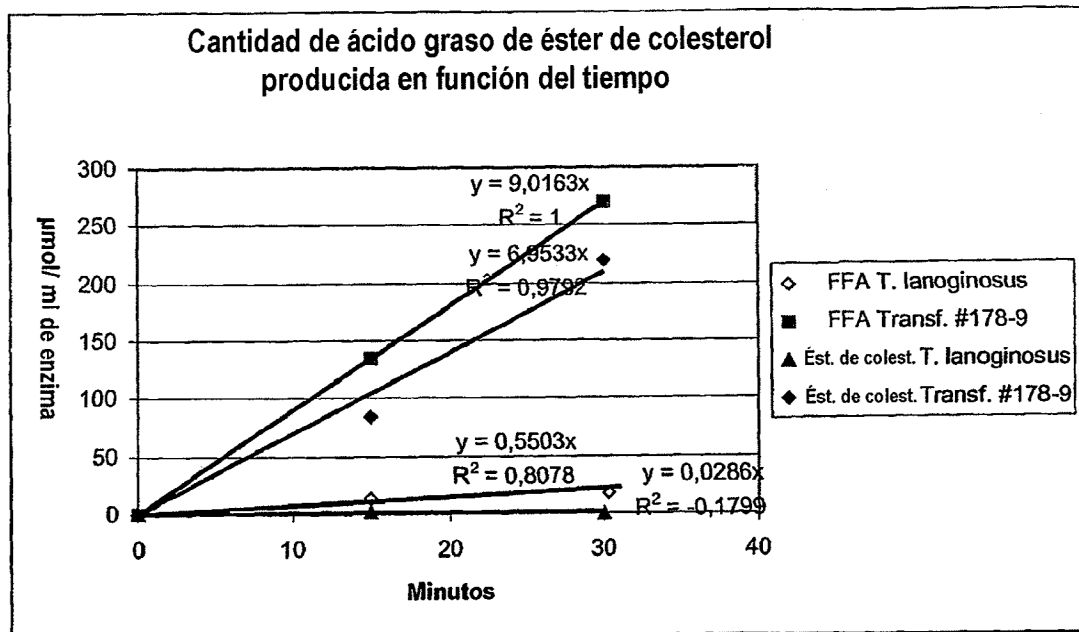


Figura 54

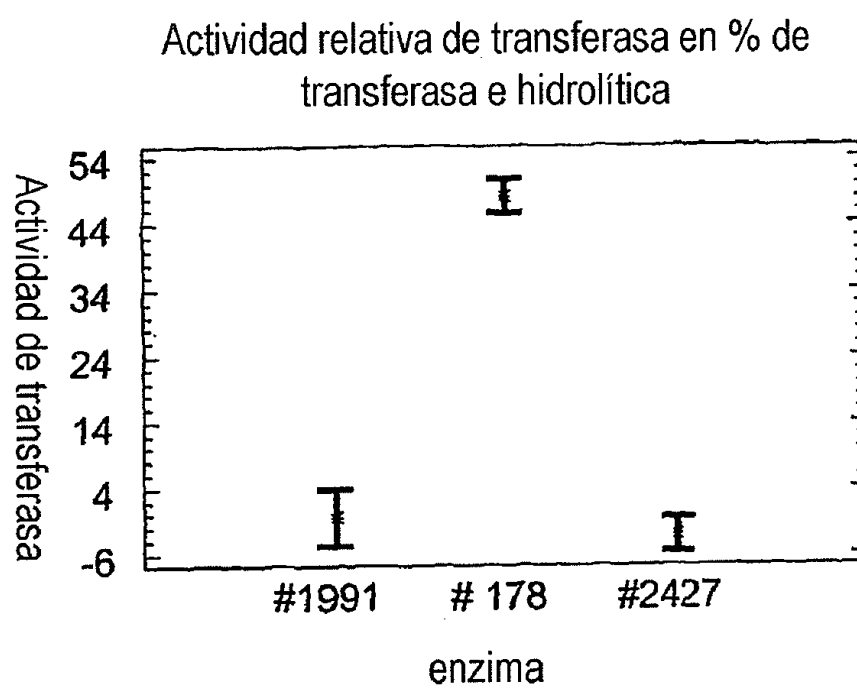


Figura 55

Actividad de transferasa para nº 178 en función
del % de agua en el ensayo

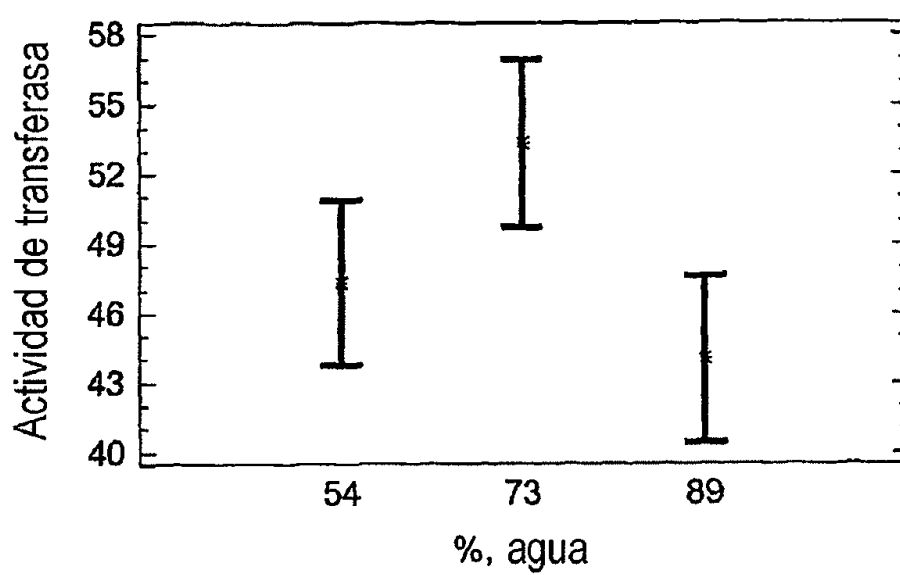


Figura 56

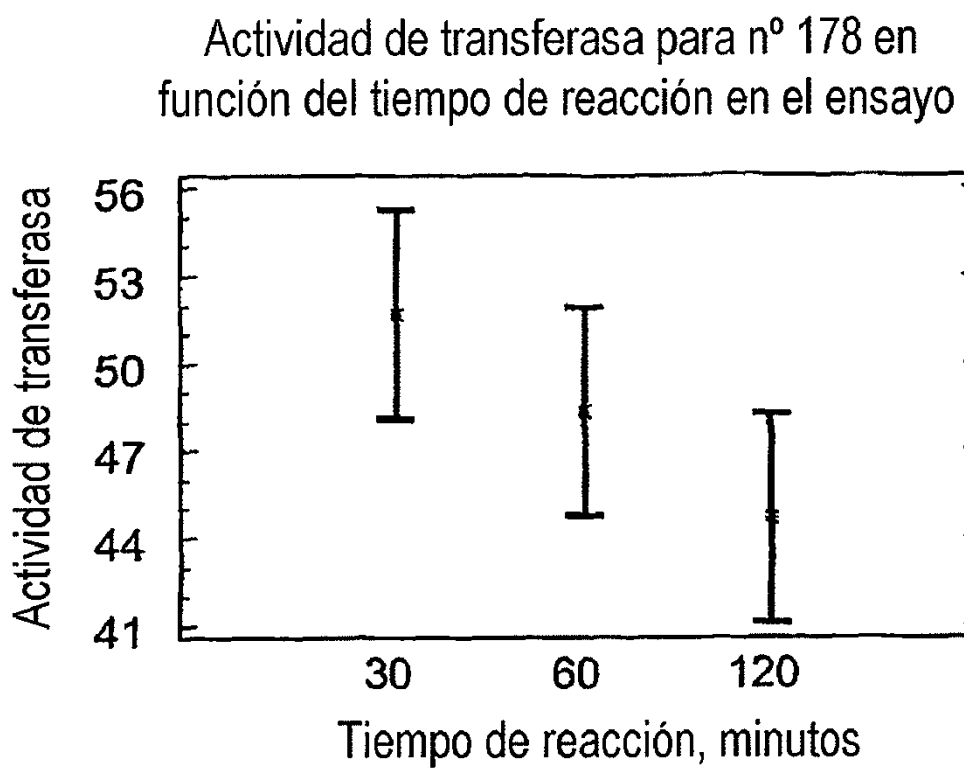


Figura 57

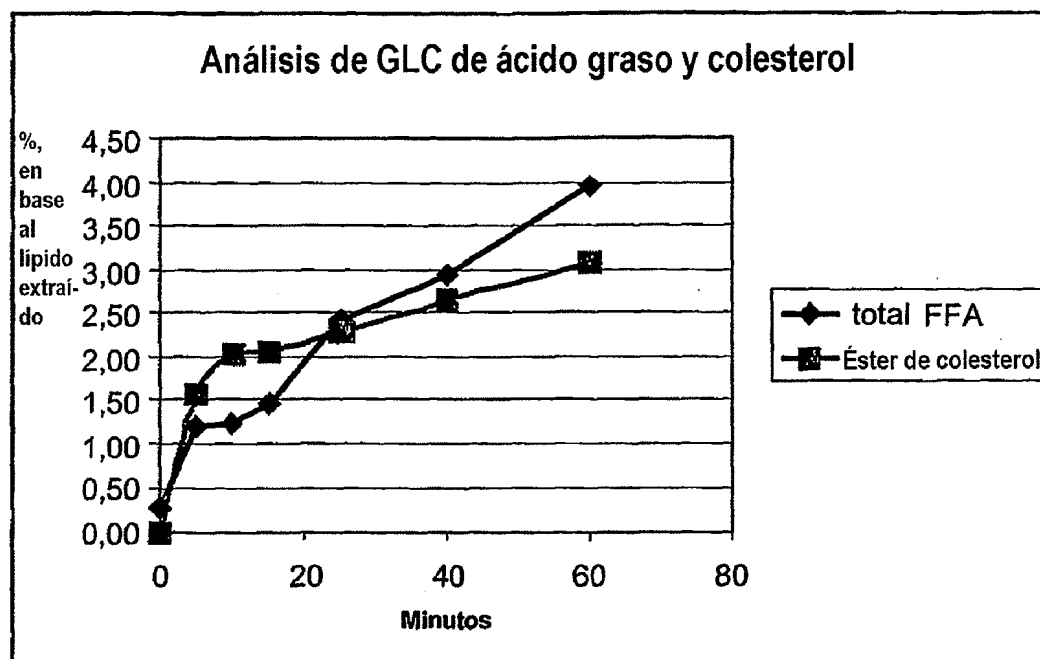


Figura 58

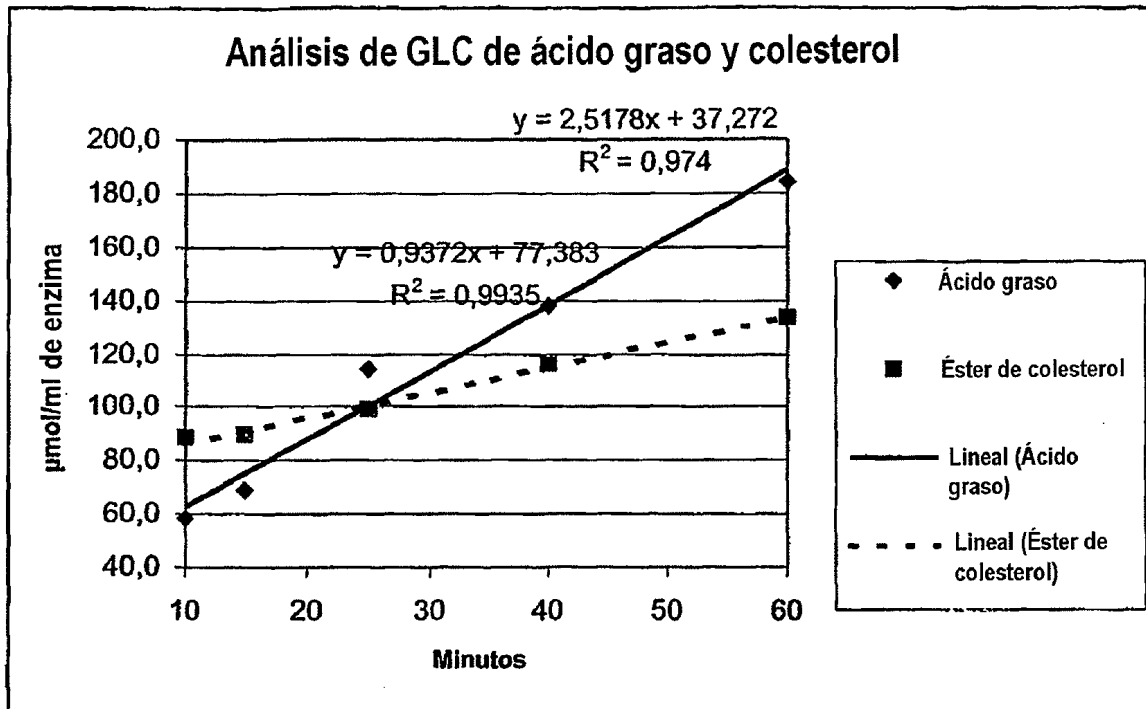


Figura 59

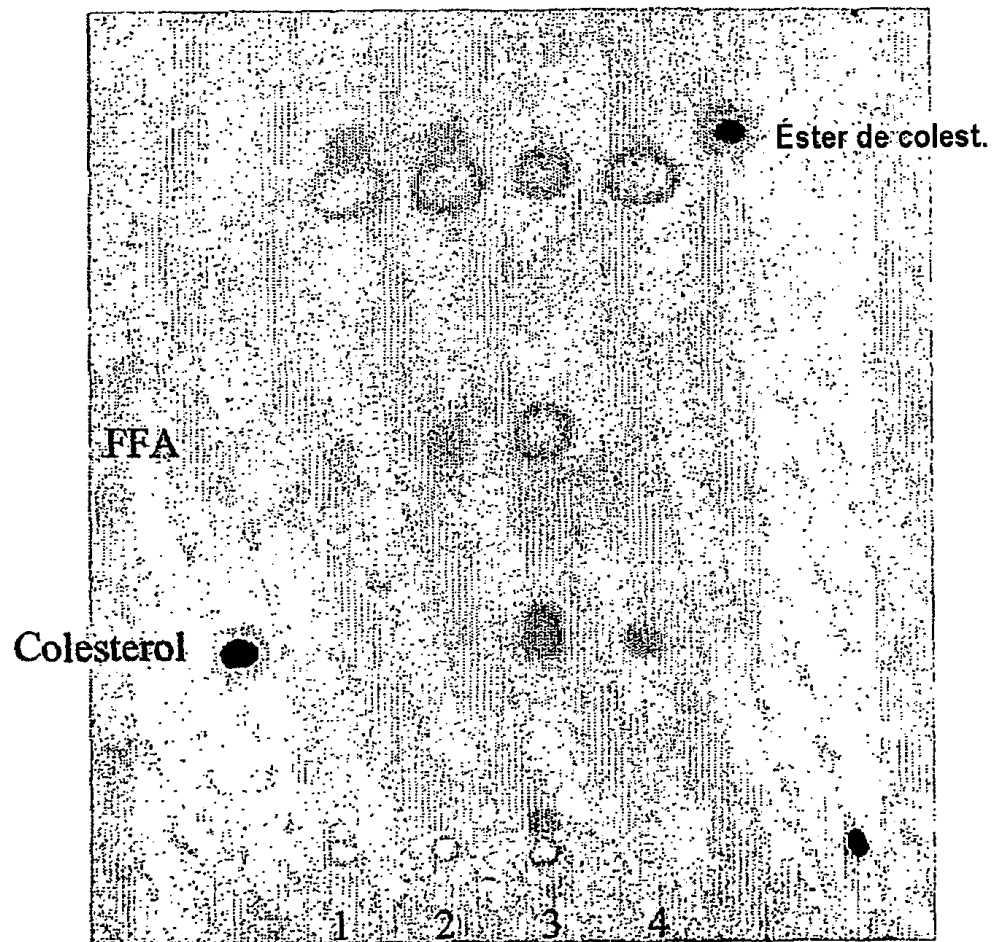


Figura 60

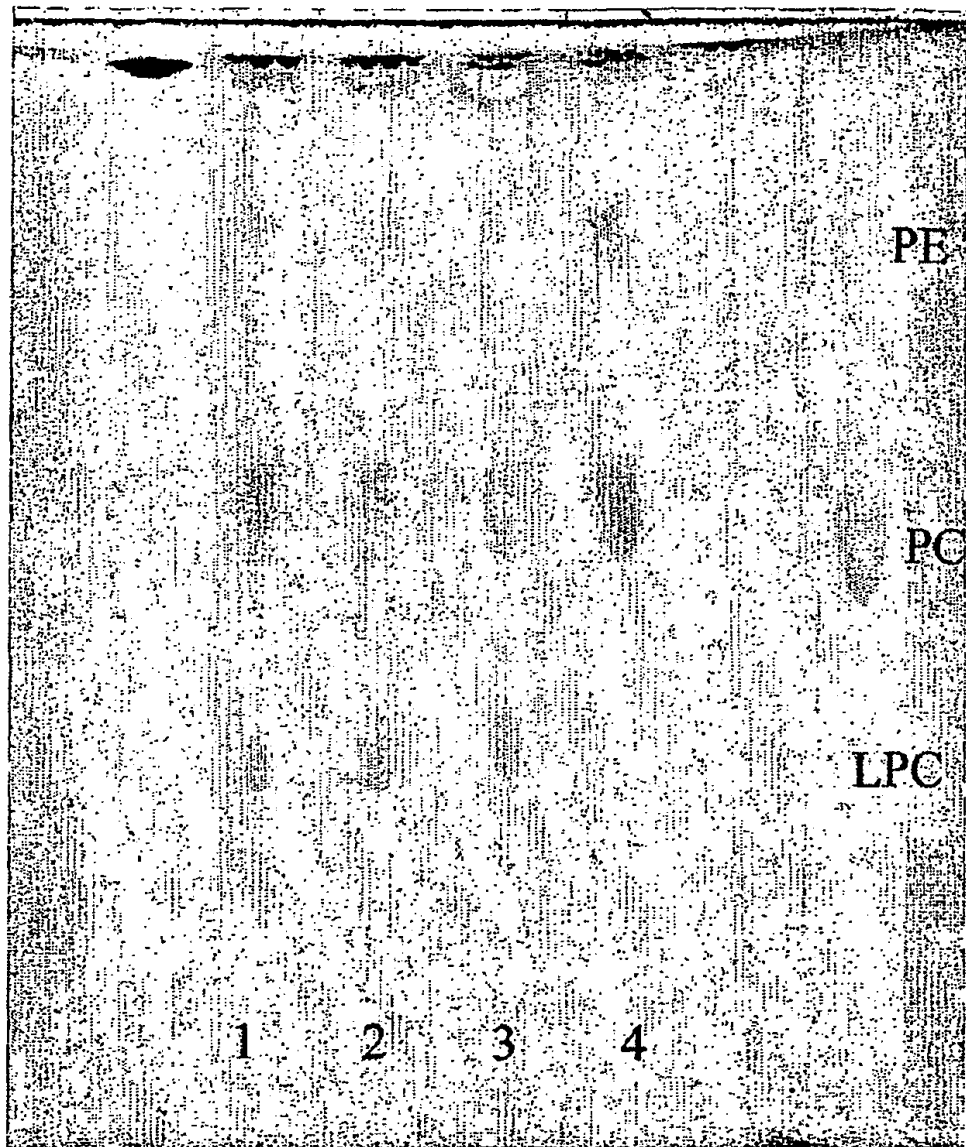


Figura 61

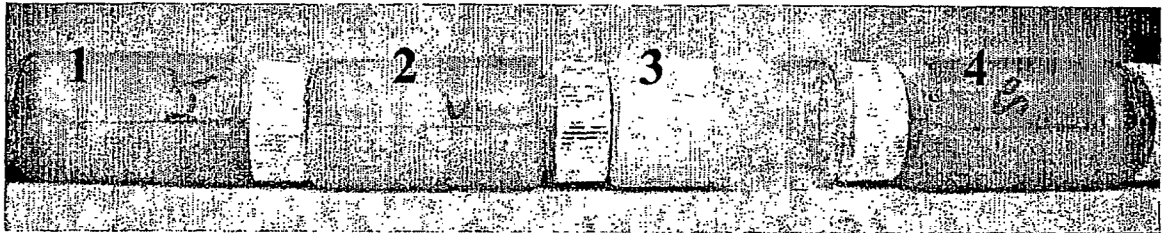


Figura 62



Figura 63

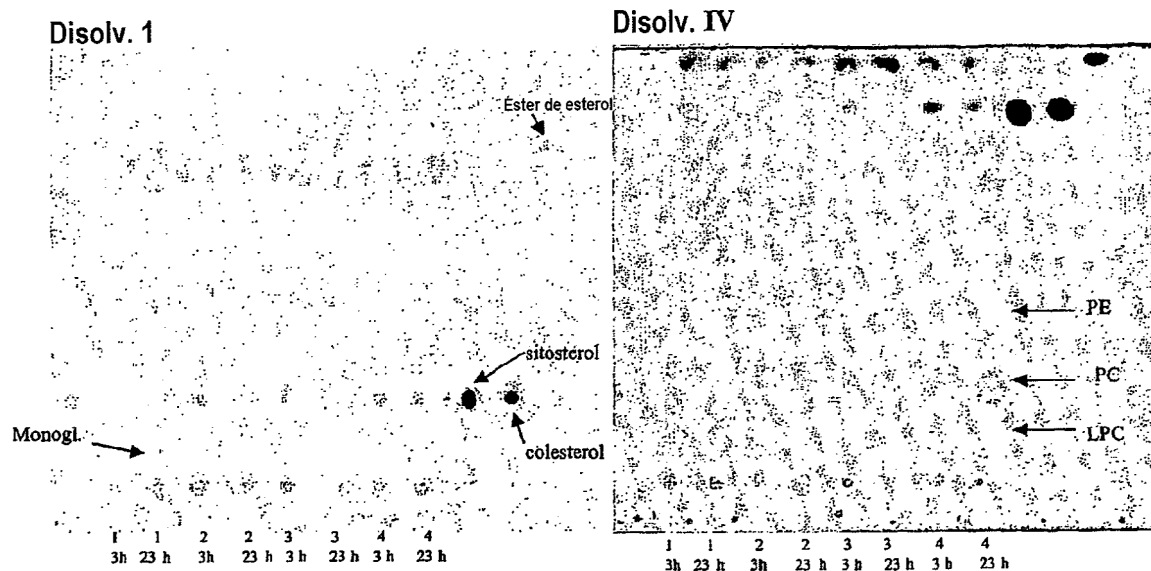


Figura 64

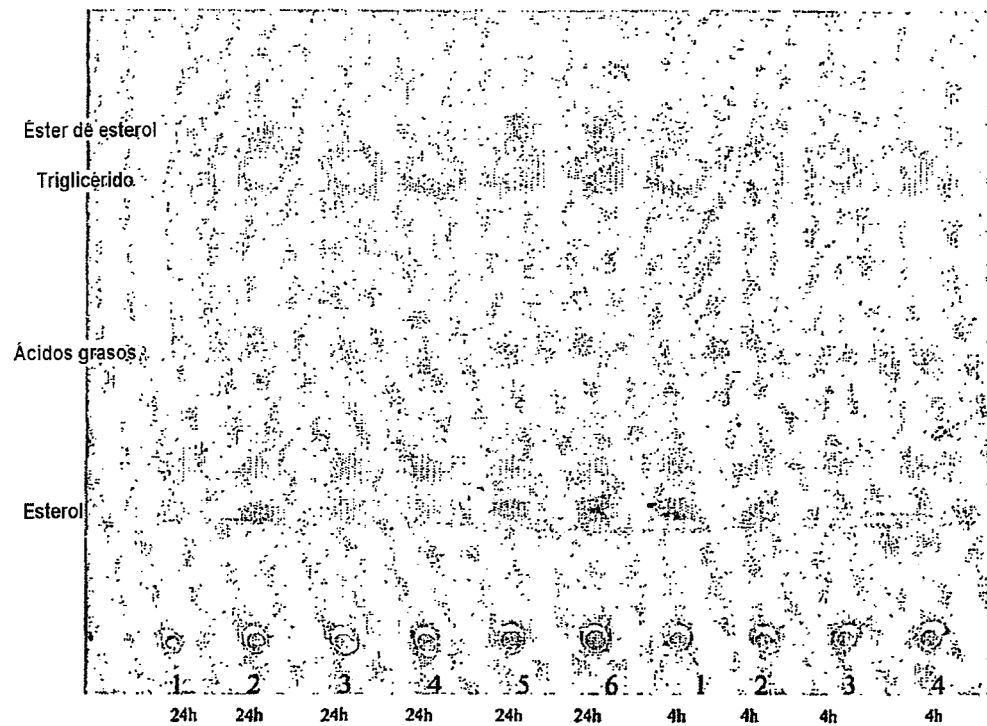


Figura 65

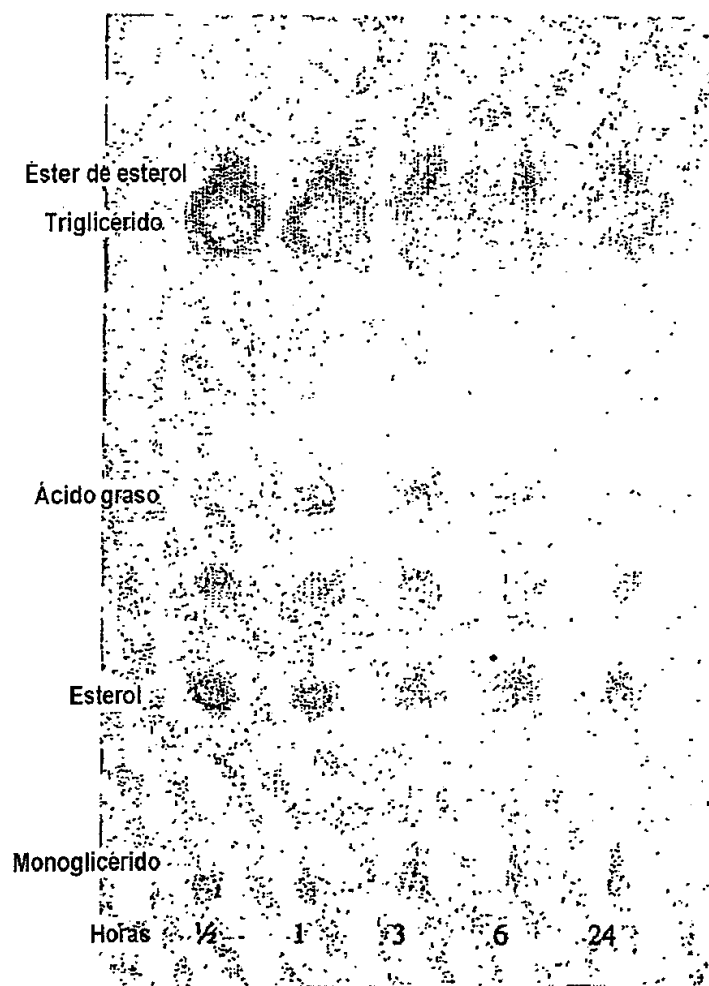


Figura 66

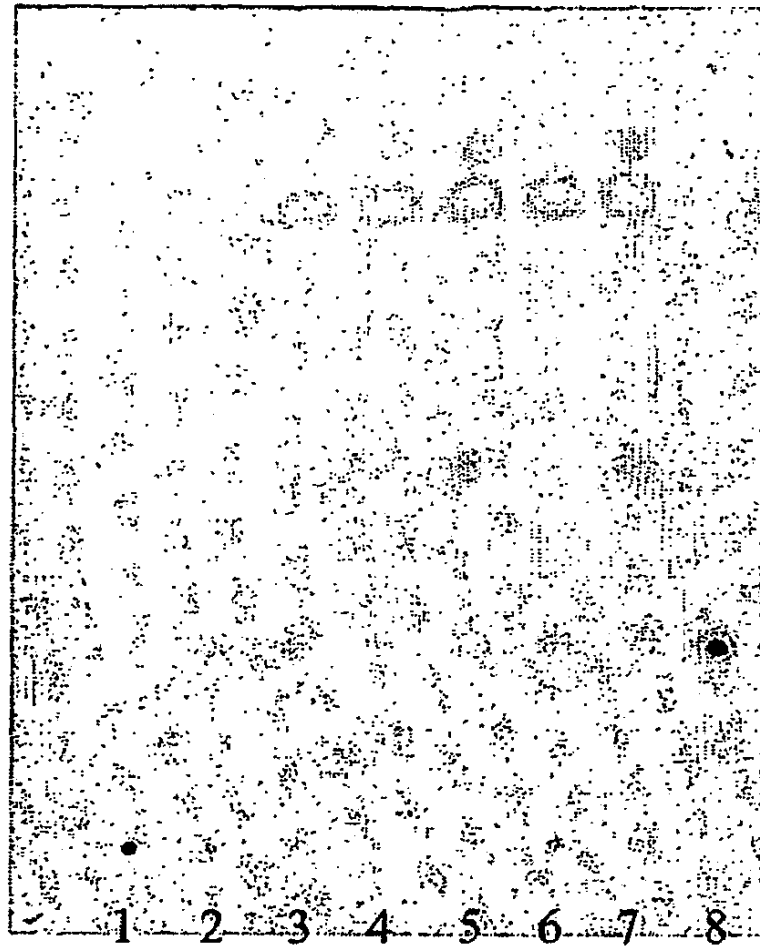


Figura 67

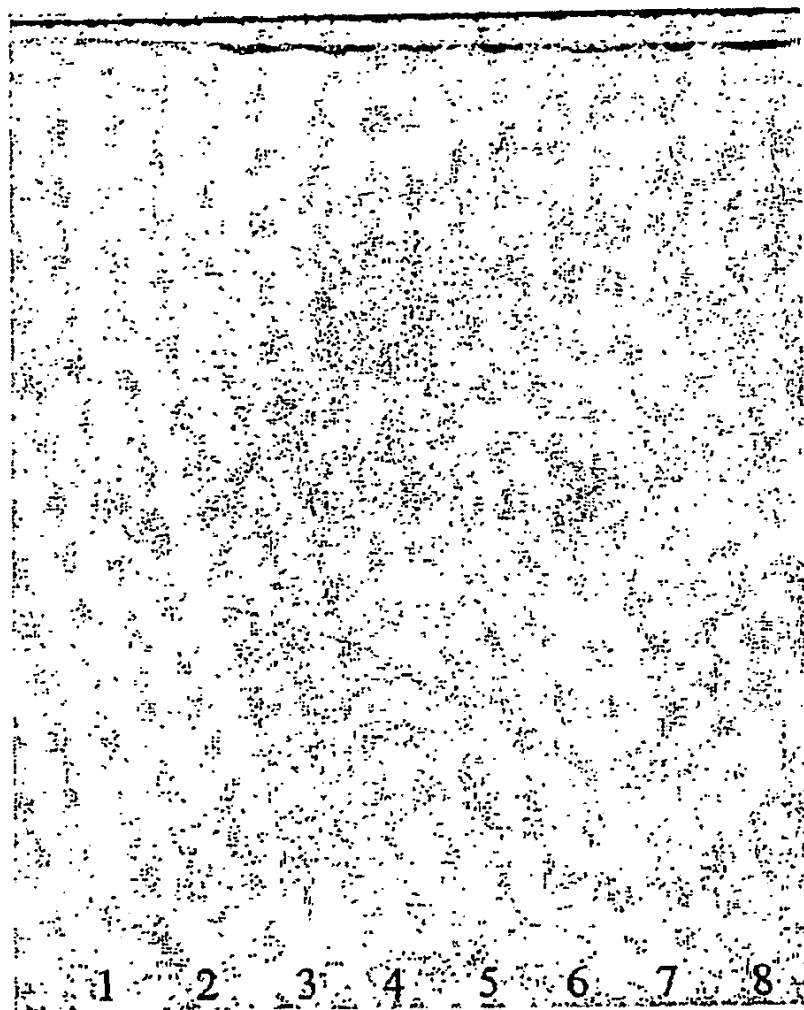


Figura 68

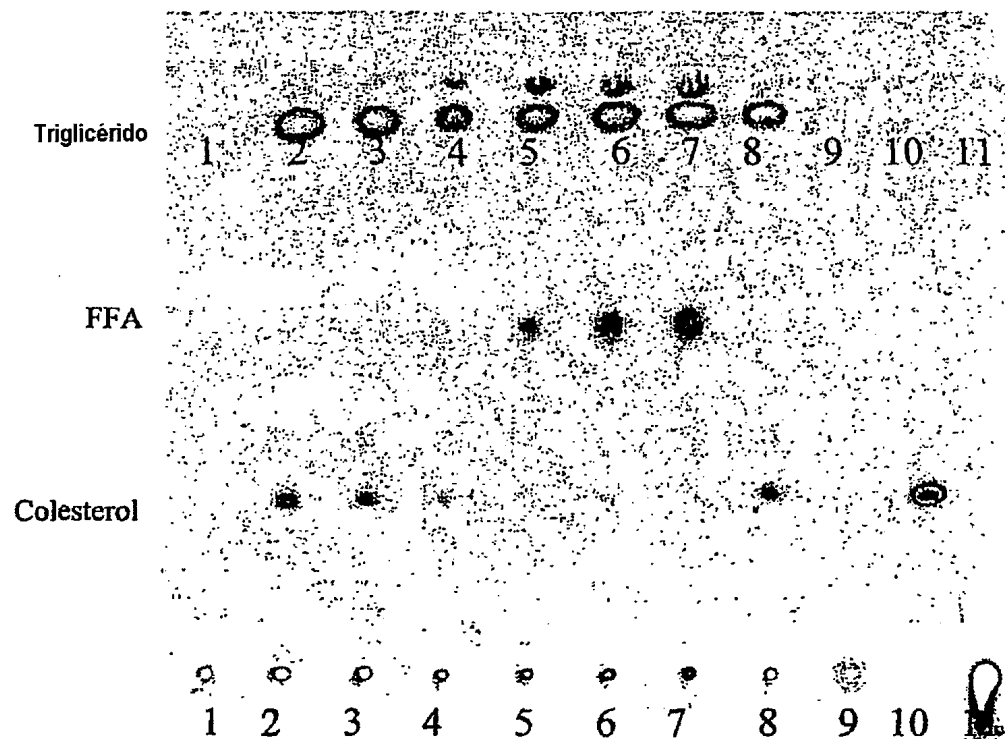


Figura 69

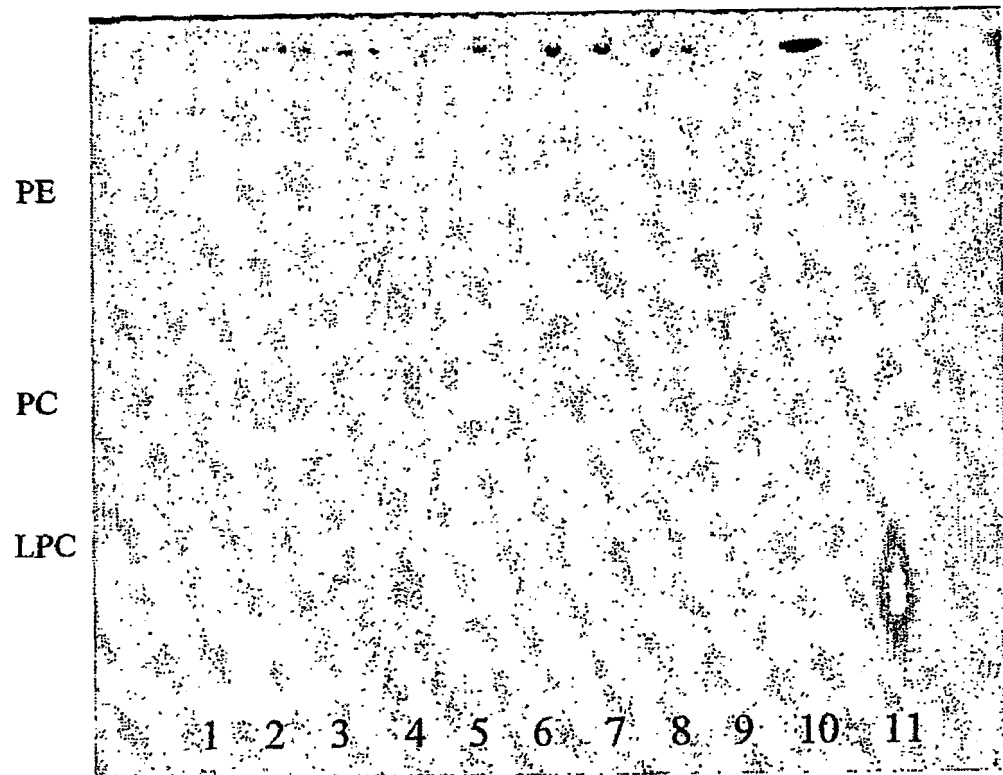


Figura 70

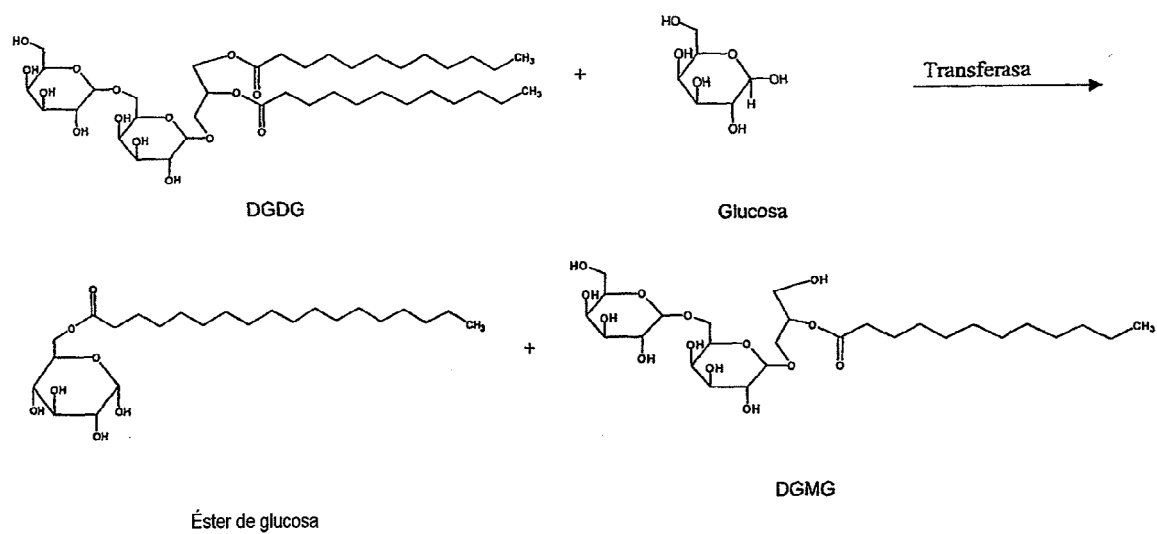


Figura 71

(SEC ID n° 36)

```

1  MFKFKQNFLV GLSAALMSIS LFSATASAAS ADSRPAFSRI VMFGDSLSDT
51  GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQFPGLT IANEAEGGAT
101 AVAYNKISWN PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVL WVGANDYLAY
151 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLENLPDLGQ NPSARSQKVV
201 EAVSHVSAYH NQLLLNLARQ LAPTGMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD
251 VENPCYDGGY VWKPFATRSV STDRLSAFS PQERLAIAGN PLLAQAVASP
301 MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL SERAATFIAN QYEFLAH**

```

Figura 72 (SEC ID nº 54)

1 ATGTTTAAGT TTAAAAAGAA TTTCTTAGTT GGATTATCGG CAGCTTTAAT
 TACAAATTCA AATTTTTCTT AAAGAATCAA CCTAATAGCC GTCGAAATTA
 51 GAGTATTAGC TTGTTTTTCGG CAACCGCCTC TGCAGCTAGC GCCGACAGCC
 CTCATAATCG AACAAAAGCC GTTGGCGGAG ACGTCGATCG CGGCTGTCGG
 101 GTCCCGCCTT TTCCCGGATC GTGATGTTCT GCGACAGCCT CTCCGATACC
 CAGGGCGGAA AAGGGCCTAG CACTACAAGC CGCTGTCGGA GAGGCTATGG
 151 GGCAAAATGT ACAGCAAGAT GCGCGGTTAC CTCCCCTCCA GCCCGCCCTA
 CCGTTTTTACA TGTCGTTCTA CGCGCCAATG GAGGGGAGGT CGGGCGGGAT
 201 CTATGAGGGC CGTTTCTCCA ACGGACCCGT CTGGCTGGAG CAGCTGACCA
 GATACTCCCG GCAAAGAGGT TGCCTGGGCA GACCGACCTC GTCGACTGGT
 251 AACAGTTCCC GGGTCTGACC ATCGCCAACG AAGCGGAAGG CGGTGCCACT
 TTGTCAAGGG CCCAGACTGG TAGCGGTTGC TTCGCCTTCC GCCACGGTGA
 301 GCCGTGGCTT ACAACAAGAT CTCCTGGAAT CCCAAGTATC AGGTCATCAA
 CGGCACCGAA TGTTGTTCTA GAGGACCTTA GGGTTCATAG TCCAGTAGTT
 351 CAACCTGGAC TACGAGGTCA CCCAGTTCTT GCAGAAAGAC AGCTTCAAGC
 GTTGACCTG ATGCTCCAGT GGGTCAAGAA CGTCTTTCTG TCGAAGTTCT
 401 CGGACGATCT GGTGATCCTC TGGGTCGGTG CCAATGACTA TCTGGCCTAT
 GCCTGCTAGA CCACTAGGAG ACCCAGCCAC GGTTACTGAT AGACCGGATA
 451 GGCTGGAACA CGGAGCAGGA TGCCAAGCGG GTTCGCGATG CCATCAGCGA
 CCGACCTTGT GCCTCGTCCT ACGGTTCCGC CAAGCGCTAC GGTAGTCGCT
 501 TGCGGCCAAC CGCATGGTAC TGAACGGTGC CAAGCAGATA CTGCTGTTC
 ACGCCGGTTG GCGTACCATG ACTTGCCACG GTTCGTCTAT GACGACAAGT
 551 ACCTGCCGGA TCTGGGCCAG AACCCGTCAG CTCGCGAGTCA GAAGGTGGTC
 TGGACGGCCT AGACCCGGTC TTGGGCAGTC GAGCGTCAGT CTTCCACCAG
 601 GAGGCGGTCA GCCATGTCTC CGCCTATCAC AACCAGCTGC TGCTGAACCT
 CTCCGCCAGT CGGTACAGAG GCGGATAGTG TTGGTCGACG ACGACTTGGA
 651 GGCACGCCAG CTGGCCCCCA CCGGCATGGT AAAGCTGTTT GAGATCGACA
 CCGTGCGGTC GACCGGGGGT GGCCGTACCA TTTCGACAAG CTCTAGCTGT
 701 AGCAATTTGC CGAGATGCTG CGTGATCCGC AGAACTTCGG CCTGAGCGAC
 TCGTTAAACG GCTCTACGAC GCACTAGGCG TCTTGAAGCC GGAATCGCTG
 751 GTCGAGAACC CCTGCTACGA CGGCGGCTAT GTGTGGAAGC CGTTTGCCAC
 CAGCTCTTGG GGACGATGCT GCCGCCGATA CACACCTTCG GCAAACGGTG
 801 CCGCAGCGTC AGCACCAGAC GCCAGCTCTC CGCCTTCAGT CCGCAGGAAC
 GCGTCCGAG TCGTGGCTGG CGGTGAGAG GCGGAAGTCA GGCCTCCTTG
 851 GCCTCGCCAT CGCCGGCAAC CCGCTGCTGG CACAGGCCGT TGCCAGTCTT
 CGGAGCGGTA GCGGCCGTTG GGCGACGACC GTGTCCGGCA ACGGTCAGGA
 901 ATGGCCCCGC GCAGCGCCAG CCCCTCAAC TGTGAGGGCA AGATGTTCTG
 TACCGGGCGG CGTCGCGGTC GGGGGAGTTG AACTCCCGT TCTACAAGAC
 951 GGATCAGGTA CACCCGACCA CTGTCGTGCA CGCAGCCCTG AGCGAGCGCG
 CCTAGTCCAT GTGGGCTGGT GACAGCACGT GCGTCGGGAC TCGCTCGCGC
 1001 CCGCCACCTT CATCGCGAAC CAGTACGAGT TCCTCGCCCA CTGATGA
 GCGGGTGGAA GTAGCGCTTG GTCATGCTCA AGGAGCGGGT GACTACT

Figura 73

