

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 551**

51 Int. Cl.:

C11B 3/00 (2006.01)

C12P 7/64 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.12.2008 E 08863504 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **06.10.2010 EP 2235151**

54 Título: **Proceso para el refinado de aceite comestible usando una lípido aciltransferasa**

30 Prioridad:

21.12.2007 GB 0725035

20.05.2008 GB 0809177

03.06.2008 US 58378 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

13.02.2013

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS

(100.0%)

Langebrogade 1, Postboks 17

1001 Copenhagen K., DK

72 Inventor/es:

SOE, JORN BORCH y

BROWN, ANNE VICTORIA

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 395 551 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proceso para el refinado de aceite comestible usando una lípido aciltransferasa

REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Se hace referencia a las solicitudes relacionadas siguientes: US 2002-0009518, US 2004-0091574, WO2004/064537, WO2004/064987, WO2005/066347, WO2005/066351, Solicitud de los Estados Unidos Número de Serie 60/764.430 presentada el 2 de febrero 2006, WO20061008508, Solicitud de Patente Internacional Número PCT/IB2007/000558 y Solicitud de los Estados Unidos Número de Serie 11/671.953. En este texto también se citan varios documentos ("documentos citados en la presente memoria").

CAMPO DE LA PRESENTE INVENCION

10 La presente invención se refiere a un proceso para el refinado de aceite comestible (preferiblemente aceite vegetal) usando una lípido aciltransferasa. La presente invención se refiere además a un proceso para tratar un aceite comestible (preferiblemente un aceite comestible crudo) (por ejemplo, un aceite vegetal) y/o una fase de goma de un aceite comestible (preferiblemente aceite vegetal) usando una lípido aciltransferasa.

ANTECEDENTES DE LA PRESENTE INVENCION

15 Se sabe que las lípido aciltransferasas son ventajosas en las aplicaciones alimenticias. Se ha encontrado que las lípido aciltransferasas tienen una actividad aciltransferasa significativa en productos alimenticios. Esta actividad tiene aplicaciones beneficiosas sorprendentes en métodos para preparar productos alimenticios.

20 Por ejemplo, WO 2004/064537 describe un método para la producción *in situ* de un emulsionante por el uso de una lípido aciltransferasa y las ventajas asociadas con éste. WO2008/090395 enseña la expresión de lípido aciltransferasas en células huésped (heterólogas).

El propósito del refinado de aceites comestibles es eliminar impurezas indeseables que afectan la calidad (sabor, olor y apariencia, por ejemplo) y la capacidad de almacenamiento.

25 Debido a la amplia variedad de estas impurezas- ácidos grasos libres, iones metálicos, compuestos con color, olores, gomas, etc.- se emplean convencionalmente una serie de procesos de naturaleza química y física para el refinado (véase por ejemplo Bailey's Industrial Oil and Fat Products- 2006 John Wiley & Sons- Sexta Edición).

Tradicionalmente, se han usado dos procesos para el desgomado del aceite que son los procesos de desgomado físico y desgomado químico.

30 En el denominado refinado químico, casi todo el contenido de ácidos grasos libres se elimina por tratamiento inicial con un gran exceso de NaOH. Además, el contenido de fosfolípidos disminuye hasta un nivel de fósforo típicamente por debajo de 10 ppm. El aceite se blanquea y desodoriza posteriormente.

El denominado refinado físico consiste generalmente en una etapa de desgomado con agua seguida de desgomado ácido, neutralización, blanqueo, extracción con vapor para eliminar los ácidos grasos libres y desodorización.

En lugar de usar desgomado ácido durante el refinado físico, se han hecho avances para usar desgomado enzimático.

35 El proceso de desgomado enzimático se desarrolló tomando como base el uso de fosfolipasa pancreática. Como esta enzima era no kosher, la fosfolipasa se sustituyó eventualmente por una fosfolipasa A1 microbiana (Lecitasa Ultra™- Novozymes, Dinamarca) (Oil Mill Gazetteer, Vol 111 Julio 2005 p 2-4).

El proceso enzimático tiene varias ventajas sobre los procesos de desgomado químico o físico incluyendo ahorro de costes, mayor rendimiento y un proceso más respetuoso con el medioambiente.

40 El proceso de desgomado enzimático de aceites se basó en la adición de una fosfolipasa a un aceite que se había desgomado ya con agua.

En WO2006/008508 se enseñaron las lípido aciltransferasas para uso en el desgomado enzimático de aceites comestibles. WO 2006/008508 enseña la adición de una lípido aciltransferasa a un aceite desgomado con agua o la adición de una lípido aciltransferasa a un aceite crudo sin la necesidad de que el aceite experimente un proceso de desgomado con agua.

El "aceite desgomado con agua" puede obtenerse típicamente por un proceso de desgomado con agua convencional que comprende mezclar 1-2% p/p de agua blanda caliente con aceite crudo templado (70-90^o) (AOCS Intoduction to the Processing of Fats and Oils- Tabla 8- Procesos de Desgomado - <http://www.aocs.org/meetings/education/mod3/sample.pdf>). Una norma general es que la cantidad de agua añadida al aceite crudo es típicamente aproximadamente igual a la cantidad de fosfolípidos en el aceite crudo. Los periodos de tratamiento habituales son 30-60 minutos. La etapa de desgomado con agua elimina los fosfátidos y gomas mucilaginosas que se vuelven insolubles en el aceite cuando se hidrata. Los fosfátidos y gomas hidratadas pueden separarse del aceite por sedimentación, filtración o centrifugación- siendo la centrifugación la práctica más predominante. El objeto esencial en dicho proceso de desgomado con agua es separar los fosfátidos hidratados del aceite. El mezclado de agua caliente en el aceite, descrito anteriormente, debe entenderse en la presente memoria ampliamente como el mezclado de una disolución acuosa en el aceite según los procedimientos de desgomado con agua estándar en la técnica.

En el proceso de desgomado con agua convencional, la parte principal de los fosfátidos se elimina en una fase de goma pesada. Al final del proceso de desgomado con agua se separa una fase de aceite de una fase de goma. Aunque la fase de goma puede procesarse más en productos comerciales, se ve esencialmente como un subproducto del refinado del aceite. Es la fase de aceite la que es comercialmente importante. Sin embargo, como los fosfátidos pueden ser buenos emulsionantes, parte del aceite se pierde inevitablemente en la fase de goma durante el desgomado con agua. Esto da lugar a rendimientos reducidos de aceite en la fase de aceite después del desgomado con agua.

Con los incrementos en los precios del aceite y una necesidad creciente de aceite vegetal para biodiesel es importante optimizar el procesamiento de los aceites comestibles para un alto rendimiento del aceite.

ASPECTOS RESUMEN DE LA PRESENTE INVENCIÓN

Los aspectos de la presente invención se presentan en las reivindicaciones y en el comentario siguiente.

Se ha encontrado sorprendentemente que mediante la adición de una o más lípido aciltransferasas a un aceite comestible crudo durante o antes de llevar a cabo un proceso de desgomado con agua, el rendimiento del aceite en la fase de aceite puede incrementarse significativamente. En otras palabras, las pérdidas de aceite en la fase de forma pueden reducirse significativamente.

Además, se ha encontrado sorprendentemente que mediante la adición de una o más lípido aciltransferasas a un aceite comestible crudo durante o antes de llevar a cabo un proceso de desgomado con agua la fase de goma obtenida es mucho menos viscosa. Esto puede permitir parámetros de centrifugación más favorables.

También se ha encontrado sorprendentemente que mediante la adición de una o más lípido aciltransferasas a un aceite comestible crudo durante o antes de llevar a cabo un proceso de desgomado con agua la fase de goma obtenida a partir de este proceso puede incubarse o almacenarse y (debido a la lípido aciltransferasa activa residual) puede observarse una hidrólisis adicional de fosfolípidos en la fase de goma. Los inventores han encontrado que es posible aislar una fase de aceite que contiene ácidos grasos libres (el aceite ácido) y los triglicéridos remanentes en la fase de goma. Este aceite ácido puede venderse con un valor mayor que la fase de goma normal que se añade a los alimentos. Además, se ha encontrado sorprendentemente que la fase sólida remanente (después de la separación del aceite ácido) tiene un nivel de fósforo mayor que la goma normal y así puede usarse como una fuente de fósforo orgánico.

También se ha encontrado sorprendentemente que la combinación de una o más lípido aciltransferasas y una o más enzimas fosfolipasa C (PLC) resulta en efectos sinérgicos cuando se usan en el desgomado de aceites comestibles (por ejemplo, aceites vegetales).

ASPECTOS DETALLADOS DE LA PRESENTE INVENCIÓN

Según un primer aspecto de la presente invención se proporciona un proceso de desgomado con agua de un aceite comestible (preferiblemente un aceite comestible crudo) que comprende las etapas de:

a) mezclar 0,1-5% p/p de agua con un aceite comestible (preferiblemente un aceite comestible crudo) y una lípido aciltransferasa, b) agitar la mezcla durante entre 10 minutos y 180 minutos a 45^oC a 90^oC, y c) separar la fase de aceite y la fase de goma, en el que la lípido aciltransferasa usada tiene una actividad transferasa (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína enzimática según se determina usando el ensayo descrito más adelante.

Según un segundo aspecto de la presente invención se proporciona un uso de una lípido aciltransferasa durante el desgomado con agua de un aceite comestible (preferiblemente durante el desgomado con agua de un aceite comestible crudo) para incrementar el rendimiento de aceite en la fase de aceite después de la finalización del proceso de desgomado con agua, en el que se mezcla 0,1-4% p/p de agua con el aceite comestible; la enzima se añade a un aceite

comestible a una temperatura en el intervalo de 45 a 90°C; y la lípido aciltransferasa se hace reaccionar con el aceite comestible durante entre 10 minutos a 180 minutos, en el que la lípido aciltransferasa usada tiene una actividad transferasa (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína enzimática según se determina usando el ensayo descrito más adelante.

- 5 Según un tercer aspecto de la presente invención se proporciona un uso de una lípido aciltransferasa durante el desgomado con agua de un aceite comestible (preferiblemente durante el desgomado con agua de un aceite comestible crudo) para disminuir la viscosidad de la fase de goma después de la finalización del proceso de desgomado con agua en el que se mezcla 0,1-4% p/p de agua con el aceite comestible; la enzima se añade a un aceite comestible a una temperatura en el intervalo de 45 a 90°C; y la lípido aciltransferasa se hace reaccionar con el aceite comestible durante
10 entre 10 minutos a 180 minutos, en el que la lípido aciltransferasa usada tiene una actividad transferasa (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína enzimática según se determina usando el ensayo descritos más adelante.

El incremento en el rendimiento y/o disminución en la viscosidad se compara entonces con la fase de aceite y/o fase de goma de un aceite desgomado comparable (bien desgomado con agua o desgomado con agua enzimáticamente) sin el uso de la lípido aciltransferasa.

- 15 Según un cuarto aspecto la presente invención proporciona un proceso de desgomado con agua de un aceite comestible (preferiblemente un aceite comestible crudo) que comprende las etapas de: a) mezclar 0,1-5% p/p de agua con un aceite comestible (preferiblemente un aceite comestible crudo) y una lípido aciltransferasa, b) agitar la mezcla durante entre 10 minutos y 180 minutos a 45°C a 90°C, c) separar la fase de aceite y la fase de goma, d) incubar la fase de goma que comprende la enzima lípido aciltransferasa activa durante entre un mínimo de 2 horas y un máximo de 7 días
20 (adecuadamente hasta aproximadamente 1-2 días) y e) separar (por ejemplo, por centrifugación) el aceite de la fase de goma.

El uso de la(s) enzima(s) incrementa el valor del aceite ácido comparado con la goma porque el aceite ácido puede usarse para la producción de ácidos grasos. El ácido graso tiene un valor mayor que una goma que de otra manera se añade a los alimentos.

- 25 Las mejoras y/o incrementos son cuando se comparan con una fase de goma que no se ha tratado con una lípido aciltransferasa (sola o en combinación con una fosfolipasa C).

Adecuadamente, las una o más enzimas lípido aciltransferasas en la fase de goma pueden tener enzima activa residual que puede haberse transferido a la fase de goma después del desgomado enzimático del aceite comestible. Alternativamente, la enzima lípido aciltransferasa en la fase de goma puede ser lípido aciltransferasa añadida- enzima
30 que puede añadirse al comienzo o durante la incubación de la fase de goma.

De forma importante, el aceite al final del proceso en el cuarto aspecto (y otros tratamientos de la fase de goma) es un "aceite ácido". Este aceite ácido puede venderse con un valor mayor que la fase de goma normal que se añade a los alimentos. La fase de goma remanente (después de la separación del aceite ácido) se refiere a veces como una fase sólida. Se ha encontrado sorprendentemente que la fase sólida remanente (después de la separación del aceite ácido)
35 tiene un nivel de fósforo mayor que la goma normal y así puede usarse como una fuente de fósforo orgánico.

Adecuadamente, la lípido aciltransferasa es una clasificada bajo la clasificación de la Nomenclatura de Enzimas (E.C.2.3.1.43).

En una realización, preferiblemente la lípido aciltransferasa se usa en combinación con una fosfolipasa C (E.C.3.1.4.3).

- 40 En una realización preferible, se usa una lípido aciltransferasa (E.C.2.3.1.43) en combinación con una fosfolipasa C (E.C.3.1.4.3).

Por lo tanto, según un aspecto de la presente invención se proporciona un proceso de desgomado con agua de un aceite comestible (preferiblemente un aceite comestible crudo) que comprende las etapas de: a) mezclar 0,1-5% p/p de agua con un aceite comestible (preferiblemente un aceite comestible crudo) y una combinación de una lípido aciltransferasa y una fosfolipasa C, b) agitar la mezcla durante entre 10 minutos y 180 minutos a 45°C a 90°C, y c) separar la fase de
45 aceite y la fase de goma, en el que la lípido aciltransferasa usada tiene una actividad transferasa (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína de enzimática según se determina usando el ensayo descrito más adelante.

Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, se ha encontrado sorprendentemente que la lípido aciltransferasa puede usar el diglicérido (producido por la reacción de la fosfolipasa C) como una molécula aceptora para producir triglicérido. Así, cuando se usa una lípido aciltransferasa en combinación con una fosfolipasa C, la interacción entre estas enzimas
50 resulta en un incremento sinérgico de la cantidad de triglicérido en un aceite que comprende ambas enzimas comparado con un aceite comparable que comprende cualquiera de las enzimas sola o un aceite comparable que no comprende

ninguna enzima. Ventajosamente, cuando se usa una lípido aciltransferasa en combinación con una fosfolipasa C la interacción entre estas enzimas resulta en una disminución sinérgica de la cantidad de diglicérido en un aceite que comprende ambas enzimas comparado con un aceite comparable que comprende cualquiera de las enzimas sola o un aceite comparable que no comprende ninguna enzima. Cuando se usa una lípido aciltransferasa en combinación con una fosfolipasa C, la interacción entre estas enzimas resulta en un incremento sinérgico del rendimiento del aceite en un aceite que comprende ambas enzimas comparado con un aceite comparable que comprende cualquiera de las enzimas sola o un aceite comparable que no comprende ninguna enzima.

El uso de una combinación de estas enzimas tiene ventajas significativas sobre el uso de una fosfolipasa C sola ya que la acumulación de diglicéridos en un aceite (que puede ocurrir cuando una fosfolipasa C se usa sola) puede ser perjudicial para el aceite porque puede tener un impacto negativo en el "punto de humo" del aceite y/o puede tener un impacto negativo en las propiedades de cristalización de más fuentes de grasa saturadas.

Por lo tanto en la presente invención otra ventaja del uso de lípido aciltransferasas (particularmente en el caso de combinación con una fosfolipasa C) es que la cantidad de diglicérido en el aceite puede reducirse comparado con un aceite comparable sin la lípido aciltransferasa y/o particularmente comparado con un aceite comparable tratado con fosfolipasa C sola.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un uso de una lípido aciltransferasa en combinación con una fosfolipasa C durante el desgomado con agua de un aceite comestible (preferiblemente durante el desgomado con agua de un aceite comestible crudo) para incrementar el rendimiento del aceite y/o para incrementar los niveles de triglicéridos en la fase de aceite después de la finalización del proceso de desgomado con agua y/o para educir el nivel de diglicéridos en la fase de aceite después de la finalización del proceso de desgomado con agua, en el que 0,1-4% p/p de agua se mezcla con el aceite comestible; la enzima se añade a un aceite comestible a una temperatura en el intervalo de 45 a 90°C; y la lípido aciltransferasa se hace reaccionar con el aceite comestible durante entre 10 minutos a 180 minutos, en el que la lípido aciltransferasa usada tiene una actividad transferasa (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína enzimática según se determina usando el ensayo descrito más adelante.

Según otro aspecto más de la presente invención se proporciona un uso de una lípido aciltransferasa en combinación con una fosfolipasa C durante el desgomado con agua de un aceite comestible (preferiblemente durante el desgomado con agua de un aceite comestible crudo) para disminuir la viscosidad de la fase de goma después de la finalización del proceso de desgomado con agua, en el que 0,1-4% p/p de agua se mezcla con el aceite comestible; la enzima se añade a un aceite comestible a una temperatura en el intervalo de 45 a 90°C; y la lípido aciltransferasa se hace reaccionar con el aceite comestible durante entre 10 minutos a 180 minutos, en el que la lípido aciltransferasa usada tiene una actividad transferasa (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína enzimática según se determina usando el ensayo descrito más adelante.

Estos incrementos y/o reducciones son cuando se comparan con un aceite comestible desgomado comparable que no ha sido tratado con una lípido aciltransferasa en combinación con una fosfolipasa C.

Generalmente, los incrementos y/o reducciones discutidas en la presente memoria son cuando se comparan con un proceso comparable o un aceite comparable que no ha sido tratado con una lípido aciltransferasa (bien sola o en combinación con una fosfolipasa C).

Según otro aspecto, la presente invención proporciona un proceso de desgomado con agua de un aceite comestible (preferiblemente un aceite comestible crudo) que comprende las etapas de: a) mezclar 0,1-5% p/p de agua con un aceite comestible (preferiblemente un aceite comestible crudo) y una lípido aciltransferasa en combinación con una fosfolipasa C, b) agitar la mezcla durante entre 10 minutos y 180 minutos a 45°C a 90°C, c) separar la fase de aceite y la fase de goma, d) incubar la fase de goma que comprende la lípido aciltransferasa activa durante entre un mínimo de aproximadamente 2 horas y un máximo de 7 días (adecuadamente hasta aproximadamente 1-2 días) y e) separar (por ejemplo, por centrifugación) el aceite de la fase de goma, en el que la lípido aciltransferasa usada tiene una actividad transferasa (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína enzimática según se determina usando el ensayo descrito más adelante.

Cuando se usa una enzima que degrada fosfolípidos (preferiblemente una lípido aciltransferasa) en combinación con una fosfolipasa C, la fosfolipasa C puede añadirse antes, al mismo tiempo o después de la adición de la enzima lípido aciltransferasa.

En una realización, preferiblemente la fosfolipasa C se añade antes de la lípido aciltransferasa.

Se ha encontrado sorprendentemente que el uso de una combinación de una lípido aciltransferasa y una fosfolipasa C incrementa significativamente el rendimiento de aceite en la fase de aceite después de la finalización del proceso de desgomado con agua.

- 5 Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, se prevé que la fosfolipasa C hidroliza el fosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina) a un diglicérido (por ejemplo, 1,2-diacilglicerol) y un resto fosfato (por ejemplo, fosfato de colina) y la lípido aciltransferasa transfiere entonces un ácido graso al diglicérido formado por la fosfolipasa C- formando así más triglicérido e incrementando el rendimiento de aceite. Este efecto da lugar a un incremento sinérgico (es decir, preferiblemente más que aditivo) en el rendimiento de aceite.
- El método de desgomado de un aceite comestible y/o uso según la presente invención se lleva a cabo entre 45-90^oC, preferiblemente entre 45 a aproximadamente 70^oC.
- 10 En otra realización, adecuadamente el proceso y/o uso del método de desgomado de un aceite comestible según la presente invención puede llevarse a cabo más preferiblemente por encima de 45^oC, más preferiblemente por encima de aproximadamente 50^oC.
- En otra realización, adecuadamente el proceso y/o uso según la presente invención puede llevarse a cabo por debajo de aproximadamente 60^oC, preferiblemente por debajo de aproximadamente 65^oC, preferiblemente por debajo de aproximadamente 70^oC.
- 15 En una realización, adecuadamente el proceso y/o uso según la presente invención puede llevarse a cabo entre 45-70^oC, preferiblemente entre 45-68^oC, más preferiblemente entre aproximadamente 50-65^oC grados Celsius.
- Adecuadamente, la temperatura del aceite y/o agua puede ser a la temperatura de reacción deseada cuando la enzima se mezcla con éstos.
- El aceite y/o agua pueden calentarse y/o enfriarse hasta la temperatura deseada antes y/o durante la adición de la enzima. Por lo tanto, en una realización se prevé que una etapa adicional del proceso según la presente invención puede ser el enfriamiento y/o calentamiento del aceite y/o del agua.
- 20 Preferiblemente, el contenido de agua para el proceso según la presente invención puede ser entre 0,1-4% p/p, más preferiblemente entre 0,1-3% p/p, más preferiblemente entre aproximadamente 0,5-3% p/p.
- En una realización, el contenido de agua para el proceso según la invención puede ser entre aproximadamente 1-3% p/p.
- 25 En una realización, el contenido de agua para el proceso según la invención puede ser menor de aproximadamente 3% p/p, adecuadamente menor de aproximadamente 2%.
- En una realización, el contenido de agua para el proceso puede ser menor de 1%. La reducción de la cantidad de agua hasta menos de aproximadamente 1% puede resultar en una ventaja económica significativa en un proceso de desgomado con agua. Por lo tanto, la capacidad de reducir la cantidad de agua hasta menos de aproximadamente 1% puede dar lugar a reducciones en el coste significativas.
- 30 Adecuadamente, el tiempo de reacción (es decir, el periodo de tiempo en el que se agita la mezcla) puede ser entre 10 minutos y 180 minutos, preferiblemente entre aproximadamente 15 minutos y 180 minutos, más preferiblemente entre aproximadamente 15 minutos y 60 minutos, aún más preferiblemente entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 35 minutos.
- 35 En una realización, adecuadamente el tiempo de reacción puede ser entre aproximadamente 30 minutos y 180 minutos, preferiblemente entre aproximadamente 30 minutos y aproximadamente 60 minutos.
- En una realización, el proceso se lleva a cabo preferiblemente por encima de pH 5 o por encima de aproximadamente pH 6.
- 40 Preferiblemente, el proceso se lleva a cabo entre pH 5,0 y pH 10,0, más preferiblemente entre aproximadamente pH 6,0 y pH 10,0, más preferiblemente entre pH 5,0 y aproximadamente pH 7,0, más preferiblemente entre pH 5,0 y aproximadamente pH 6,5 y aún más preferiblemente entre aproximadamente pH 5,5 y pH 6,0.
- En una realización, el proceso puede llevarse a cabo a un pH entre aproximadamente 5,3 a 8,3.
- En una realización, el proceso puede llevarse a cabo a un pH entre aproximadamente 6-6,5, preferiblemente aproximadamente 6,3.
- 45 Adecuadamente, el pH puede ser neutro (pH 5,0-aproximadamente pH 7,0) en los métodos y/o usos de la presente invención.

Preferiblemente, el tratamiento con la enzima ocurre en el proceso de desgomado sin ajuste del pH del aceite y/o agua. Por lo tanto, típicamente el pH será aproximadamente 5,5-7,5.

5 Esto resulta en una ventaja significativa sobre los procesos de la técnica anterior que usan enzimas fosfolipasa A que típicamente sólo son altamente activas en condiciones de pH ácido, es decir, pH 4-5. Por lo tanto, típicamente en los procesos de la técnica anterior (por ejemplo que usan enzimas fosfolipasa A) el pH del aceite debe ajustarse a condiciones más ácidas.

10 Además, el uso de una lípido aciltransferasa con una enzima fosfolipasa C tiene una ventaja significativa comparado con el uso de dicha fosfolipasa A con una enzima fosfolipasa C porque el pH óptimo para las lípido aciltransferasas típicamente coincide mucho mejor con el pH óptimo para las enzimas fosfolipasa C. Por lo tanto, generalmente no hay un "conflicto de pH" cuando se usan lípido aciltransferasas en combinación con enzimas fosfolipasa C. Esto contrasta mucho con el uso de enzimas fosfolipasa A en combinación con enzimas fosfolipasa C. Por lo tanto, el uso de lípido aciltransferasas en combinación con enzimas fosfolipasa C proporciona una mejora significativa ya que ambas enzimas pueden funcionar en su intervalo óptimo de pH o simultáneamente.

15 La separación de la fase de aceite y la fase de goma puede llevarse a cabo por cualquier método de separación convencional. Preferiblemente, la separación se lleva a cabo por centrifugación.

20 Una ventaja significativa del uso de lípido aciltransferasas (bien solas o preferiblemente en combinación con una enzima fosfolipasa C) es que el tratamiento con la enzima hace posible ajustar la centrífuga para controlar la cantidad de fósforo en el aceite final. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, esto se puede conseguir porque la viscosidad del aceite está significativamente reducida comparado con un aceite no tratado con la lípido aciltransferasa (bien sola o preferiblemente en combinación con una enzima fosfolipasa C). Esto es un avance significativo sobre los procesos de la técnica anterior. Típicamente, en los procesos de desgomado convencionales la centrifugación resulta en un nivel de fósforo en el aceite de aproximadamente 50 ppm. De hecho, la guía de especificación para el nivel de fósforo en un aceite comestible es que debe ser menor de 200 ppm. Realmente es óptimo tener aceites con un nivel de fósforo tan cercano como sea posible al nivel de 200 ppm. El uso de la lípido aciltransferasa (bien sola o preferiblemente en combinación con una enzima fosfolipasa C) resulta en un aceite que puede centrifugarse hasta un nivel de fósforo de entre aproximadamente 100-200 ppm, preferiblemente aproximadamente 170-190 ppm, más preferiblemente aproximadamente 180 ppm. Antes de la presente invención, había resultado muy difícil el ajuste de la centrífuga para proporcionar estos niveles de fósforo y proporciona una mejora significativa respecto a la presente invención.

30 Adecuadamente, el agua puede mezclarse con el aceite comestible, antes de o al mismo tiempo que se mezcla con la enzima. Alternativamente, el aceite comestible y la enzima pueden mezclarse antes de mezclarlo con el agua.

En una realización, el aceite, el agua y la enzima pueden bombearse en una corriente simultáneamente o sustancialmente simultáneamente a través de un mezclador y en un tanque de retención.

Adecuadamente, la enzima puede inactivarse durante y/o al final del proceso.

La enzima puede inactivarse antes o después de la separación de la fase de aceite y la fase de goma.

35 Adecuadamente, la enzima puede inactivarse con calor calentando durante 10 mins a 75-85°C o por encima de 92°C.

En una realización, adecuadamente la enzima puede no estar desactivada en la fase de goma. Así, cuando la fase de goma se recoge y se incuba, la enzima puede degradar más los fosfolípidos en la fase de goma. Después de una incubación extensa de la fase de goma, puede llevarse a cabo una separación más (por ejemplo, por centrifugación) con el fin de recuperar aún más aceite de la fase de goma. Esto puede incrementar aún más el rendimiento del aceite.

40 Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, se piensa que la enzima degrada los fosfolípidos a ácidos grasos libres en la fase de goma liberando así triacilglicérido que se había emulsionado previamente con los fosfolípidos. Esto disminuye la viscosidad de la fase de goma y permite separar los triacilglicéridos y los ácidos grasos libres, por ejemplo por centrifugación.

45 En una realización, adecuadamente el proceso de la presente invención puede llevarse a cabo sin la adición de un álcali, tal como NaOH por ejemplo.

En otra realización, adecuadamente el proceso de la presente invención puede llevarse a cabo en presencia de un álcali, tal como NaOH por ejemplo. Cuando se añade NaOH, preferiblemente no se añade en una cantidad que exceda aproximadamente 0,2 ml (disolución al 4%) de NaOH por 100 g de aceite.

50 Las enzimas adecuadas para uso en los métodos y/o usos de la invención tienen actividad lípido aciltransferasa según se determina usando el "Ensayo de Transferasa (Colesterol:Fosfolípido) (TrU)" siguiente.

Determinación de la actividad Transferasa "ENSAYO DE TRANSFERASA (COLESTEROLFOSFOLÍPIDO)" (TrU)

Sustrato: se disuelven 50 mg de Colesterol (Sigma C8503) y 450 mg de fosfatidilcolina (PC) de Soja, Avanti #441601 en cloroformo y el cloroformo se evapora a 40°C en vacío.

Se dispersan 300 mg de PC:colesterol 9:1 a 40°C en 10 ml de 50 mM tampón HEPES pH 7.

5 Enzimación:

Se añaden 250 µl de sustrato en un vaso con tapa a 40°C.

Se añaden 25 µl de disolución de enzima y se incuba con agitación durante 10 minutos a 40°C.

La enzima añadida debe esterificar 2-5% del colesterol en el ensayo.

También se analiza un blanco con 25µl de agua en lugar de la disolución de enzima.

10 Después de 10 minutos, se añaden 5 ml de Hexano:isopropanol 3:2.

La cantidad de éster de colesterol se analiza por HPTLC usando estándar de estearato de Colesterilo (Sigma C3549) para la calibración.

La actividad transferasa se calcula como la cantidad de formación de éster de colesterol por minuto en las condiciones del ensayo.

15 Una Unidad de Transferasa (TrU) se define como µmol de éster de colesterol producido por minuto a 40°C y pH 7 según el ensayo de transferasa proporcionado anteriormente.

La lípido aciltransferasa usada en el método y usos de la presente invención tendrá una unidad de transferasa (TrU) específica por mg de enzima de la menos 25 TrU/mg de proteína enzimática.

20 Adecuadamente, la lípido aciltransferasa para uso en la presente invención puede dosificarse en cantidad de 0,05 a 50 TrU por g de aceite, adecuadamente en una cantidad de 0,5 a 5 TrU por g de aceite.

Más preferiblemente, las enzimas adecuadas para uso en los métodos y/o usos de la presente invención tienen una actividad lípido aciltransferasa según se define por el protocolo siguiente:

Protocolo para la determinación de % de actividad aciltransferasa:

25 Una aceite comestible al que se ha añadido una lípido aciltransferasa puede extraerse después de la reacción enzimática con CHCl₃:CH₃OH 2:1 y la fase orgánica que contiene el material lipídico se aísla y analiza por GLC y HPLC según el procedimiento detallado a continuación en la presente memoria. A partir de los análisis de GLC y HPLC, se determinan la cantidad de los ácidos grasos libres y uno o más de ésteres de esterol/estanol. Un aceite comestible control al que no se ha añadido ninguna enzima según la presente invención se analiza de la misma manera.

Cálculo:

30 A partir de los resultados de los análisis de GLC y HPLC puede calcularse el incremento en los ácidos grasos libres y ésteres de esterol/estanol:

Δ %ácido graso= % Ácido graso (enzima) - % ácido graso (control);

Mv ácido graso= peso molecular medio de los ácidos grasos;

35 $A = \Delta$ %éster de esterol/Mv éster de esterol (en el que Δ % éster de esterol= % éster de esterol/estanol (enzima) - % éster de esterol/estanol (control) y Mv éster de esterol= peso molecular medio de los ésteres de esterol/estanol);

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

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

Si los ácidos grasos libres están incrementados en el aceite comestible, preferiblemente no están incrementados sustancialmente, es decir, en un grado significativo. Con esto queremos decir que el incremento en el ácido graso libre no afecta adversamente la cantidad del aceite comestible.

5 El aceite comestible usado para el ensayo de la actividad aciltransferasa es preferiblemente aceite de soja suplementado con aceite de esteroles de plantas (1%) y fosfatidilcolina (2%) usando el método:

El esteroles de plantas y la fosfatidilcolina se disolvieron en aceite de soja calentando hasta 95⁰C con agitación. El aceite se enfrió hasta 40⁰C y se añadieron las enzimas. Se añadió agua hasta una concentración total de 5% de la fase de aceite. La muestra se mantuvo a 40⁰C con agitación magnética y se tomaron muestras después de 4 y 20 horas y se analizaron por TLC.

10 Para el ensayo, la dosificación de la enzima usada es preferiblemente 0,2 TIPU-K/g de aceite, más preferiblemente 0,08 TIPU-K/g de aceite, preferiblemente 0,01 TIPU-K/g de aceite. El nivel de fosfolípido presente en el aceite y/o el % de conversión de esteroles se determina preferiblemente después de 0,5, 1, 2, 4 y 20 horas, más preferiblemente después de 20 horas.

15 Cuando la enzima usada es una enzima lípido aciltransferasa, preferiblemente el tiempo de incubación es eficaz para asegurar que hay al menos 5% de actividad transferasa, preferiblemente al menos 10% de actividad transferasa, preferiblemente al menos 15%, 20%, 25%, 26%, 28%, 30%, 40%, 50%, 60% ó 75% de actividad transferasa.

El % de actividad transferasa (es decir, la actividad transferasa como un porcentaje de la actividad enzimática total) puede determinarse por el protocolo enseñado anteriormente.

20 En algunos aspectos de la presente invención, el término "sin incrementar sustancialmente los ácidos grasos libres" tal y como se usa en la presente memoria significa que la cantidad de ácidos grasos libres en un aceite comestible tratado con una lípido aciltransferasa según la presente invención es menor que la cantidad del ácido graso libre producido en el aceite comestible cuando se ha usado una enzima distinta de una lípido aciltransferasa según la presente invención, tal como por ejemplo comparado con la cantidad de ácido graso libre producido cuando se ha usado una enzima fosfolípasa convencional, por ejemplo, Lecitasa Ultra™ (Novozymes A/S, Dinamarca).

25 Además de, o en lugar de, evaluar el % de actividad transferasa en un aceite (anterior), para identificar las enzimas lípido aciltransferasas lo más preferible para uso en los métodos de la invención, puede emplearse el ensayo siguiente titulado "Protocolo para identificar lípido aciltransferasas para uso en la presente invención".

Protocolo para identificar lípido aciltransferasas

Una lípido aciltransferasa según la presente invención es una que resulta en:

30 i) la eliminación de fosfolípido presente en un aceite de soja suplementado con esteroles de plantas (1%) y fosfatidilcolina (2%) (usando el método: El esteroles de plantas y la fosfatidilcolina se disolvieron en aceite de soja calentando hasta 95⁰C con agitación. El aceite se enfrió hasta 40⁰C y se añadieron las enzimas. La muestra se mantuvo a 40⁰C con agitación magnética y se tomaron muestras después de 0,5, 1, 2, 4 y 20 horas y se analizaron por TLC);

y/o

35 ii) la conversión (% de conversión) del esteroles añadido a éster-esteroles (usando el método enseñado en i) anterior). Puede usarse el método de GLC para determinar el nivel de esteroles y ésteres de esteroles según se enseña en el Ejemplo 2.

40 Para el ensayo, la dosificación de la enzima usada puede ser 0,2 TIPU-K/g de aceite, preferiblemente 0,08 TIPU-K/g de aceite, preferiblemente 0,01 TIPU-K/g de aceite. El nivel de fosfolípido presente en el aceite y/o la conversión (% de conversión) de esteroles se determina preferiblemente después de 0,5, 1, 2, 4 y 20 horas, más preferiblemente después de 20 horas.

45 En el protocolo para identificar las lípido aciltransferasas, después del tratamiento enzimático, se añade preferiblemente 5% de agua y se mezcla concienzudamente con el aceite. El aceite se separa en una fase de aceite y de agua usando centrifugación (véase "Enzyme-catalyzed degumming of vegetable oils" por Buchold, H. y Laurgi A.-G., Fett Wissenschaft Technologie (1993), 95(8), 300-4, ISSN: 0931-5985) y la fase de aceite puede analizarse para contenido de fósforo usando el protocolo siguiente ("Ensayo para Contenido de Fósforo"):

Ensayo para Contenido de Fósforo

El nivel de fosfolípido presente en un aceite después de desgomado con agua se determina preparando en primer lugar la muestra de aceite según la preparación de muestra enseñada en el Método Oficial AOAC 999.10 (>Lead, Cadmium,

Zinc, Copper and Iron in Foods Atomic Absorption Spectrophotometry after Microwave Digestion, First Action 1999 NMKL-AOAC Method). La cantidad de fosfolípidos en el aceite se mide analizando el contenido de fósforo en la muestra de aceite después del desgomado según el Método Oficial AOAC Ca 20-99: Analysis of Phosphorus in oil by inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy.

5 La cantidad de fósforo presente en la fase de aceite después de usar la presente invención no es típicamente significativamente diferente del contenido de fósforo en la fase de aceite después de desgomado con agua convencional (es decir, sin enzima).

10 El rendimiento de aceite en la fase de aceite usando la presente invención está sustancialmente incrementado comparado con la fase de aceite después de usar un proceso de desgomado con agua convencional (es decir, sin enzima). Adecuadamente, el proceso y/o uso según la presente invención mejora el rendimiento aproximadamente 0,25 a 7%, tal como aproximadamente 0,25 a 3%, o aproximadamente 0,5 a 2%, o aproximadamente 1 a 2% comparado con el mismo aceite que ha experimentado el mismo proceso de desgomado con agua sin la adición de la enzima.

15 Sorprendentemente, se ha encontrado que la adición de enzima en el proceso según la presente invención proporciona un rendimiento de aceite significativamente mayor en la fase de aceite sin necesariamente reducir significativamente el contenido de fósforo de la fase de aceite comparado con una fase de aceite comparable obtenida usando un proceso de desgomado con agua comparativo pero sin adición de enzima.

20 Adecuadamente, la cantidad de fósforo en la fase de aceite cuando el aceite se ha tratado según un proceso o uso de la presente invención puede ser 0-80%, adecuadamente 0-50%, adecuadamente 0-10%, adecuadamente 0-1% menos que el contenido de fósforo de una fase de aceite obtenida usando un proceso de desgomado con agua comparativo pero sin adición de enzima.

De forma importante, la fase de aceite obtenida en el proceso según la presente invención puede desgomarse adicionalmente para eliminar los fosfátidos y/o fosfolípidos. Por ejemplo, la fase de aceite puede experimentar bien desgomado enzimático y/o desgomado ácido.

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

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

30 En algunos aspectos, la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede comprender un resto GDSx y/o un resto GANDY.

Preferiblemente, la enzima lípido aciltransferasa se caracteriza como una enzima que posee actividad aciltransferasa y que comprende el resto de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los residuos de aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

35 Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa o lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede obtenerse, preferiblemente se obtiene, a partir de un organismo de uno o más de los géneros siguientes: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfotobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Candida*. Preferiblemente, la lípido aciltransferasa puede obtenerse, preferiblemente se obtiene, a partir de un organismo del género *Aeromonas*.

40 En algunos aspectos de la presente invención, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención, codifica una lípido aciltransferasa que comprende un residuo de ácido aspártico en una posición correspondiente a N-80 en la secuencia de aminoácidos de la lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* mostrada como SEQ ID No. 35.

45 En algunos aspectos de la presente invención, la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que comprende un residuo de ácido aspártico en una posición correspondiente a N-80 en la secuencia de aminoácidos de la lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* mostrada como SEQ ID No. 35.

50 Además de o alternativamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención, codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la

secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 16 o una secuencia de aminoácidos que tiene un 75% o más de homología con ésta. Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No.16.

5 Además de o alternativamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención, codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 68 o una secuencia de aminoácidos que tiene un 75% o más de homología con ésta. Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No.68.

10 En una realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68 o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75% de identidad con ésta, preferiblemente al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 98% de identidad con ésta.

15 En una realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención está codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 49 o está codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75% de identidad con ésta, preferiblemente al menos 80%, preferiblemente al menos 85%, preferiblemente al menos 95%, preferiblemente al menos 98% de identidad con ésta.

20 En una realización, preferiblemente la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que se expresa en *Bacillus licheniformis* transformando dicho *B. licheniformis* con una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 1 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 75% de identidad con ésta (más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 85%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98% de identidad con ésta); cultivando dicho *B. licheniformis* y aislando la o las lípido aciltransferasas producidas en éste.

El término "aceite comestible" tal y como se usa en la presente memoria puede englobar aceites vegetales.

25 Preferiblemente, el aceite comestible antes del tratamiento según la presente invención es un aceite comestible crudo que comprende un contenido de fósforo no hidratable de aproximadamente 50-300 ppm, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 50-1.400 ppm, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 200-1.400 ppm e incluso más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 400-1.200 ppm.

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

Preferiblemente, el aceite comestible es un aceite vegetal.

35 Los aceites englobados por el método según la presente invención pueden incluir, pero no están limitados a, uno o más de aceite de soja, aceite de canola, aceite de maíz, aceite de algodón, aceite de palma, aceite de coco, aceite de arroz integral, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de alazor, aceite de nuez de palmera, aceite de colza y aceite de girasol.

Preferiblemente, el aceite es uno o más de aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol y aceite de colza (algunas veces referido como aceite de canota).

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

Lo más preferiblemente, el aceite es aceite de soja.

40 Tal y como se usa en la presente memoria, "aceite crudo" (también referido en la presente memoria como un aceite no desgomado) puede ser un aceite prensado o extraído o una mezcla de éstos.

El contenido de fosfátido en un aceite crudo puede variar de 0,5-3% p/p correspondiente a un contenido de fósforo en el intervalo de 200-1.200 ppm, más preferiblemente en el intervalo de 250-1.200 ppm.

45 Aparte de los fosfátidos, el aceite crudo también puede contener concentraciones pequeñas de carbohidratos, compuestos azucarados y complejos metal/fosfátido ácido de Ca, Mg y Fe.

Ventajosamente, el método y usos de la presente invención permiten el desgomado de aceites comestibles en entornos con poca agua (<5°C, preferiblemente menos de 2%, más preferiblemente menos de 1%). Por lo tanto, el desgomado

con agua puede realizarse añadiendo menos agua que cuando se usa un proceso de desgomado con agua convencional.

Una ventaja adicional de la presente invención es la producción de ésteres de esterol en la fase de aceite.

5 Adecuadamente, la enzima puede dosificarse en un intervalo de aproximadamente 0,01-10 TIPU-K/g de aceite, adecuadamente la enzima puede dosificarse en un intervalo de aproximadamente 0,05 a 1,5 TIPU-K/g de aceite, más preferiblemente a 0,2-1 TIPU-K/g de aceite.

10 Cuando la enzima es una lípido aciltransferasa adecuadamente puede dosificarse en el intervalo de aproximadamente 0,01 unidades TIPU-K/g de aceite a 5 unidades TIPU-K/g de aceite. En una realización, la lípido aciltransferasa puede dosificarse en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1 unidad TIPU-K/g de aceite, más preferiblemente la lípido aciltransferasa puede dosificarse en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,5 unidades TIPU-K/g de aceite, más preferiblemente la lípido aciltransferasa puede dosificarse en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,3 unidades TIPU-K/g de aceite.

15 Cuando la enzima es una fosfolipasa adecuadamente puede dosificarse en el intervalo de aproximadamente 0,5-10 unidades TIPU-K/g de aceite. En una realización, la fosfolipasa puede dosificarse en el intervalo de aproximadamente 0,5-5 unidades TIPU-K/g de aceite, preferiblemente la fosfolipasa puede dosificarse en el intervalo de aproximadamente 0,5-1,5 unidades TIPU-K/g de aceite. Adecuadamente, la fosfolipasa puede dosificarse en el intervalo de aproximadamente 1,0-3 unidades TIPU-K/g de aceite.

Actividad fosfolipasa, TIPU-K:

20 *Sustrato:* 1,75% L-Fosfatidilcolina de Planta 95% (441601, Avanti Polar Lipids), 6,3% Tritón X-100 (#T9284, Sigma) y 5 mM CaCl₂ disuelto en 50 mM Hepes pH 7,0. *Procedimiento del ensayo:* Las muestras, calibración y control se diluyeron en 10 mM HEPES pH 7,0, 0,1% Tritón X-100 (#T9284, Sigma). Los análisis se llevaron a cabo usando un Autoanalizador Konelab (Thermo, Finlandia). El ensayo se corrió a 30C. 34 µL del sustrato se termostataron durante 180 segundos, antes de añadir 4 µL de muestra. La enzimación duró 600 seg. La cantidad de ácido graso libre liberado durante la enzimación se midió usando el kit NEFA C (999-75406, WAKO, Alemania). Se añadieron 56 µL de NEFA A y la mezcla se incubó durante 300 seg. Posteriormente, se añadieron 113 µL de NEFA B y la mezcla se incubó durante 300 seg. Se midió la DO a 520 nm. La actividad enzimática (µmoles FFA/minmL) se calculó tomando como base una preparación enzimática estándar.

La actividad enzimática TIPU-K se calculó como micromoles de ácido graso libre (FFA) producidos por minuto en las condiciones del ensayo.

30 En la presente invención el proceso preferiblemente no es un proceso de neutralización cáustico (es decir, no es un proceso de desgomado con agua ácido y/o no es un proceso de desgomado cáustico ácido). En otras palabras, el proceso preferiblemente no comprende la adición de ácidos (tales como ácidos fosfórico, cítrico, ascórbico, sulfúrico, fumárico, maleico, clorhídrico y/o acético) o cáusticos (tales como KOH y NaOH) o no comprende la adición de cantidades sustanciales de ácidos o cáusticos. En otras palabras, si se añaden ácidos y/o cáusticos en el proceso de la presente invención, se añaden a menos de 0,004%.

Para facilitar la referencia, éstos y otros aspectos de la presente invención se discuten ahora en los encabezados de las secciones apropiadas. Sin embargo, las enseñanzas en cada sección no están necesariamente limitadas a cada sección particular.

Fosfolipasa C

40 Como se ha mencionado anteriormente, la enzima que degrada fosfolípidos (preferiblemente una lípido aciltransferasa) puede usarse en combinación con una fosfolipasa C (E.C. 3.1.4.3).

45 La fosfolipasa C puede ser cualquier enzima fosfolipasa C disponible y puede seleccionarse de una o más de las enzimas fosfolipasa C siguientes: Purifine® (disponible en Verenum, EEUU); una fosfolipasa C de *Clostridium perfringens* (tal como la fosfolipasa C disponible en Sigma, Ref P7633); una fosfolipasa C de *Bacillus cereus* (tal como la fosfolipasa C disponible en Sigma, Ref P6621); una enzima fosfolipasa C enseñada en WO2008/036863.

VENTAJAS

Una ventaja de la presente invención es que se obtiene un rendimiento de aceite incrementado al final del proceso de desgomado con agua. Este incremento en el rendimiento de aceite se compara con un proceso de desgomado con agua comparable pero sin la adición de una enzima según la presente invención.

5 Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, el rendimiento incrementado puede deberse a un efecto emulsionante disminuido causado por la eliminación de los fosfolípidos a la fase de goma. Los fosfolípidos son buenos emulsionantes y pueden emulsionar con triacilglicérido así cuando los fosfolípidos se eliminan a la fase de goma parte del aceite en la forma de triacilglicérido (aceite) también se elimina. Una reducción en la viscosidad de la fase de goma debida a la degradación de los fosfolípidos ayuda a evitar la pérdida de aceite a la fase de goma (ya que la separación de la fase de goma y el aceite es mucho más fácil).

10 Además de o alternativamente a (sin pretender la vinculación a ninguna teoría) cuando se usa una lípido aciltransferasa según la presente invención se forman ésteres de esteroles por la transferencia de un resto de ácido graso de un fosfolípido a un esteroles. Este resto de ácido graso esterificado a esteroles por la reacción de la enzima lípido aciltransferasa se encuentra en la fase de aceite y no en la fase de goma. En los procesos de desgomado con agua convencionales (sin la adición de lípido aciltransferasa) estos restos de ácido graso se pierden en la fase de goma.

Una ventaja adicional de la presente invención es que cuando se usa una lípido aciltransferasa, el pH en el proceso de desgomado con agua (aproximadamente pH 5,0 ó 5,5 a aproximadamente pH 6,5 ó 7) no necesita ajustarse. Este pH resulta en una reactividad mayor de la lípido aciltransferasa.

15 Otra ventaja de la presente invención cuando se usa una lípido aciltransferasa es que el ácido graso de los fosfolípidos se transfiere a un esteroles para formar ésteres de esteroles. Esto en sí mismo puede contribuir a un incremento de entre 0,1 a 0,15% en el rendimiento de la fase de aceite.

20 Una ventaja adicional de la presente invención (particularmente cuando se usa una lípido aciltransferasa) es que la fase de goma es menos viscosa comparada con la fase de goma de un proceso de desgomado con agua comparable pero sin la adición de una enzima según la presente invención. Una viscosidad menor en la fase de goma resulta en que ésta es más fácil de separar de la fase de aceite, es decir, por centrifugación.

Además, la fase de goma puede tener un contenido de agua menor y por lo tanto puede ser más fácil secarla.

Una ventaja adicional más de la presente invención es que hay una concentración reducida de triglicérido en la fase de goma.

25 El proceso de la presente invención puede resultar en un ensuciamiento disminuido de la planta de procesamiento. Esto significa que la limpieza de la planta puede ser más fácil.

30 Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, se ha encontrado sorprendentemente que la lípido aciltransferasa puede usar el diglicérido (producido por la reacción de la fosfolipasa C) como una molécula aceptora para producir triglicérido. Así, cuando se usa una lípido aciltransferasa en combinación con una fosfolipasa C la interacción entre estas enzimas resulta en un incremento sinérgico de la cantidad de triglicérido en un aceite que comprende ambas enzimas comparado con un aceite comparable que comprende una de las enzimas sola o un aceite comparable que no comprende enzima. Cuando se usa una lípido aciltransferasa en combinación con una fosfolipasa C la interacción entre estas enzimas resulta en un incremento sinérgico del rendimiento del aceite en un aceite que comprende ambas enzimas comparado con un aceite comparable que comprende una de las enzimas sola o un aceite comparable que no comprende enzima.

35 El uso de una combinación de estas enzimas tiene ventajas significativas sobre el uso de una fosfolipasa C sola ya que la acumulación de diglicéridos en un aceite (que puede ocurrir cuando se usa una fosfolipasa C sola) puede ser perjudicial para el aceite porque puede tener un impacto negativo en el "punto de humo" del aceite y/o puede tener un impacto negativo en las propiedades de cristalización de fuentes de grasa más saturadas.

40 Por lo tanto, en la presente invención otra ventaja del uso de lípido aciltransferasas (particularmente cuando se usan en combinación con una fosfolipasa C) es que la cantidad de diglicérido en el aceite puede reducirse comparado con un aceite comparable sin la lípido aciltransferasa y/o particularmente comparado con un aceite comparable tratado con fosfolipasa C sola.

45 El uso de la o las enzimas según la presente invención puede reducir la cantidad de agua necesaria en el proceso hasta menos de aproximadamente 1%. Esto puede resultar en una ventaja económica significativa en un proceso de desgomado con agua. Por lo tanto, la capacidad de reducir la cantidad de agua hasta menos de aproximadamente 1% puede dar lugar a reducciones significativas del coste.

50 Preferiblemente, el tratamiento con la enzima ocurre en el proceso de desgomado sin ajustar el pH del aceite y/o agua. Esto resulta en una ventaja significativa sobre los procesos de la técnica anterior que usan enzimas fosfolipasa A que típicamente sólo son altamente activas en condiciones de pH ácido. Típicamente, en los procesos de la técnica anterior (por ejemplo, que usan enzimas fosfolipasa A) el pH del aceite debe ajustarse antes y/o durante el proceso de desgomado. Esto no es necesario con la presente invención.

Además, el uso de una lípido aciltransferasa en combinación con una enzima fosfolipasa C tiene una ventaja significativa comparado con el uso de dicha fosfolipasa A con una enzima fosfolipasa C porque el pH óptimo para las lípido aciltransferasas coincide típicamente mucho mejor con el pH óptimo para las enzimas fosfolipasa C. Por lo tanto, generalmente no hay "conflicto de pH" cuando se usan lípido aciltransferasas en combinación con enzimas fosfolipasa C. Esto contrasta mucho con el uso de enzimas fosfolipasa A en combinación con enzimas fosfolipasa C. Por lo tanto, el uso de lípido aciltransferasas en combinación con enzimas fosfolipasa C proporciona una mejora significativa ya que ambas enzimas pueden funcionar en su intervalo óptimo de pH o simultáneamente.

De forma importante, en el método que comprende el tratamiento de la fase de goma con una lípido aciltransferasa (bien sola o en combinación con una fosfolipasa C) el "aceite ácido" producido al final de este proceso puede venderse con un valor más alto que la fase de goma normal que se añade a los alimentos. Además, se ha encontrado sorprendentemente que la fase de goma remanente (después de la separación del aceite ácido) tiene un nivel de fósforo mayor que la goma normal y puede usarse así como una fuente de fósforo orgánico.

CÉLULA HUÉSPED

El organismo huésped puede ser un organismo procariota o eucariota.

En una realización de la presente invención, la lípido aciltransferasa según la presente invención se expresa en una célula huésped, por ejemplo, una célula bacteriana, tal como una especie de *Bacillus*, por ejemplo una célula huésped *Bacillus licheniformis*.

Las células huésped alternativas pueden ser hongos, levaduras o plantas, por ejemplo,

Se ha encontrado que el uso de una célula huésped *Bacillus licheniformis* resulta en una expresión incrementada de una lípido aciltransferasa cuando se compara con otros organismos, tales como *Bacillus subtilis*.

Una lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* se ha insertado en varios vectores de expresión convencionales, diseñados para ser óptimos para la expresión en *Bacillus subtilis*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Aspergillus tubigensis*, respectivamente. Sin embargo, sólo se detectaron niveles muy bajos en *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Aspergillus tubigensis*. Los niveles de expresión fueron menores de 1 µg/ml y no fue posible seleccionar células que rindieran proteína suficiente para iniciar un producción comercial (resultados no mostrados). Por el contrario, *Bacillus licheniformis* fue capaz de producir niveles de proteína que son atractivos para una producción económicamente factible.

En particular, se ha encontrado que la expresión en *B. licheniformis* es aproximadamente 100 veces mayor que la expresión en *B. subtilis* bajo el control del promotor aprE o es aproximadamente 100 veces mayor que la expresión en *S. lividans* bajo el control de un promotor A4 y fusionado con celulosa (resultados no mostrados en la presente memoria).

La célula huésped puede ser cualquier célula de *Bacillus* distinta de *B. subtilis*. Preferiblemente, dicha célula huésped *Bacillus* es una de las especies siguientes: *Bacillus licheniformis*; *B. alkalophilus*; *B. amyloliquefaciens*; *B. circulans*; *B. clausii*; *B. coagulans*; *B. firmus*; *B. lautus*; *B. lentus*; *B. megaterium*; *B. pumilus* o *B. stearothermophilus*.

El término "célula huésped" - en relación con la presente invención incluye cualquier célula que comprende bien una secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa como se define en la presente memoria o un vector de expresión como se define en la presente memoria y que se usa en la producción recombinante de una lípido aciltransferasa que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria.

Adecuadamente, la célula huésped puede ser una cepa deficiente en proteasa o sin proteasa y/o una cepa deficiente en α -amilasa o sin α -amilasa.

El término "heteróloga" tal y como se usa en la presente memoria significa una secuencia derivada de una fuente o especie genética separada. Una secuencia heteróloga es una secuencia que no es del huésped, una secuencia modificada, una secuencia de una cepa diferente de célula huésped o una secuencia homóloga de una localización cromosómica diferente de la célula huésped.

Una secuencia "homóloga" es una secuencia que se encuentra en la misma fuente o especie genética, es decir, aparece naturalmente en la especie relevante de la célula huésped.

El término "lípido aciltransferasa recombinante" tal y como se usa en la presente memoria significa que la lípido aciltransferasa se ha producido por medio de recombinación genética. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la lípido aciltransferasa se ha insertado en un vector de clonación, lo que resulta en una célula *B. licheniformis* caracterizada por la presencia de la lípido aciltransferasa heteróloga.

SECUENCIAS REGULADORAS

5 En algunas aplicaciones, una secuencia de lípido aciltransferasa para uso en los métodos y/o usos de la presente invención puede obtenerse uniendo de manera operativa una secuencia de nucleótidos que codifica la misma a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos, tal como por la célula huésped elegida (tal como una célula de *B. licheniformis*).

Como ejemplo, puede usarse un vector que comprende la secuencia de nucleótidos unida de manera operativa a dicha secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.

10 El término "unido de manera operativa" se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Una secuencia reguladora "unida de manera operativa" a una secuencia codificadora está ligada de manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue bajo condiciones compatibles con las secuencias control.

El término "secuencias reguladoras" incluye promotores y amplificadores y otras señales de regulación de la expresión.

El término "promotor" se usa en el sentido normal de la técnica, por ejemplo, un sitio de unión de ARN polimerasa.

15 La expresión aumentada de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria también puede conseguirse por la selección de regiones reguladoras, por ejemplo, promotor, líder de secreción y regiones terminadoras que no son regiones reguladoras para la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima en la naturaleza.

Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos puede estar unida de manera operativa al menos a un promotor.

20 Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa puede estar unida de manera operativa a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia terminadora. Los ejemplos de secuencias terminadoras adecuadas para uso en uno cualquiera de los vectores, células huésped, métodos y/o usos de la presente invención incluyen: una secuencia terminadora de α -amilasa (por ejemplo, CGGGACTTACCGAAAGAAACCATCAATGATGGTTTTCTTTTTGTTTCATAAA - SEQ ID No. 64) una secuencia terminadora de proteasa alcalina (por ejemplo, CAAGACTAAAGACCGTTCCGCCGTTTTGCAATAAGCGGGCGAATCTTACAT - AAAA ATA - SEQ ID No. 65), una secuencia terminadora específica de ácido glutámico (por ejemplo, ACGGCCGTTAGATGTGACAGCCCGTTCCAAAAGGAAGCGGGCTGTCTTCGTGTAT TATTGT - SEQ ID No. 66), una secuencia terminadora de levanasa (por ejemplo, TCTTTTAAAGGAAAGGCTGGAATGCCCGGCATTCCAGCCACATGAT CATCGTTT- SEQ ID No. 67) y una secuencia terminadora de subtilisina E (por ejemplo, GCTGACAAATAAAAAGAAGCAGGTATGGAGGAACCTGCTTCTTTTTACTATTATTG). Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa puede estar unida de manera operativa a un terminador de α -amilasa, tal como un terminador de α -amilasa de *B. licheniformis*.

PROMOTOR

35 La secuencia promotora que se va a usar según la presente invención puede ser heteróloga u homóloga a la secuencia que codifica una lípido aciltransferasa.

La secuencia promotora puede ser cualquier secuencia promotora capaz de dirigir la expresión de una lípido aciltransferasa en la célula huésped elegida.

40 Adecuadamente, la secuencia promotora puede ser homóloga a una especie de *Bacillus*, por ejemplo *B. licheniformis*. Preferiblemente, la secuencia promotora es homóloga a la célula huésped elegida.

Adecuadamente, la secuencia promotora puede ser homóloga a la célula huésped. "Homóloga a la célula huésped" significa que se origina en el organismo huésped; es decir, una secuencia promotora que se encuentra naturalmente en el organismo huésped.

45 Adecuadamente, la secuencia promotora puede seleccionarse del grupo que consiste en una secuencia de nucleótidos que codifica: un promotor de α -amilasa, un promotor de proteasa, un promotor de subtilisina, un promotor de proteasa específica de ácido glutámico y un promotor de levansacarasa.

Adecuadamente, la secuencia promotora puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica: LAT (por ejemplo, el promotor de alfa-amilasa de *B. licheniformis*, también conocido como AmyL), AprL (por ejemplo, promotor de subtilisina

Carlsberg), EndoGluc (por ejemplo, el promotor específico de ácido glutámico de *B. licheniformis*), AmyQ (por ejemplo, el promotor de alfa amilasa de *B. amyloliquefaciens*) y SacB (por ejemplo, el promotor de levansacarasa de *B. subtilis*).

Otros ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de una secuencia de ácido nucleico en los métodos de la presente invención incluyen: el promotor del gen de la proteasa alcalina de *Bacillus lentus* (aprH); el promotor del gen de la alfa-amilasa de *Bacillus subtilis* (amyE); el promotor del gen de la amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM); el promotor del gen de la penicilinas de *Bacillus licheniformis* (penP); los promotores de los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*; y/o el promotor del gen CryIIIA de *Bacillus thuringiensis* subesp. *tenebrionis*.

En una realización preferida, la secuencia promotora es un promotor de α -amilasa (tal como un promotor de α -amilasa de *Bacillus licheniformis*). Preferiblemente, la secuencia promotora comprende la secuencia -35 a -10 del promotor de α -amilasa de *B. licheniformis*- véanse las Figuras 53 y 55.

La "secuencia -35 a -10" describe la posición relativa al sitio de inicio de la transcripción. Tanto "-35" como "-10" son cajas, es decir, un número de nucleótidos, cada uno comprendiendo 6 nucleótidos y estas cajas están separadas por 17 nucleótidos. Estos 17 nucleótidos se refieren habitualmente como un "espaciador". Esto se ilustra en la Figura 55, en la que las cajas -35 y -10 están subrayadas. Para evitar dudas, cuando se usa "secuencia -35 a -10" en la presente memoria se refiere a una secuencia desde el inicio de la caja -35 hasta el final de la caja -10, es decir, incluyendo la caja -35, el espaciador con una longitud de 17 nucleótidos y la caja -10.

PÉPTIDO SEÑAL

La lípido aciltransferasa producida por una célula huésped por expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la lípido aciltransferasa puede secretarse o puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o del vector usado.

Puede usarse una secuencia señal para dirigir la secreción de las secuencias codificadoras a través de una membrana celular particular. Las secuencias señal pueden ser naturales o extrañas a la secuencia que codifica la lípido aciltransferasa. Por ejemplo, la secuencia que codifica el péptido señal puede obtenerse a partir de un gen de amilasa o proteasa de una especie de *Bacillus*, preferiblemente de *Bacillus licheniformis*.

Las secuencias adecuadas que codifican el péptido señal pueden obtenerse de uno o más de los genes siguientes: gen de la α -amilasa maltogénica, gen de subtilisina, gen de beta-lactamasa, gen de proteasa neutra, gen prsA y/o gen de aciltransferasa.

Preferiblemente, el péptido señal es un péptido señal de α -amilasa de *B. licheniformis*, aciltransferasa de *Aeromonas* (por ejemplo, mkkwfvclgltvqqa- SEQ ID No. 21), subtilisina de *B. subtilis* (por ejemplo, mrskklwisllfalfitmfafsnmsaq- SEQ ID No. 22) o subtilisina de *B. licheniformis* (por ejemplo, mmrksfwgmltfaflvftmefdsasa- SEQ ID No. 23). Adecuadamente, el péptido señal puede ser el péptido señal de α -amilasa de *B. licheniformis*.

Sin embargo, puede usarse cualquier secuencia que codifica un péptido señal capaz de dirigir la lípido aciltransferasa expresada en la ruta secretora de una célula huésped de *Bacillus* (preferiblemente una célula huésped *B. licheniformis*) elegida.

En algunas realizaciones de la presente invención, una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido señal puede unirse de manera operativa a una secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa elegida.

La lípido aciltransferasa elegida puede expresarse en una célula huésped como se define en la presente memoria como una proteína de fusión.

VECTOR DE EXPRESIÓN

El término "vector de expresión" significa una construcción capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*.

Preferiblemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma del organismo, tal como un huésped *B. licheniformis*. El término "incorporado" preferiblemente engloba incorporación estable en el genoma.

La secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa como se define en la presente memoria puede estar presente en un vector, en el que la secuencia de nucleótidos está unida de manera operativa a secuencias reguladoras de manera que las secuencias reguladoras son capaces de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos por un organismo huésped adecuado (tal como *B. licheniformis*), es decir, el vector es un vector de expresión.

Los vectores pueden transformarse en una célula huésped adecuada como se ha descrito anteriormente para proporcionar la expresión de un polipéptido que tiene actividad lípido aciltransferasa como se define en la presente memoria.

5 La elección del vector, por ejemplo, vector de plásmido, cósmido, virus o fago, inserto genómico, dependerá habitualmente de la célula huésped en la que se va a introducir. La presente invención puede englobar otras formas de vectores de expresión que tienen funciones equivalentes y que son, o se convierten en, conocidos en la técnica.

Una vez transformado en la célula huésped elegida, el vector puede replicarse y funcionar independientemente del genoma de la célula huésped, o puede integrarse en el genoma mismo.

10 Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables- tal como un gen que confiere resistencia a antibiótico, por ejemplo, resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección puede conseguirse por co-transformación (como se describe en WO91/17243).

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

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

LÍPIDO ACIL TRANSFERASA

La secuencia de nucleótidos que codifica una lípido acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede codificar una lípido acil transferasa natural o una lípido acil transferasa variante.

20 La lípido acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido acil transferasa natural o una lípido acil transferasa variante.

Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido acil transferasa para uso en la presente invención puede ser una como se describe en WO2004/064537, WO2004/064987, WO2005/066347 o WO2006/008508.

25 El término "lípido acil transferasa" tal y como se usa en la presente memoria significa preferiblemente una enzima que tiene actividad aciltransferasa (clasificada generalmente como E.C. 2.3.1.x, por ejemplo, 2.3.1.43), mediante la cual la enzima es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido a uno o más sustratos aceptores, tal como uno o más de los siguientes: un esteroles; un estanol; un carbohidrato; una proteína; una subunidad de proteína; un azúcar alcohol, tal como ácido ascórbico y/o glicerol- preferiblemente, glicerol y/o un esteroles, tal como colesterol.

30 Preferiblemente, la lípido acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que es capaz de transferir un grupo acilo desde un fosfolípido (como se define en la presente memoria) a un azúcar alcohol, tal como ácido ascórbico y/o glicerol y/o un esteroles, preferiblemente glicerol o un esteroles, lo más preferiblemente un esteroles (por ejemplo, colesterol).

35 Para algunos aspectos, el "aceptor de acilo" según la presente invención puede ser cualquier compuesto que comprende un grupo hidroxilo (-OH), tal como por ejemplo, alcoholes polivalentes, incluyendo glicerol; esterol; estanoles; carbohidratos; hidroxiacidos incluyendo ácidos de fruta, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico y ácido ascórbico; proteínas o una subunidad de éstas, tal como aminoácidos, hidrolizados de proteínas y péptidos (proteína parcialmente hidrolizada) por ejemplo; y mezclas y derivados de éstos. Preferiblemente, el "aceptor de acilo" según la presente invención no es agua.

El aceptor de acilo no es preferiblemente un monoglicérido.

40 En una realización, el aceptor de acilo puede ser un diglicérido.

La lípido aciltransferasa para uso en los métodos y/o usos de la presente invención es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido a un esteroles y/o un estanol.

45 En otro aspecto, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos y/o usos de la presente invención puede, además de ser capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido a un esteroles y/o un estanol, ser capaz adicionalmente de transferir el grupo acilo desde un lípido a uno o más de los siguientes: un carbohidrato, una proteína, una subunidad de proteína, glicerol, alcohol glicol.

5 Adecuadamente, el aceptor de acilo puede encontrarse naturalmente en el aceite. Alternativamente, el aceptor de acilo puede añadirse al aceite (por ejemplo, el aceptor de acilo puede ser extraño para el aceite). Por ejemplo, en algunas realizaciones puede añadirse un esteroil y/o estanol al aceite antes de o durante el proceso de desgomado. Esto es particularmente importante si la cantidad de aceptor de acilo es limitante de la velocidad de la reacción de la aciltransferasa. La adición de un aceptor de acilo puede dar lugar a reducciones en los ácidos grasos libres y/o a la formación mayor del éster del aceptor de acilo comparado con un aceite en el que no se añade aceptor de acilo adicional.

Preferiblemente, el sustrato lipídico sobre el que actúa el acilo lipídico es uno o más de los lípidos siguientes: un fosfolípido, tal como una lecitina, por ejemplo, fosfatidilcolina y/o fosfatidiletanolamina.

10 El sustrato lipídico puede referirse en la presente memoria como el "donante de acilo lipídico". El término lecitina tal y como se usa en la presente memoria engloba fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.

15 Las lípidos aciltransferasas preferidas para uso en la presente invención se identifican como aquellas que tienen una alta actividad tales como actividad hidrolítica de fosfolípidos alta o actividad transferasa de fosfolípidos alta en fosfolípidos en un entorno de aceite, lo más preferiblemente las lípidos acil transferasas para uso en la presente invención tienen una actividad transferasa de fosfolípidos a esteroil alta.

20 Como se ha detallado anteriormente, otras acil-transferasas adecuadas para uso en los métodos de la invención pueden identificarse identificando la presencia de los bloques GDSx, GANDY y HPT bien por alineamiento de la secuencia consenso pFam00657 (SEQ ID NO. 1) y/o alineamiento a una aciltransferasa GDSx, por ejemplo, SEQ ID No. 28. Con el fin de evaluar su idoneidad para el desgomado, es decir, identificar aquellas enzimas que tienen una actividad transferasa de al menos 5%, más preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% y más preferiblemente al menos 98% de la actividad enzimática total, dichas aciltransferasas se ensayan usando el ensayo "Protocolo para la determinación del % de actividad aciltransferasa" detallado anteriormente en la presente memoria.

Para algunos aspectos, preferiblemente la lípidos acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípidos aciltransferasa que es incapaz, o sustancialmente incapaz, de actuar en un triglicérido y/o un 1-monoglicérido y/o 2-monoglicérido.

30 Para algunos aspectos, preferiblemente la lípidos acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípidos aciltransferasa que no presenta actividad triacilglicerol lipasa (E.C. 3.1.1.3) o no presenta actividad triacilglicerol lipasa (E.C. 3.1.1.3) significativa.

35 La capacidad para hidrolizar triglicérido (actividad E.C. 3.1.1.3) puede determinarse por actividad lipasa se determina según Food Chemical Codex (3ª Ed., 1981, p 492-493) modificado para aceite de girasol y pH 5,5 en lugar de aceite de oliva y pH 6,5. La actividad lipasa se mide como LUS (unidades lipasa de girasol) en el que 1 LUS se define como la cantidad de enzima que puede liberar 1 [mu]mol de ácidos grasos por minuto de aceite de girasol bajo las condiciones de ensayo anteriores. Alternativamente, puede usarse el ensayo LUT como se define en WO9845453.

40 La lípidos acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípidos aciltransferasa que es sustancialmente incapaz de actuar en un triglicérido puede tener una LUS/mg de menos de 1.000, por ejemplo menor de 500, tal como menor de 300, preferiblemente menor de 200, más preferiblemente menor de 100, más preferiblemente menor de 50, más preferiblemente menor de 20, más preferiblemente menor de 10, tal como menor de 5, menor de 2, más preferiblemente menor de 1 LUS/mg. Alternativamente, la actividad LUT/mg es menor de 500, tal como menor de 300, preferiblemente menor de 200, más preferiblemente menor de 100, más preferiblemente menor de 50, más preferiblemente menor de 20, más preferiblemente menor de 10, tal como menor de 5, menor de 2, más preferiblemente menor de 1 LUT/mg.

45 La lípidos acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípidos aciltransferasa que es sustancialmente incapaz de actuar en un monoglicérido. Esto puede determinarse usando monooleato (M7765 1-Oleoil-rac-glicerol 99%) en lugar del aceite de girasol en el ensayo LUS. 1 MGHU se define como la cantidad de enzima que puede liberar 1 [mu]mol de ácidos grasos por minuto del monoglicérido bajo las condiciones del ensayo.

50 La lípidos acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípidos aciltransferasa que es preferiblemente sustancialmente incapaz de actuar en un triglicérido y puede tener una MGHU/mg de menos de 5.000, por ejemplo menor de 1.000, por ejemplo menor de 500, tal como menor de 300, preferiblemente

menor de 200, más preferiblemente menor de 100, más preferiblemente menor de 50, más preferiblemente menor de 20, más preferiblemente menor de 10, tal como menor de 5, menor de 2, más preferiblemente menor de 1 MGHU/mg.

5 Adecuadamente, la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que además de su actividad lípido aciltransferasa también puede presentar una o más de las actividades fosfolipasa siguientes: actividad fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4) y/o actividad fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32). La lípido acil transferasa también puede tener actividad fosfolipasa B (E.C. 3.1.1.5).

La lípido aciltransferasa es capaz de transferir un grupo acilo desde un fosfolípido a un estanol y/o estero, preferiblemente colesterol.

10 La lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención codifica una lípido aciltransferasa que es capaz de transferir un grupo acilo desde un fosfolípido a un estero y/o un estanol para formar al menos un éster de estero y/o un éster de estanol.

Así, en una realización, el "aceptor de acilo" según la presente invención puede ser un estero/estanol de plantas.

Preferiblemente, la enzima lípido aciltransferasa puede caracterizarse usando los criterios siguientes:

15 la enzima posee actividad acil transferasa que puede definirse como una actividad de transferencia de éster mediante la cual la parte acilo de un enlace éster original de un donante de acilo lipídico se transfiere a un aceptor de acilo para formar un nuevo éster; y la enzima comprende la secuencia de aminoácidos del resto GDSX, en el que X es uno o más de los residuos de aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

Preferiblemente, X del resto GDSX es L o Y. Más preferiblemente, X del resto GDSX es L. Así, preferiblemente la enzima según la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos del resto GDSL.

20 El resto GDSX está comprendido por cuatro restos de aminoácidos conservados. Preferiblemente, la serina en el resto es una serina catalítica de la enzima lípido acil transferasa. Adecuadamente, la serina del resto GDSX puede estar en una posición correspondiente a Ser-16 en la enzima lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* enseñada en Brumilk y Buckley (Journal of Bacteriology abr. 1996, Vol. 178, No. 7, p. 2060-2064).

25 Para determinar si una proteína tiene el resto GDSX según la presente invención, la secuencia se compara preferiblemente con los perfiles del modelo de markov ocultos (perfiles HMM) de la base de datos pfam según los procedimientos enseñados en WO2004/064537 o WO2004/064987.

Preferiblemente, la enzima lípido acil transferasa puede alinearse usando la secuencia consenso Pfam00657 (para una explicación completa véase WO2004/064537 o WO2004/064987).

30 Preferiblemente, una equivalencia positiva con el perfil del modelo de markov oculto (perfil HMM) de la familia del dominio pfam00657 indica la presencia del dominio GDSL o GDSX según la presente invención.

35 Preferiblemente, cuando se alinea con la secuencia consenso Pfam00657, la lípido aciltransferasa para uso en los métodos o usos de la invención puede tener al menos uno, preferiblemente al menos más de uno, preferiblemente más de dos, de los siguientes, un bloque GDSx, un bloque GANDY, un bloque HPT. Adecuadamente, la lípido aciltransferasa puede tener un bloque GDSx y un bloque GANDY. Alternativamente, la enzima puede tener un bloque GDSx y un bloque HPT. Preferiblemente, la enzima comprende al menos un bloque GDSx. Véase WO2004/064537 o WO2004/064987 para más detalles.

Preferiblemente, los residuos del resto GANDY se seleccionan de GANDY, GGND, GGNDL y lo más preferiblemente GANDY.

40 Preferiblemente, cuando se alinea con la secuencia consenso Pfam00657, la enzima para uso en los métodos o usos de la invención, tiene al menos uno, preferiblemente más de uno, preferiblemente más de dos, preferiblemente más de tres, preferiblemente más de cuatro, preferiblemente más de cinco, preferiblemente más de seis, preferiblemente más de siete, preferiblemente más de ocho, preferiblemente más de nueve, preferiblemente más de diez, preferiblemente más de once, preferiblemente más de doce, preferiblemente más de trece, preferiblemente más de catorce, de los siguientes residuos de aminoácidos cuando se compara con la secuencia polipeptídica de referencia de *A. hydrophila*, concretamente la SEQ ID No. 1: 28hid, 29hid, 30hid, 31hid, 32gly, 33Asp, 34Ser, 35hid, 130hid, 131Gly, 132Hid, 133Asn, 134Asp, 135hid, 309His.

El dominio GDSX de pfam00657 es un identificador único que distingue las proteínas que poseen este dominio de otras enzimas.

La secuencia consenso pfam00657 se presenta en la Figura 3 como SEQ ID No. 2. Ésta se deriva de la identificación de la familia pfam 00657, base de datos versión 6, que también puede referirse como pfam00657.6 en la presente memoria.

La secuencia consenso puede actualizarse usando publicaciones adicionales de la base de datos pfam (por ejemplo, véase WO2004/064537 o WO2004/064987).

5 En una realización, la enzima lípido acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede caracterizarse usando los criterios siguientes:

(i) la enzima posee actividad acil transferasa que puede definirse como una actividad de transferencia de éster mediante la cual la parte acilo de un enlace éster original de un donante de acilo lipídico se transfiere a un aceptor de acilo para formar un nuevo éster;

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

(ii) la enzima comprende His-309 o comprende un residuo de histidina en una posición correspondiente a His-309 en la enzima lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* mostrada en las Figuras 2 y 4 (SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 3).

Preferiblemente, el residuo de aminoácido del resto GDSX es L.

15 En la SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1, los primeros 18 aminoácidos forman una secuencia señal. His-309 de la secuencia de longitud completa, que es la proteína que incluye la secuencia señal, equivale a His-291 de la parte madura de la proteína, es decir, la secuencia sin la secuencia señal.

20 En una realización, la enzima lípido acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que comprende la triada catalítica siguiente: Ser-34, Asp-306 e His-309 o comprende un residuo de serina, un residuo de ácido aspártico y un residuo de histidina, respectivamente, en las posiciones correspondientes a Ser-34, Asp-306 e His-309 en la enzima lípido acil transferasa de *Aeromonas hydrophila* mostrada en la Figura 4 (SEQ ID No. 3) o la Figura 2 (SEQ ID No. 1). Como se ha indicado anteriormente, en la secuencia mostrada en SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1, los primeros 18 residuos de aminoácidos forman una secuencia señal. Ser-34, Asp-306 e His-309 de la secuencia de longitud completa, esto es la proteína incluyendo la secuencia señal, equivalen a Ser-16, Asp-288 e His-291 de la parte madura de la proteína, es decir, la secuencia sin la secuencia señal. En la secuencia consenso pfam00657, como se proporciona en la Figura 3 (SEQ ID No. 2), los residuos del sitio activo corresponden a Ser-7, Asp-345 e His-348.

25 En una realización, la enzima lípido acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede caracterizarse usando los criterios siguientes:

30 la enzima posee actividad acil transferasa que puede definirse como una actividad de transferencia de éster mediante la cual la parte acilo de un enlace éster original de un primer donante de acilo lipídico se transfiere a un aceptor de acilo para formar un nuevo éster; y la enzima comprende al menos Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-134 e His-309 o comprende residuos de glicina, ácido aspártico, serina, ácido aspártico e histidina en las posiciones correspondientes a Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-306 e His-309, respectivamente, en la enzima lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* mostrada en SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1.

Adecuadamente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede estar codificada por una de las secuencias de nucleótidos siguientes:

(a) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 36 (véase la Figura 29);

(c) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 39 (véase la Figura 32);

40 (d) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 42 (véase la Figura 35);

(e) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 44 (véase la Figura 37);

(f) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 46 (véase la Figura 39);

(g) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 48 (véase la Figura 41);

(h) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 49 (véase la Figura 57);

45 (i) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 50 (véase la Figura 58);

- (j) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 51 (véase la Figura 59);
- (k) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 52 (véase la Figura 60);
- (l) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 53 (véase la Figura 61);
- (m) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 54 (véase la Figura 62);
- 5 (n) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 55 (véase la Figura 63);
- (o) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 56 (véase la Figura 64);
- (p) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 57 (véase la Figura 65);
- (q) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 58 (véase la Figura 66);
- (r) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 59 (véase la Figura 67);
- 10 (s) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 60 (véase la Figura 68);
- (t) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 61 (véase la Figura 69);
- (u) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 62 (véase la Figura 70);
- (v) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 63 (véase la Figura 71);
- 15 (w) o una secuencia de nucleótidos que tiene 70% o más, preferiblemente 75% o más, de identidad con una cualquiera de las secuencias mostradas como SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57, SEQ ID No. 58, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No. 61, SEQ ID No. 62 o SEQ ID No. 63.
- 20 Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos puede tener 80% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más e incluso más preferiblemente 95% o más de identidad con una cualquiera de las secuencias mostradas como SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57, SEQ ID No. 58, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No. 61, SEQ ID No. 62 o SEQ ID No. 63.
- 25 En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención es una secuencia de nucleótidos que tiene 70% o más, preferiblemente 75% o más, de identidad con una cualquiera de las secuencias mostradas como: SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 62 y SEQ ID No. 63. Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos puede tener 80% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más e incluso más preferiblemente 95% o más de identidad con una cualquiera de las secuencias mostradas como: SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 62 y SEQ ID No. 63.
- 30 ID No. 62 y SEQ ID No. 63.
- En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención es una secuencia de nucleótidos que tiene 70% o más, 75% o más, 80% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más e incluso más preferiblemente 95% o más de identidad con la secuencia mostrada como SEQ ID No. 49.
- 35 Adecuadamente, la enzima lípido acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes:
- (i) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 68
- (ii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 3
- (iii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 4
- 40 (iv) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 5
- (v) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 6
- (vi) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 7

- (vii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 8
- (viii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 9
- (ix) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 10
- (x) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 11
- 5 (xi) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 12
- (xii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 13
- (xiii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 14
- (xiv) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 1
- (xv) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 15
- 10 (xvi) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 16
- (xvii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 17
- (xviii) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 18
- (xix) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 34
- (xx) la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 35 o
- 15 una secuencia de aminoácidos que tiene 75%, 80%, 85%, 90%, 98% o más de identidad con una cualquiera de las secuencias mostradas como SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14 o SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 34 o SEQ ID No. 35.
- Adecuadamente, la enzima lípido acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende bien la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 68, o como SEQ ID No. 3 o como SEQ ID No. 4 o SEQ ID No. 1 o SEQ ID No. 15 o SEQ ID No. 16, o SEQ ID No. 34 o SEQ ID No. 35 o comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más, preferiblemente 80% o más, preferiblemente 85% o más, preferiblemente 90% o más, preferiblemente 95% o más, de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 68 o la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 3 o la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 4 o la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 1 o la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 15 o la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 16 o la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 34 o la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 35.
- 20
- 25
- Adecuadamente, la enzima lípido acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 80% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más e incluso más preferiblemente 95% o más de identidad con una cualquiera de las secuencias mostradas como SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 34 o SEQ ID No. 35.
- 30
- 35
- Adecuadamente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes:
- (a) una secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 1-100 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;
- (b) una secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 101-200 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;
- 40 (c) una secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 201-300 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1; o

(d) una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más, incluso más preferiblemente 95% o más de identidad con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas en (a)-(c) anteriormente.

5 Adecuadamente, la enzima lípido acil transferasa para uso en los métodos y usos de la presente invención puede comprender una o más de las secuencias de aminoácidos siguientes:

(a) una secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 28-39 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;

(b) una secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 77-88 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;

(c) una secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 126-136 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;

10 (d) una secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 163-175 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1;

(e) una secuencia de aminoácidos mostrada como los residuos de aminoácidos 304-311 de SEQ ID No. 3 o SEQ ID No. 1; o

15 (f) una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más, incluso más preferiblemente 95% o más de identidad con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos definidas en (a)-(e) anteriormente.

20 En un aspecto, la enzima lípido acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede ser la lípido acil transferasa de *Candida parapsilosis* como se enseña en EP 1 275711. Así, en un aspecto la lípido acil transferasa para uso en el método y usos de la presente invención puede ser una lípido acil transferasa que comprende una de las secuencias de aminoácidos enseñadas en SEQ ID No. 17 o SEQ ID No. 18.

25 Muy preferentemente, la enzima lípido acil transferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede ser una lípido acil transferasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 16 o una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más, incluso más preferiblemente 95% o más, incluso más preferiblemente 98% o más, o incluso más preferiblemente 99% o más de identidad con SEQ ID No. 16. Esta enzima podría considerarse como una enzima variante.

30 En un aspecto, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede ser una lecitina: colesterol aciltransferasa (LCAT) o variante de ésta (por ejemplo, una variante obtenida 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, rata, ratones, pollos, *Drosophila melanogaster*, plantas, incluyendo *Arabidopsis* y *Oryza sativa*, nemátodos, hongos y levaduras.

35 En una realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede ser la lípido aciltransferasa que se puede obtener, preferiblemente se obtiene, a partir de las cepas de *E. coli* TOP 10 que portan pPet12aAhydro y pPet12aASalmo depositadas por Danisco A/S de Langebrogade 1, DK-1001 Copenhague K, Dinamarca bajo el Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional de Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes en la Natural Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria (NCIMB) 23 St. Machar Street, Aberdeen, Escocia, GB el 22 de diciembre 2003 con los números de registro NCIMB 41204 y NCIMB 41205, respectivamente.

40 Una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una fosfolípido glicerol acil transferasa. Las fosfolípido glicerol acil transferasas incluyen aquellas aisladas de especies de *Aeromonas*, preferiblemente *Aeromonas hydrophila* o *A. salmonicida*, lo más preferiblemente *A. salmonicida* o variantes de ésta.

45 Las lípido acil transferasas más preferidas para uso en la presente invención están codificadas por SEQ ID Nos. 1, 3, 4, 15, 16, 34 y 35. El experto en la técnica reconocerá que es preferible que los péptidos señal de la acil transferasa se hayan escindido durante la expresión de la transferasa. El péptido señal de SEQ ID Nos. 1, 3, 4, 15 y 16 son los aminoácidos 1-18. Por lo tanto, las regiones más preferidas son los aminoácidos 19-335 para SEQ ID No. 1 y SEQ ID No. 3 (*A. hydrophila*) y los aminoácidos 19-336 para SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 15 y SEQ ID No. 16 (*A. salmonicida*).

Cuando se usa para determinar la homología de identidad de las secuencias de aminoácidos, se prefiere que los alineamientos como se describen en la presente memoria usen la secuencia madura.

5 En una realización, adecuadamente la lípido acil transferasa para uso en la presente invención comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 16 o comprende (o consiste en) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% de identidad con SEQ ID No. 16.

10 En una realización, adecuadamente la lípido acil transferasa para uso en la presente invención está codificada por una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que comprende (o consiste en) la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID No. 68 o comprende (o consiste en) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, al menos 75%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 98% de identidad con SEQ ID No. 68.

15 Por lo tanto, las regiones más preferidas para determinar la homología (identidad) son los aminoácidos 19-335 para SEQ ID No. 1 y 3 (*A. hydrophila*) y los aminoácidos 19-336 para SEQ ID Nos. 4, 15 y 16 (*A. salmonicida*). Las SEQ ID Nos. 34 y 35 son secuencias de la proteína madura de una lípido acil transferasa de *A. hydrophila* y *A. salmonicida* respectivamente que pueden o no experimentar modificación adicional posterior a la traducción.

Una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que también puede aislarse de *Thermobifida*, preferiblemente *T. fusca*, lo más preferiblemente la codificada por SEQ ID No. 28.

20 Las lípido aciltransferasas adecuadas para uso según la presente invención y/o en los métodos de la presente invención pueden comprender una cualquiera de las secuencias de aminoácidos siguientes y/o estar codificadas por las secuencias de nucleótidos siguientes:

a) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que presenta actividad lípido aciltransferasa y es al menos 70% idéntico (preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% idéntico) a la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID No. 16 o al polipéptido mostrado en SEQ ID No. 68;

25 b) un polipéptido (aislado) que comprende (o consiste en) una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 70% idéntica (preferiblemente al menos 80% idéntica, más preferiblemente al menos 90% idéntica) a SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68;

30 c) un ácido nucleico que codifica una lípido aciltransferasa, ácido nucleico que comprende (o consiste en) una secuencia de nucleótidos mostrada como (SEQ ID No. 49 o una secuencia de nucleótidos que es al menos 70% idéntica (preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% idéntica) a la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 49;

d) un ácido nucleico que hibrida bajo condiciones de media o alta astringencia con una sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 49 y que codifica un polipéptido que presenta una actividad lípido aciltransferasa;

35 e) un ácido nucleico que es un fragmento de las secuencias de ácido nucleico especificadas en a), c) o d); o

f) un polipéptido que es un fragmento del polipéptido especificado en b).

40 Una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que también puede aislarse de *Streptomyces*, preferiblemente *S. avermitis*, lo más preferiblemente la codificada por (SEQ ID No. 32. Otras enzimas posibles para uso en la presente invención de *Streptomyces* incluyen las codificadas por SEQ ID Nos. 5, 8, 9, 10, 11,12, 13, 14, 31 y 33.

Una enzima para uso en la invención también puede aislarse de *Corynebacterium*, preferiblemente *C. efficiens*, lo más preferiblemente la codificada por SEQ ID No. 29.

45 Adecuadamente, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEQ ID Nos. 37, 38, 40, 41, 43, 45 ó 47 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, ó 98% de identidad con éstas, o puede estar codificada por una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas como SEQ ID Nos. 36, 39, 42, 44, 46 ó 48 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% ó 98% de identidad con éstas.

En una realización, la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en:

a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 36;

5 b) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. por la degeneración del código genético; y

c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 36.

10 En una realización, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que comprende una secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID No. 37 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 60% de identidad con ésta.

15 En una realización adicional, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEQ ID Nos. 37, 38, 40, 41, 43, 45 ó 47 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, ó 98% de identidad con éstas, o puede estar codificada por una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas como SEQ ID Nos. 39, 42, 44, 46 ó 48 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% ó 98% de identidad con éstas.

20 En una realización adicional, la enzima lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEQ ID No. 38, 40, 41, 45 ó 47 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% ó 98% de identidad con éstas para los usos descritos en la presente memoria.

En una realización adicional, la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEQ ID No. 38, 40, ó 47 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% ó 98% de identidad con éstas para los usos descritos en la presente memoria.

25 Más preferiblemente, en una realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 47 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% ó 98% de identidad con ésta.

30 En otra realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 43 ó 44 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% ó 98% de identidad con ésta.

35 En otra realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 41 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% ó 98% de identidad con ésta.

En una realización, la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede estar codificada por un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en:

a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 36;

40 b) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 36 por la degeneración del código genético; y

c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID No. 36.

45 En una realización, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que se puede obtener, preferiblemente se obtiene, de las cepas de *Streptomyces* L130 o L131 depositadas por Danisco A/S de Langebrogade 1, DK-1001 Copenhague K, Dinamarca bajo el Tratado de Budapest en el Reconocimiento Internacional de Depósito de Microorganismos a los Fines del Procedimiento en Materia de Patentes en la National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria (NCIMB) 23 St. Machar Street, Aberdeen, Escocia, GB el 25 de junio 2004 con los números de registro NCIMB 41226 y NCIMB 41227, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos adecuadas que codifican una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede codificar un polinucleótido que codifica una lípido aciltransferasa (SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68); o puede codificar una secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa (SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68).

5 Una lípido aciltransferasa adecuada para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una secuencia de aminoácidos que puede identificarse por el alineamiento con la secuencia L131 (SEQ ID No. 37) usando Align X, el algoritmo de alineamiento por parejas Clustal W de Vector NTI usando ajustes por defecto.

10 Un alineamiento de L131 y homólogos de *S. avermitilis* y *T. fusca* ilustra que la conservación del resto GDSx (GDSY en L131 y *S. avermitilis* y *T. fusca*), la caja GANDY, que es bien GGNDx o GGNDL, y el bloque HPT (que se considera que es la histidina catalítica conservada). Estos tres bloques conservados están resaltados en la Figura 42.

Cuando se alinea bien con la secuencia consenso Pfam00657 (como se describe en WO04/064987) y/o la secuencia de L131 descrita en la presente memoria (SEQ ID No. 37) es posible identificar tres regiones conservadas, el bloque GDSx, el bloque GANDY y el bloque HTP (véase WO04/064987 para más detalles).

15 Cuando se alinea bien con la secuencia consenso Pfam00657 (como se describe en WO04/064987) y/o la secuencia de L131 descrita en la presente memoria (SEQ ID No. 37)

i) La lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que tiene un resto GDSx, más preferiblemente un resto GDSx seleccionado del resto GDSL o GDSY.

20 ii) La lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que tiene un bloque GANDY, más preferiblemente un bloque GANDY que comprende amino GGNDx, más preferiblemente GGNDx o GGNDL.

y/o

iii) La lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que tiene preferiblemente un bloque HTP.

25 y preferiblemente

iv) la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que tiene preferiblemente un resto GDSx o GDSY, y un bloque GANDY que comprende amino GGNDx, preferiblemente GGNDx o GGNDL y un bloque HTP (histidina conservada).

30 En una realización, la enzima según la presente invención puede no ser preferiblemente una enzima fosfolipasa, tal como una fosfolipasa A1 clasificada como E.C. 3.1.1.32 o una fosfolipasa A2 clasificada como E. C. 3.1.1.4.

Lípido acil transferasa variante

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede codificar una lípido aciltransferasa que es una lípido acil transferasa variante.

35 Pueden usarse las variantes que tienen una actividad incrementada en los fosfolípidos, tal como actividad hidrolítica incrementada y/o actividad transferasa incrementada, preferiblemente actividad transferasa incrementada en fosfolípidos.

Preferiblemente, la lípido aciltransferasa variante se prepara por una o más modificaciones de aminoácidos de las lípido acil transferasas como se han definido anteriormente en la presente memoria.

40 Adecuadamente, la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que puede ser una lípido aciltransferasa variante, en cuyo caso la enzima puede caracterizarse porque la enzima comprende el resto de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los residuos de aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S y en el que la enzima variante comprende una o más modificaciones de aminoácidos comparada con una secuencia parental en uno o más residuos de aminoácidos definidos en el conjunto 2 o conjunto 4 o conjunto 6 o conjunto 7 (como se define en WO2005/066347 y más adelante en la presente memoria).

45

5 Por ejemplo, la lípido aciltransferasa variante puede caracterizarse porque la enzima comprende el resto de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los residuos de aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S y en el que la enzima variante comprende una o más modificaciones de aminoácidos comparada con una secuencia parental en uno o más residuos de aminoácidos detallados en el conjunto 2 o conjunto 4 o conjunto 6 o conjunto 7 (como se define en WO2005/066347 y más adelante en la presente memoria) identificado porque dicha secuencia parental se alinea estructuralmente con el modelo estructural de P10480 definido en la presente memoria, que se obtiene preferiblemente por alineamiento estructural de las coordenadas de la estructura cristalina de P10480 con 1IVN.PDB y/o 1DEO.PDB como se define en WO2005/066347 y más adelante en la presente memoria.

10 En una realización adicional, una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa variante que puede caracterizarse porque la enzima comprende el resto de secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los residuos de aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S y en el que la enzima variante comprende una o más modificaciones de aminoácidos comparada con una secuencia parental en uno cualquiera o más residuos de aminoácidos enseñados en el conjunto 2 identificado cuando dicha secuencia parental se alinea con la secuencia consenso pfam (SEQ ID No. 2- Figura 3) y se modifica según un modelo estructural de P10480 para asegurar el mejor ajuste de superposición como se define en WO2005/066347 y más adelante en la presente memoria.

20 Adecuadamente, una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una enzima lípido aciltransferasa variante que puede comprender una secuencia de aminoácidos, secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 o SEQ ID No. 35 excepto para una o más modificaciones de aminoácidos en uno cualquiera o más de los residuos de aminoácidos definidos en el conjunto 2 o conjunto 4 o conjunto 6 o conjunto 7 como define WO2005/066347 y más adelante en la presente memoria, identificado por el alineamiento de secuencia con SEQ ID No. 34.

30 Alternativamente, la lípido aciltransferasa puede ser una enzima lípido aciltransferasa variante que comprende una secuencia de aminoácidos, secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30; SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 o SEQ ID No. 35 excepto para una o más modificaciones de aminoácidos en uno cualquiera o más de los residuos de aminoácidos definidos en el conjunto 2 o conjunto 4 o conjunto 6 o conjunto 7 como define WO2005/066347 y más adelante en la presente memoria, identificado porque dicha secuencia parental se alinea estructuralmente con el modelo estructural de P10480 definido en la presente memoria, que se obtiene preferiblemente por alineamiento estructural de las coordenadas de la estructura cristalina de P10480 con 1IVN.PDB y/o 1DEO.PDB como se enseña en WO2005/066347 y más adelante en la presente memoria.

40 Alternativamente, la lípido aciltransferasa puede ser una enzima lípido aciltransferasa variante que comprende una secuencia de aminoácidos, secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 68 o SEQ ID No. 35 excepto para una o más modificaciones de aminoácidos en uno cualquiera o más de los residuos de aminoácidos enseñados en el conjunto 2 identificado cuando dicha secuencia parental se alinea con la secuencia consenso pfam (SEQ ID No. 2) y se modifica según un modelo estructural de P10480 para asegurar el mejor ajuste de superposición como se enseña en WO2005/066347 y más adelante en la presente memoria. Preferiblemente, la enzima parental es una enzima que comprende, o es homóloga a, la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 34 y/o SEQ ID No. 15 y/o SEQ ID No. 35.

50 Preferiblemente, la lípido aciltransferasa puede ser una enzima variante que comprende una secuencia de aminoácidos, secuencia de aminoácidos que se muestra como SEQ ID No. 34 o SEQ ID No. 35 excepto para una o más modificaciones de aminoácidos en uno cualquiera o más de los residuos de aminoácidos definidos en el conjunto 2 o conjunto 4 o conjunto 6 o conjunto 7 como se define en WO2005/066347 y más adelante en la presente memoria.

DEFINICIÓN DE CONJUNTOS

Conjunto de aminoácidos 1:

5 Conjunto de aminoácidos 1 (obsérvese que éstos son los aminoácidos en 1VN- Figura 53 y Figura 54) Gly8, Asp9, Ser10, Leu11, Ser12, Tyr15, Gly44, Asp45, Thr46, Glu69, Leu70, Gly71, Gly72, Asn73, Asp74, Gly75, Leu76, Gln106, Ile107, Arg108, Leu109, Pro110, Tyr113, Phe121, Phe139, Phe140, Met141, Tyr145, Met151, Asp154, His157, Gly155, Ile156, Pro158.

Los restos altamente conservados, tales como GDSx y residuos catalíticos, se deseleccionaron del conjunto 1 (residuos subrayados). Para evitar dudas, el conjunto 1 define los residuos de aminoácidos en 10A del átomo de carbono central de un glicerol en el sitio activo del modelo 1VN.

10 Conjunto de aminoácidos 2:

Conjunto de aminoácidos 2 (obsérvese que la numeración de los aminoácidos se refiere a los aminoácidos en la secuencia madura P10480) Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289 y Val290.

15 Tabla de los residuos seleccionados en el Conjunto 1 comparado con el Conjunto 2:

modelo 1VN		P10480	
IVN	homólogo A.hyd	Número de Residuo en la secuencia madura	
	PFAM	Estructura	
Gly8	Gly32		
Asp9	Asp33		
Ser10	Ser34		
Leu11	Leu35		Leu17
Ser12	Ser36		Ser18
			Lys22
			Met23
Tyr15	Gly58		Gly40
Gly44	Asn98		Asn80
Asp45	Pro99		Pro81
Thr46	Lys100		Lys82
			Asn87
			Asn88
Glu69	Trp129		Trp111
Leu70	Val130		Val112
Gly71	Gly131		
Gly72	Ala132		Ala114
Asn73	Asn133		
Asp74	Asp134		
Gly75	Tyr135		Tyr117
Leu76	Leu136		Leu118
Gln106		Pro174	Pro156
Ile107		Gly177	Gly159
Arg108		Gln178	Gln160
Leu109		Asn179	Asn161
Pro110		180 to 190	Pro162
Tyr113			Ser163
			Ala 164
			Arg 165

(continuación)

modelo IVN		P10480	
IVN	homólogo A.hyd	Número de Residuo en la secuencia madura	
	PFAM	Estructura	
			Ser166 Gln167 Lys168 Val169 Val170 Glu171 Ala172 Tyr179 His180 Asn181 Met209 Leu210 Arg211 Asn215 Lys284 Met285 Gln289 Val290
Phe121	His198	Tyr197 His198 Asn199	
Phe139	Met227		
Phe140	Leu228		
Met141	Arg229		
Tyr145	Asn233		
Met151	Met303		
Asp154	Asp306		
Gly155	Gln307		
Ile156	Val308		
His157	His309		
Pro158	Pro310		

Conjunto de aminoácidos 3:

- 5 El conjunto de aminoácidos 3 es idéntico al conjunto 2 pero se refiere a la secuencia codificadora de *Aeromonas salmonicida* (SEQ ID No. 4), es decir, los números de los residuos de aminoácidos son 18 veces mayores en el conjunto 3 ya que refleja la diferencia entre la numeración del aminoácido en la proteína madura (SEQ ID No. 34) comparado con la proteína que incluye una secuencia señal (SEQ ID No. 25).

- 10 Las proteínas maduras de GDSX de *Aeromonas salmonicida* (SEQ ID No. 4) y GDSX de *Aeromonas hydrophila* (SEQ ID No. 34) se diferencian en cinco aminoácidos. Éstos son Thr3Ser, Gln182Lys, Glu309Ala, Ser310Asn y Gly318-, en el que el residuo *salmonicida* se lista en primer lugar y el residuo *hydrophila* se lista el último. La proteína *hydrophila* tiene una longitud de sólo 317 aminoácidos y carece de un residuo en la posición 318. El GDSX de *Aeromonas salmonicida* tiene una actividad considerablemente mayor en los lípidos polares tales como sustratos galactolípidos que la proteína de *Aeromonas hydrophila*. Se realizó escaneo de sitio en las cinco posiciones de aminoácidos

Conjunto de aminoácidos 4:

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

Conjunto de aminoácidos 5:

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

Conjunto de aminoácidos 6:

- 20 El conjunto de aminoácidos 6 es Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln160, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val169, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289, Val290, Glu309, Ser310, -318.

La numeración de los aminoácidos en el conjunto 6 se refiere a los residuos de aminoácidos en P10480 (SEQ ID No. 25)- los aminoácidos correspondientes en otros núcleos de secuencia pueden determinarse por alineamiento de homología y/o alineamiento estructural con P10480 y/o 1VN.

Conjunto de aminoácidos 7:

- 5 El conjunto de aminoácidos 7 es Ser3, Leu17, Lys22, Met23, Gly40, Asn80, Pro81, Lys82, Asn87, Asn88, Trp111, Val112, Ala114, Tyr117, Leu118, Pro156, Gly159, Gln180, Asn161, Pro162, Ser163, Ala164, Arg165, Ser166, Gln167, Lys168, Val189, Val170, Glu171, Ala172, Tyr179, His180, Asn181, Gln182, Met209, Leu210, Arg211, Asn215, Lys284, Met285, Gln289, Val290, Glu309, Ser310, -318, Y30X (en el que X se selecciona de A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o W), Y226X (en el que X se selecciona de A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o W), Y230X (en el que X se selecciona de A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o W), S18X (en el que X se selecciona de A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W o Y), D157X (en el que X se selecciona de A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y).

15 La numeración de los aminoácidos en el conjunto 7 se refiere a los residuos de aminoácidos en P10480 (SEQ ID No. 25)- los aminoácidos correspondientes en otros núcleos de secuencia pueden determinarse por alineamiento de homología y/o alineamiento estructural con P10480 y/o 1VN).

Adecuadamente, la enzima variante comprende una o más de las modificaciones de aminoácidos siguientes comparada con la enzima parental:

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

E309Q, R o A, preferiblemente Q o R

- 20 -318Y, H, S o Y, preferiblemente Y.

Preferiblemente, X del resto GDSX es L. Así, preferiblemente la enzima parental comprende el resto de aminoácidos GDSL.

25 Adecuadamente, dicha primera lípido aciltransferasa parental puede comprender una cualquiera de las secuencias de aminoácidos siguientes: SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 o SEQ ID No. 35.

30 Adecuadamente, dicha segunda lípido aciltransferasa relacionada puede comprender una cualquiera de las secuencias de aminoácidos siguientes: SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 25, SEQ ID No. 26, SEQ ID No. 27, SEQ ID No. 28, SEQ ID No. 29, SEQ ID No. 30, SEQ ID No. 32, SEQ ID No. 33 o SEQ ID No. 35.

35 La enzima variante debe comprender al menos una modificación de aminoácido comparada con la enzima parental. En algunas realizaciones, la enzima variante puede comprender al menos 2, preferiblemente al menos 3, preferiblemente al menos 4, preferiblemente al menos 5, preferiblemente al menos 6, preferiblemente al menos 7, preferiblemente al menos 8, preferiblemente al menos 9, preferiblemente al menos 10 modificaciones de aminoácidos comparada con la enzima parental.

40 Cuando se hace referencia a residuos de aminoácidos específicos en la presente memoria, la numeración es la que se obtiene a partir del alineamiento de la secuencia variante con la secuencia de referencia mostrada como SEQ ID No 34 o SEQ ID No. 35.

En un aspecto, preferiblemente ka enzima variante comprende una o más de las sustituciones de aminoácidos siguientes:

S3A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; y/o
 L17A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 S18A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, W, or Y; y/o
 K22A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 M23A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 Y30A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o
 G40A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 N80A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 P81A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 K82A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 N87A, C; D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 N88A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 W111A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; y/o
 V112A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o
 A114C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 Y117A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o
 L118A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S; T, V, W, o Y; y/o
 P156A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 D157A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 G159A, C, D, E, F, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 Q160A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 N161A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 P162A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 S163A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; y/o
 A164C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 R165A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W, o Y; y/o
 S166A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y; y/o
 Q167A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 K168A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 V169A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o
 V170A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o
 E171A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 A172C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 Y179A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o
 H180A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 N181A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 Q182A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y, preferiblemente K; y/o
 M209A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 L210A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 R211A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 N215A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 Y226A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, o W; y/o
 Y230A, C, D, E, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o W; y/o
 K284A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 M285A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 Q289A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 V290A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, W, o Y; y/o
 E309A, C, D, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W, o Y; y/o
 S310A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, T, V, W, o Y.

5

Además o alternativamente a esto puede haber una o más extensiones C-terminales. Preferiblemente, la extensión C-terminal adicional está comprendida por uno o más aminoácidos alifáticos, preferiblemente un aminoácido no polar, más preferiblemente I, L, V o G. Así, la presente invención proporciona además una enzima variante que comprende una o más de las extensiones C-terminales siguientes: 318I, 318L, 318V, 318G.

Las enzimas variantes preferidas pueden tener una actividad hidrolítica disminuida frente a un fosfolípido, tal como fosfatidilcolina (PC), también pueden tener una actividad transferasa incrementada de un fosfolípido.

Las enzimas variantes preferidas pueden tener una actividad transferasa incrementada de un fosfolípido, tal como fosfatidilcolina (PC), también pueden tener una actividad hidrolítica incrementada frente a un fosfolípido.

La modificación de uno o más de los residuos siguientes puede resultar en una enzima variante que tiene una actividad transferasa absoluta incrementada frente a fosfolípidos:

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

Las modificaciones específicas preferidas que pueden proporcionar una enzima variante que tiene una actividad transferasa mejorada de un fosfolípido pueden seleccionarse de una o más de las siguientes:

S3A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente N, E, K, R, A, P o M, lo más preferiblemente S3A
 D157A, C, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente D157S, R, E, N, G, T, V, Q, K o C
 S310A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente S310T-318 E
 E309A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente E309 R, E, L, R o A
 Y179A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V o W; preferiblemente Y179 D, T, E, R, N, V, K, Q o S, más preferiblemente E, R, N, V, K o Q
 N215A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente N215 S, L, R o Y
 K22A, C, D, E, F, G, H, I, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente K22 E, R, C o A
 Q289A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente Q289 R, E, G, P o N
 M23A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente M23 K, Q, L, G, T o S
 H180A, C, D, E, F, G, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente H180 Q, R o K M209 A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente M209 Q, S, R, A, N, Y, E, V o L
 L210A, C, D, E, F, G, H, I, K, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente L210 R, A, V, S, T, I, W o M
 R211A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, S, T, V, W o Y; preferiblemente R211T
 P81A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente P81G
 V112A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente V112C
 N80A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente N80 R, G, N, D, P, T, E, V, A o G
 L82A, C, D, E, F, G, H, I, M, N, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente L82N, S o E
 N88A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente N88C
 N87A, C, D, E, F, G, H, I, K, L, M, P, Q, R, S, T, V, W o Y; preferiblemente N87M o G

- 10 La modificación preferida de uno o más de los residuos siguientes resulta en una enzima variante que tiene una actividad transferasa absoluta incrementada frente a fosfolípidos:

S3 N, R, A, G

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

H180 R

L82 G

- 15 Y179 E, R, N, V, K o Q

E309 R, S, L o A

- 20 Una modificación preferida es N80D. Éste es particularmente el caso cuando se usa la secuencia de referencia SEQ ID No.35 como el núcleo. Así, la secuencia de referencia puede ser SEQ ID No. 16. Esta modificación puede estar en combinación con una o más modificaciones adicionales. Por lo tanto, en una realización preferida de la presente invención, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede codificar una lípido aciltransferasa que comprende SEQ ID No. 35 o una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más, incluso más preferiblemente 95% o más, incluso más preferiblemente 98% o más, o incluso más preferiblemente 99% o más de identidad con SEQ ID No. 35.

- 25 Como se ha indicado anteriormente, cuando se hace referencia a residuos de aminoácidos específicos en la presente memoria, la numeración es la que se obtiene a partir del alineamiento de la secuencia variante con la secuencia de referencia mostrada como SEQ ID No. 34 o SEQ ID No. 35.

5 Muy preferentemente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede codificar un lípido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 16 o la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 68 o una secuencia de aminoácidos que tiene 70% o más, preferiblemente 75% o más, preferiblemente 85% o más, más preferiblemente 90% o más, incluso más preferiblemente 95% o más, incluso más preferiblemente 98% o más, o incluso más preferiblemente 99% o más de identidad con SEQ ID No. 16 o SEQ ID No. 68. Esta enzima puede considerarse una enzima variante.

10 Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad se basa en el número de elementos de la secuencia que son iguales. El grado de identidad según la presente invención para las secuencias de aminoácidos puede determinarse adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica, tal como Vector NTI 10 (Invitrogen Corp.). Para el alineamiento por parejas, la puntuación usada es preferiblemente BLOSUM62 con penalización por apertura de hueco de 10,0 y penalización por extensión de hueco de 0,1.

15 Adecuadamente, el grado de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos se determina sobre al menos 20 aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 30 aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 40 aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 50 aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 60 aminoácidos contiguos.

Adecuadamente, el grado de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos puede determinarse sobre la secuencia completa.

20 Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa o la enzima lípido aciltransferasa para uso en la presente invención, puede obtenerse, preferiblemente 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*, *Candida*, *Thermobifida* y *Corynebacterium*.

25 Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa o la enzima lípido aciltransferasa para uso en la presente invención, puede obtenerse, preferiblemente se obtiene, a partir 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*, *Streptomyces thermosacchari*, *Streptomyces avermitilis*, *Lactobacillus helveticus*, *Desulfitobacterium dehalogenans*, *Bacillus* sp., *Campylobacter jejuni*, *Vibrionaceae*, *Xylella fastidiosa*, *Sulfolobus solfataicus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus terreus*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Mesorhizobium loti*, *Ralstonia solanacearum*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas axonopodis*, *Candida parapsilosis*, *Thermobifida fusca* y *Corynebacterium efficiens*.

35 En un aspecto, preferiblemente la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención codifica una enzima lípido aciltransferasa según la presente invención que se puede obtener, preferiblemente se obtiene o deriva, de uno o más de *Aeromonas* sp., *Aeromonas hydrophila* o *Aeromonas salmonicida*.

En un aspecto, preferiblemente la lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una enzima lípido aciltransferasa que se puede obtener, preferiblemente se obtiene o deriva, de uno o más de *Aeromonas* sp., *Aeromonas hydrophila* o *Aeromonas salmonicida*.

40 El término "transferasa" tal y como se usa en la presente invención es intercambiable con el término "lípido aciltransferasa".

Adecuadamente, la lípido aciltransferasa como se define en la presente memoria cataliza una o más de las reacciones siguientes: interesterificación, transesterificación, alcoholisis, hidrólisis.

45 El término "interesterificación" se refiere a la transferencia catalizada enzimáticamente de grupos acilo entre un donante lipídico y un aceptor lipídico, en el que el donante lipídico no es un grupo acilo libre.

El término "transesterificación" tal y como se usa en la presente memoria significa la transferencia catalizada enzimáticamente de un grupo acilo desde un donante lipídico (distinto de un ácido graso libre) a un aceptor de acilo (distinto de agua).

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

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

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "hidrólisis" se refiere a la transferencia catalizada enzimáticamente de un grupo acilo desde un lípido al grupo OH de una molécula de agua.

5 El término "sin incrementar o sin incrementar sustancialmente los ácidos grasos libres" tal y como se usa en la presente memoria significa que preferiblemente la lípido acil transferasa según la presente invención tiene 100% de actividad transferasa (es decir, transfiere el 100% de los grupos acilo desde un donante de acilo al aceptor de acilo, sin actividad hidrolítica); sin embargo, la enzima puede transferir menos del 100% de los grupos acilo presentes en el donante lipídico de acilo al aceptor de acilo. En este caso, preferiblemente la actividad aciltransferasa representa al menos 5%, más
10 preferiblemente al menos 10%, más preferiblemente al menos 20%, más preferiblemente al menos 30%, más preferiblemente al menos 40%, más preferiblemente 50%, más preferiblemente al menos 60%, más preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80%, más preferiblemente al menos 90% y más preferiblemente al menos 98% de la actividad enzimática total. El % de actividad transferasa (es decir, la actividad transferasa como un porcentaje de la actividad enzimática total) puede determinarse según el "Ensayo para Actividad Transferasa" proporcionado
15 anteriormente.

En algunos aspectos de la presente invención, el término "sin incrementar sustancialmente los ácidos grasos libres" tal y como se usa en la presente memoria significa que la cantidad de ácido graso libre en un aceite comestible tratado con una lípido aciltransferasa según la presente invención es menor que la cantidad de ácido graso libre producido en el aceite comestible cuando se ha usado una enzima distinta de una lípido aciltransferasa según la presente invención, tal como por ejemplo comparada con la cantidad de ácido graso libre producido cuando se ha usado una enzima fosfolipasa convencional por ejemplo, Lecitasa Ultra™ (Novozymes A/S, Dinamarca).
20

El término "consiste esencialmente en" tal y como se usa en la presente memoria, cuando se refiere a un producto o composición, preferiblemente significa que el producto o composición, puede consistir en otros productos o composiciones pero sólo hasta una concentración máxima de, preferiblemente 10%, tal como 5%, tal como 3%, tal como 2% ó 1% ó 0,5% ó 0,1%.
25

En una realización preferida, la lípido aciltransferasa se usa en combinación con una lipasa que tiene una o más de las actividades enzimáticas siguientes: actividad glicolipasa (E.C. 3.1.1.26) actividad fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4) o actividad fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32). Adecuadamente, las enzimas lipasa son muy conocidas en la técnica e incluyen como ejemplo las lipasas siguientes: una fosfolipasa A1 LECITASE® ULTRA (Novozymes A/S, Dinamarca), fosfolipasa A2 (por ejemplo, fosfolipasa A2 de LIPOMOD™ 22L de Biocatalysts, LIPOMAX™ y LysoMax PLA2™ de Genecor), LIPOLASE® (Novozymes A/S, Dinamarca).
30

En algunas realizaciones, puede ser beneficioso combinar el uso de lípido aciltransferasa con una fosfolipasa, tal como fosfolipasa A1, fosfolipasa A2, fosfolipasa B, fosfolipasa C y/o fosfolipasa D.

35 El uso combinado puede realizarse secuencialmente o simultáneamente, por ejemplo, el tratamiento con lípido acil transferasa puede ocurrir antes de o durante el tratamiento enzimático adicional. Alternativamente, el tratamiento enzimático adicional puede ocurrir antes de o durante al tratamiento con la lípido acil transferasa.

En el caso de tratamientos enzimáticos secuenciales, en algunas realizaciones puede ser ventajoso eliminar la primera enzima usada, por ejemplo, por inactivación con calor o mediante el uso de una enzima inmovilizada, antes del tratamiento con la segunda (y/o tercera etc.) enzima.

40 MODIFICACIONES POSTERIORES A LA TRANSCRIPCIÓN Y POSTERIORES A LA TRADUCCIÓN

Adecuadamente, la lípido aciltransferasa según la presente invención puede estar codificada por una cualquiera de las secuencias de nucleótidos enseñadas en la presente memoria.

45 Dependiendo de la célula huésped usada, pueden hacerse modificaciones posteriores a la transcripción y/o posteriores a la traducción. Se considera que la lípido aciltransferasa para uso en los presentes métodos y/o usos engloba lípido aciltransferasas que han experimentado modificación posterior a la transcripción y/o posterior a la traducción.

Sólo como ejemplo, la expresión de la secuencia de nucleótidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 49 (véase la Figura 57) en una célula huésped (tal como *Bacillus licheniformis* por ejemplo) resulta en modificaciones posteriores a la transcripción y/o posteriores a la traducción que dan lugar a la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 68 (véase la Figura 73).

La SEQ ID No. 68 es la misma que la SEQ ID No. 16 (mostrada en la presente memoria en la Figura 1) excepto en que la SEQ ID No. 68 ha experimentado modificación posterior a la transcripción y/o posterior a la traducción para eliminar 38 aminoácidos.

AISLADA

5 En un aspecto, la lípido aciltransferasa es una lípido aciltransferasa recuperada/aislada. Así, la lípido aciltransferasa producida puede estar en una forma aislada.

En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para uso en la presente invención puede estar en una forma aislada.

10 El término "aislada" significa que la secuencia o proteína carece al menos sustancialmente de al menos un componente distinto de aquel con el que la secuencia o proteína está asociada naturalmente en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza.

PURIFICADA

En un aspecto, la lípido aciltransferasa puede estar en una forma purificada.

15 En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para uso en la presente invención puede estar en una 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%.

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

Una secuencia de nucleótidos que codifica bien un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria o un polipéptido que es adecuado para modificación puede aislarse a partir de cualquier célula u organismo que produce dicho polipéptido. En la técnica se conocen bien varios métodos para el aislamiento de secuencias de nucleótidos.

25 Por ejemplo, puede construirse una biblioteca de ADN genómico y/o de ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce el polipéptido. Si la secuencia de aminoácidos del polipéptido se conoce, pueden sintetizarse sondas oligonucleotídicas marcadas y usarse para identificar los clones que codifican el polipéptido de la biblioteca genómica preparada a partir del organismo. Alternativamente, una sonda oligonucleotídica marcada que contiene secuencias homólogas a otro gen de polipéptido conocido podría usarse para identificar los clones que
30 codifican el polipéptido. En el último caso, se usan condiciones de hibridación y de lavado de menor astringencia.

Alternativamente, los clones que codifican el polipéptido podrían identificarse insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias negativas para la enzima con la biblioteca de ADN genómico resultante y sembrando en placas las bacterias transformadas en agar que contiene una enzima inhibida por el polipéptido, permitiendo de esta manera la identificación de los clones que expresan el polipéptido.

35 En una alternativa adicional más, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido puede prepararse sintéticamente mediante métodos estándar establecidos, por ejemplo el método de la fósforoamidita descrito por Beucage S.L. et al. (1981) Tetrahedron Letters 22, p. 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al. (1984) EMBO J. 3, p. 801-805. En el método de la fósforoamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifican se hibridan, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

40 La secuencia de nucleótidos puede ser de origen mixto genómico y sintético, origen mixto sintético y ADNc u origen mixto genómico y ADNc, preparada ligando fragmentos de origen sintético, genómico o ADNc (según sea apropiado) según técnicas estándar. Cada fragmento ligado corresponde a varias partes de la secuencia de nucleótidos completa. La secuencia de ADN también puede prepararse por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en US 4.683.202 o en Saiki R K et al (Science (1988) 239, p. 487-491).

45 EVOLUCIÓN MOLECULAR

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

Las mutaciones pueden introducirse usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos flanqueando los sitios de mutación deseados.

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

En lugar de mutagénesis dirigida a sitio, tal como se ha descrito anteriormente, se pueden introducir mutaciones aleatoriamente por ejemplo usando un kit comercial tal como el kit de mutagénesis GeneMorph PCR de Stratagene, o el kit de mutagénesis aleatoria Diversify PCR de Clontech. EP 0 583 285 se refiere a métodos para optimizar la mutagénesis basada en PCR, que también pueden combinarse con el uso de análogos mutagénicos de ADN tal como los descritos en EP 0 866 796. Las tecnologías de PCR tendentes a error son adecuadas para la producción de variantes de lípido acil transferasas con características preferidas. WO0206457 se refiere a la evolución molecular de lipasas.

Un tercer método para obtener secuencias nuevas es fragmentar secuencias de nucleótidos no idénticas, bien usando cualquier número de enzimas de restricción o una enzima tal como ADNasa I y reensamblando secuencias de nucleótidos completas que codifican proteínas funcionales. Alternativamente, se puede usar una o múltiples secuencias de nucleótidos no idénticas e introducir mutaciones durante el reensamblaje de la secuencia de nucleótidos completa. Las tecnologías de transposición de secuencias de ADN y la transposición de secuencias con alta homología son adecuadas para la producción de variantes de lípido acil transferasas con características preferidas. Los métodos adecuados para realizar la "transposición de secuencias" pueden encontrarse en EP0 752 008, EP1 138 763, EP1 103 606. La transposición de secuencias también puede combinarse con otras formas de mutagénesis de ADN como se describe en US 6.180.406 y WO 01/34835.

Así, es posible producir numerosas mutaciones dirigidas a sitio o aleatorias en una secuencia de nucleótidos, bien *in vivo* o *in vitro*, y cribar posteriormente una funcionalidad mejorada del polipéptido codificado por varios medios. Usando métodos de recombinación basados en simulación informática y *ex vivo* (véase WO 00/58517, US 6.344.328, US 6.361.974), por ejemplo, puede realizarse la evolución molecular en la que la variante producida retiene una homología muy baja respecto a enzimas o proteínas conocidas. Dichas variantes obtenidas de esta manera pueden tener una analogía estructural significativa con enzimas transferasa conocidas, pero tienen una homología en la secuencia de aminoácidos muy baja.

Como un ejemplo no limitativo, además, pueden recombinarse mutaciones o variantes naturales de una secuencia de polinucleótidos con el tipo salvaje u otras mutaciones o variantes naturales para producir nuevas variantes. Dichas nuevas variantes también pueden cribarse para funcionalidad mejorada del polipéptido codificado.

La aplicación de los métodos de evolución molecular mencionados anteriormente y similares permite la identificación y selección de variantes de las enzimas para uso en 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 beneficiosas. Existen numerosos ejemplos de la aplicación de la evolución molecular en la técnica para la optimización o alteración de la actividad enzimática, dichos ejemplos incluyen, pero no están limitados a uno o más de los siguientes: expresión y/o actividad optimizada en una célula huésped o *in vitro*, actividad enzimática incrementada, especificidad de sustrato y/o de producto alterada, estabilidad enzimática o estructural incrementada o disminuida, actividad/especificidad enzimática alterada en condiciones medioambientales preferidas, por ejemplo, temperatura, pH, sustrato.

Como será evidente para un experto en la técnica, mediante el uso de las herramientas de evolución molecular una enzima puede alterarse para mejorar la funcionalidad de la enzima.

Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa usada en la invención puede codificar una lípido aciltransferasa variante, es decir, la lípido aciltransferasa puede contener al menos una sustitución, delección o adición de aminoácidos, cuando se compara con una enzima parental. Las enzimas variantes retienen al menos 1%, 2%, 3%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% de homología con la enzima parental. Las enzimas parentales adecuadas pueden incluir cualquier enzima con actividad esterasa o lipasa. Preferiblemente, la enzima parental se alinea con la secuencia consenso pfam00657.

En una realización preferible, una enzima lípido aciltransferasa variante retiene o incorpora al menos uno o más de los residuos de aminoácidos de la secuencia consenso pfam00657 encontrados en los bloques GDSx, GANDY y HPT.

Las enzimas, tales como lipasas, sin o con poca actividad lípido aciltransferasa en un entorno acuoso pueden mutarse usando herramientas de evolución molecular para introducir o aumentar la actividad transferasa, produciendo de esta manera una enzima lípido aciltransferasa con una actividad transferasa significativa adecuada para uso en los métodos de la presente invención.

5 Adecuadamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede codificar una lípido aciltransferasa que puede ser una variante con actividad enzimática aumentada en lípidos polares, preferiblemente fosfolípidos y/o glicolípidos cuando se compara con la enzima parental. Preferiblemente, dichas variantes también tienen poca o ninguna actividad en los lípidos liso polares. La actividad aumentada en los lípidos polares, fosfolípidos y/o glicolípidos puede ser el resultado de hidrólisis y/o actividad transferasa o una combinación de ambas.

Las lípido aciltransferasas variantes pueden tener una actividad disminuida en triglicéridos y/o monoglicéridos y/o diglicéridos comparada con la enzima parental.

Adecuadamente, la enzima variante puede no tener actividad en triglicéridos y/o monoglicéridos y/o diglicéridos.

10 Alternativamente, la enzima variante puede tener una termoestabilidad incrementada.

La enzima variante puede tener una actividad incrementada en uno o más de los siguientes, lípidos polares, fosfolípidos, lecitina, fosfatidilcolina, glicolípidos, digalactosil monoglicérido, monogalactosil monoglicérido.

15 Las variantes de lípido aciltransferasas se conocen y una o más de dichas variantes pueden ser adecuadas para uso en los métodos y usos según la presente invención. Sólo como ejemplo, las variantes de lípido aciltransferasas que se describen en las referencias siguientes pueden usarse según la presente invención: Hilton y Buckley J. Biol. Chem. 1991 ene 15: 266 (2): 997-1000; Robertson et al J. Biol. Chem. 1994 ene 21; 269(3): 2146-50; Brumlik et al J. Bacteriol 1996 abr; 178 (7): 2060-4; Peelman et al Protein Sci. 1998 mar, 7(3): 587-99.

SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS

20 La presente invención también engloba el uso de secuencias de aminoácidos codificadas por una secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para uso en uno cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención.

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

25 La secuencia de aminoácidos puede prepararse/aislarse a partir de una fuente adecuada, o puede prepararse sintéticamente o puede prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

Adecuadamente, las secuencias de aminoácidos pueden obtenerse a partir de los polipéptidos aislados enseñados en la presente memoria por técnicas estándar.

Un método adecuado para determinar las secuencias de aminoácidos a partir de polipéptidos aislados es como sigue:

30 El polipéptido purificado puede liofilizarse y 100 µg del material liofilizado pueden disolverse en 50 µl de una mezcla de 8 M urea y 0,4 M hidrógeno carbonato de amonio, pH 8,4. La proteína disuelta puede desnaturalizarse y reducirse durante 15 minutos a 50°C seguido de cubierta con nitrógeno y adición de 5 µl de 45 mM ditioneitol. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, pueden añadirse 5 µl de 100 mM yodoacetamida para derivatizar los residuos de cisteína durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad bajo nitrógeno.

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

40 Los péptidos resultantes pueden separarse por HPLC de fase reversa en una columna VYDAC C18 (0,46x15cm; 10 µm; The Separation Group, California, EEUU) usando disolvente A: 0,1% TFA en agua y disolvente B: 0,1% TFA en acetonitrilo. Los péptidos seleccionados pueden volverse a cromatografiar en una columna Develosil C18 usando el mismo sistema de disolventes, antes de secuenciación N-terminal. La secuenciación puede hacerse usando un secuenciador Applied Biosystems 476A usando ciclos rápidos líquidos pulsados según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, California, EEUU).

IDENTIDAD DE SECUENCIA U HOMOLOGÍA DE SECUENCIA

Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una determinada homología con las secuencias de aminoácidos objeto y las secuencias de nucleótidos objeto. Aquí, el término "homología" puede ser igual a "identidad".

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

En el presente contexto, una secuencia homóloga se considera que incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos 75, 85 ó 90% idéntica, preferiblemente al menos 95 ó 98% idéntica a la secuencia objeto. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos etc. que la secuencia de aminoácidos objeto. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

En el presente contexto, una secuencia homóloga se considera que incluye una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos 75, 85 ó 90% idéntica, preferiblemente al menos 95 ó 98% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido para uso en la presente invención. Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos etc. que la secuencia objeto. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden llevarse a cabo a simple vista, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina un alineamiento "sin huecos". Típicamente, dichos alineamientos sin huecos sólo se llevan a cabo sobre un número relativamente pequeño de residuos.

Aunque éste es un método muy sencillo y consistente, no tiene en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias idénticas por otra parte, una inserción o delección causará que los residuos de aminoácidos siguientes no estén alineados, resultando así potencialmente en una gran reducción del % de homología cuando se lleva a cabo un alineamiento global. Consecuentemente, la mayor parte de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología global. Esto se consigue insertando "huecos" en el alineamiento de las secuencias para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por hueco" a cada hueco que aparece en el alineamiento de manera que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencia con tan pocos huecos como sea posible- que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas- conseguirá una puntuación mayor que uno con muchos huecos. Típicamente, se usan "costes de hueco afines" que cargan un coste relativamente alto para la existencia de un hueco y una penalización menor para cada residuo posterior en el hueco. Éste es el sistema de puntuación de huecos que se usa más comúnmente. Las penalizaciones por hueco altas producirán por supuesto alineamientos optimizados con menos huecos. La mayor parte de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefieren usar los valores por defecto cuando se usa dicho software para comparaciones de secuencia.

El cálculo del % de homología máximo requiere por lo tanto en primer lugar la producción de un alineamiento óptimo, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento es el Vector NTI (Invitrogen Corp.). Los ejemplos de otros software que pueden realizar comparaciones de secuencia incluyen, pero no están limitados a, el paquete BLAST (véase Ausubel et al 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed- Capítulo 18) y FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410). Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsquedas offline y online (véase Ausubel et al 1999, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa Vector NTI. Una nueva herramienta, denominada BLAST 2 Sequences, también está disponible para comparar 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 en términos de identidad, el proceso de alineamiento en sí mismo no se basa típicamente en una comparación de parejas todo o nada. En lugar de esto, se usa generalmente una matriz de puntuación de similitud proporcionada que asigna puntuaciones a cada comparación por parejas basada en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz usada comúnmente es la matriz BLOSUM62- la matriz por defecto para el paquete de programas BLAST. Los programas Vector NTI usan generalmente bien los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos personalizada si se suministra (véase el manual del usuario para detalles adicionales). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores por defecto para el paquete Vector NTI.

Alternativamente, los porcentajes de homología pueden calcularse usando la característica de alineamiento múltiple en Vector NTI (Invitrogen Corp.), basada en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG y Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

5 Una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente % de identidad de secuencia. El software hace esto típicamente como parte de la comparación de las secuencias y genera un resultado numérico.

Si se usan las Penalizaciones de Hueco cuando se determina la identidad de secuencia, entonces preferiblemente se usan los parámetros siguientes para el alineamiento por parejas

PARA BLAST	
APERTURA DE HUECO	0
EXTENSIÓN DE HUECO	0

PARA CLUSTAL	ADN	PROTEÍNA	
TAMAÑO DE PALABRA	2	1	K triple
PENALIZACIÓN POR HUECO	15	10	
EXTENSIÓN DE HUECO	6,66	0,1	

10

En una realización, preferiblemente la identidad de secuencia para las secuencias de nucleótidos se determina usando CLUSTAL con el conjunto de la penalización por hueco y la extensión de hueco como se ha definido anteriormente.

15 Adecuadamente, el grado de identidad respecto a una secuencia de nucleótidos se determina sobre al menos 20 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 30 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 40 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 50 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 60 nucleótidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 100 nucleótidos contiguos.

Adecuadamente, el grado de identidad respecto a una secuencia de nucleótidos puede determinarse sobre la secuencia completa.

20 En una realización, el grado de identidad en la secuencia de aminoácidos según la presente invención puede determinarse adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica, tal como Vector NTI 10 (Invitrogen Corp.). Para el alineamiento por parejas, la matriz usada es preferiblemente BLOSUM62 con una penalización por apertura de hueco de 10,0 y penalización por extensión de hueco de 0,1.

25 Adecuadamente, el grado de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos se determina sobre al menos 20 aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 30 aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 40 aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 50 aminoácidos contiguos, preferiblemente sobre al menos 60 aminoácidos contiguos.

Adecuadamente, el grado de identidad respecto a una secuencia de aminoácidos puede determinarse sobre la secuencia completa.

30 Las secuencias también pueden tener deleciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y resultan en una sustancia funcionalmente equivalente. Pueden hacerse sustituciones de aminoácidos deliberadas tomando como base la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o naturaleza anfipática de los residuos siempre que se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos en la cabeza polar no cargados que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

35

Pueden hacerse sustituciones conservativas, por ejemplo, según la Tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferiblemente en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí.

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares- no cargados	C S T M
		N Q
	Polares- cargados	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

- 5 Las presentes secuencias también engloban secuencias que tienen sustitución homóloga (sustitución y reemplazo se usan ambas en la presente memoria para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente, con un residuo alternativo) que pueden ocurrir, es decir, sustitución de 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 residuo por otra o alternativamente implicando la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (de ahora en adelante referido en la presente memoria como Z), ácido diaminobutírico ornitina (de ahora en adelante referido en la presente memoria como B), norleucina ornitina (de ahora en adelante referido en la presente memoria como O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.
- 10 Los reemplazos también pueden hacerse con aminoácidos no naturales.
- 15 Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre cualesquiera dos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyendo grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos tales como residuos de glicina o β -alanina. Un forma adicional de variación, que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide, será bien entendida por los expertos en la técnica. Para evitar dudas, la "forma peptoide" se usa para referirse a residuos de aminoácidos variantes en los que el grupo sustituyente del carbono α está en el átomo de nitrógeno del residuo en lugar del carbono α . Los procesos para preparar péptidos en la forma peptoide se conocen en la técnica, por ejemplo Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.
- 20 Las secuencias de nucleótidos para uso en la presente invención o que codifican un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria pueden incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen varios tipos diferentes de modificaciones en oligonucleótidos. Éstas incluyen núcleos de metilfosfonato y fósforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, debe entenderse que las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de aumentar la actividad o vida media *in vivo* de las secuencias de nucleótidos.
- 25 La presente invención también engloba el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias discutidas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de éstas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de éstas entonces esa secuencia puede usarse como una sonda para identificar secuencias codificadoras similares en otros organismos etc.
- 30 Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias para uso en la presente invención pero que se encuentran en el alcance de la invención pueden obtenerse de varias maneras. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria pueden obtenerse por ejemplo sondando bibliotecas de ADN hechas a partir de un rango de individuos, por ejemplo individuos de diferentes poblaciones. Además, pueden obtenerse otros homólogos virales/bacterianos o celulares, particularmente homólogos celulares encontrados en células de mamíferos (por ejemplo, células de rata, ratón, bovinas y de primates) y dichos homólogos y fragmentos de éstos en general serán capaces de hibridar selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente memoria. Dichas secuencias pueden obtenerse sondando bibliotecas de ADNc hechas a partir de o bibliotecas de ADN genómico de otras especies animales y sondando dichas bibliotecas con sondas que comprenden todo o parte de una cualquiera de las secuencias en los listados de secuencias adjuntos bajo condiciones de media de alta astringencia. Consideraciones similares se aplican a la obtención de homólogos de especies y variantes alélicas de las secuencias de polipéptido o nucleótidos para uso en la invención.
- 35
- 40

- Las variantes y homólogos de cepa/especie también pueden obtenerse usando PCR degenerada que usará cebadores diseñados para tomar como diana secuencias en las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas en las secuencias para uso en la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencia pueden realizarse usando software informático conocido en la técnica. Por ejemplo el programa GCG Wisconsin PileUp se usa ampliamente.
- Los cebadores usados en la PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se usarán en condiciones de astringencia menores que las usadas para la clonación de secuencias con cebadores únicos de secuencia frente a secuencias conocidas.
- Alternativamente, dichos polinucleótidos pueden obtenerse por mutagénesis dirigida a sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando por ejemplo se requieren cambios silenciosos en secuencias de codones para optimizar las preferencias de codones para una célula huésped particular en la que las secuencias de polinucleótido se están expresando. Otros cambios en las secuencias pueden desearse con el fin de introducir sitios de reconocimiento de restricción en el polipéptido, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.
- Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) descritos en la presente memoria pueden usarse para producir un cebador, por ejemplo, un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo, marcada con un marcaje que se revela por medios convencionales usando marcajes radiactivos o no radiactivos o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán una longitud de al menos 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo, al menos 25, 30 ó 40 nucleótidos y también están englobados por el término polinucleótidos para usar la invención como se usa en la presente memoria.
- Los polinucleótidos tales como polinucleótidos y sondas de ADN descritos en la presente memoria pueden producirse recombinantemente, sintéticamente o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse por técnicas estándar.
- En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, implicando una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada, con un nucleótido cada vez. Las técnicas para conseguir esto usando técnicas automatizadas están disponibles fácilmente en la técnica.
- Los polinucleótidos más largos se producirán generalmente usando medios recombinantes, por ejemplo, usando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará preparar una pareja de cebadores (por ejemplo, de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) que flanquean una región de la secuencia diana del lípido que se desea clonar, poner los cebadores en contacto con ARNm o ADNc obtenido de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena de la polimerasa bajo condiciones que den lugar a la amplificación de la región deseada, aislar el fragmento amplificado (por ejemplo, purificando la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperar el ADN amplificado. Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento adecuados de enzimas de restricción de manera que el ADN amplificado puede clonarse en un vector de clonación adecuado.
- HIBRIDACIÓN**
- La presente invención también engloba el uso de secuencias que son complementarias a las secuencias para uso en la presente invención o secuencias que son capaces de hibridar con las secuencias para uso en la presente invención o con secuencias que son complementarias a éstas.
- El término "hibridación" tal y como se usa en la presente memoria, debe incluir "el proceso por el que una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria mediante emparejamiento de bases" así como el proceso de amplificación como se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- La presente invención también engloba el uso de secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridar con las secuencias que son complementarias a las secuencias objeto discutidas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de éstas.
- La presente invención también engloba secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos discutidas en la presente memoria.
- Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (T_m) del complejo de unión de nucleótidos, como se enseña en Berger y Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) y confieren una "astringencia" definida como se explica más adelante.

La astringencia máxima ocurre típicamente a aproximadamente $T_m - 5^\circ\text{C}$ (5°C por debajo de la T_m de la sonda); astringencia alta a aproximadamente 5°C a 10°C por debajo de la T_m ; astringencia intermedia a aproximadamente 10°C a 20°C por debajo de la T_m ; y astringencia baja a aproximadamente 20°C a 25°C por debajo de la T_m . Como entenderán los expertos en la técnica, una hibridación con astringencia máxima puede usarse para identificar o detectar secuencias de nucleótidos idénticas mientras que una hibridación con astringencia intermedia (o baja) puede usarse para identificar o detectar secuencias de polinucleótido similares o relacionadas.

Preferiblemente, la presente invención engloba el uso de secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar bajo condiciones de astringencia alta o condiciones de astringencia intermedia con secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos que tienen las propiedades específicas como se define en la presente memoria.

Más preferiblemente, la presente invención engloba el uso de secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar bajo condiciones de astringencia alta (por ejemplo, 65°C y $0,1\times\text{SSC}$ { $1\times\text{SSC} = 0,15\text{ M NaCl}$, $0,015\text{ M Na-citrato pH } 7,0$ }) con secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos que tienen las propiedades específicas como se define en la presente memoria.

La presente invención también se refiere al uso de secuencias de nucleótidos que pueden hibridar con secuencias de nucleótidos discutidas en la presente memoria (incluyendo secuencias complementarias a las discutidas en la presente memoria).

La presente invención también se refiere al uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a secuencias que pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos discutidas en la presente memoria (incluyendo secuencias complementarias a las discutidas en la presente memoria).

También se incluye en el alcance de la presente invención el uso de secuencias de polinucleótidos que son capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos discutidas en la presente memoria bajo condiciones de astringencia intermedia a máxima.

En un aspecto preferido, la presente invención abarca el uso de secuencias de nucleótidos que pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos discutidas en la presente memoria, o el complemento de éstas, bajo condiciones astringentes (por ejemplo, 50°C y $0,2\times\text{SSC}$).

En un aspecto más preferido, la presente invención abarca el uso de secuencias de nucleótidos que pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos discutidas en la presente memoria, o el complemento de éstas, bajo condiciones de astringencia alta (por ejemplo, 65°C y $0,1\times\text{SSC}$).

30 EXPRESIÓN DE LOS POLIPÉPTIDOS

Una secuencia de nucleótidos para uso en la presente invención o para codificar un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede usarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos, en forma polipeptídica, en y/o a partir de una célula huésped compatible. La expresión puede controlarse usando secuencias de control que incluyen promotores/amplificadores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden usarse promotores procariotas y promotores funcionales en células eucariotas. Pueden usarse promotores específicos de tejido o específicos de estímulo. También pueden usarse promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencia de dos o más promotores diferentes descritos anteriormente.

El polipéptido producido por una célula huésped recombinante por la expresión de la secuencia de nucleótidos puede secretarse o puede estar contenido intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o vector usado. Las secuencias codificadoras pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias que codifican la sustancia a través de una membrana celular procariota o eucariota particular.

CONSTRUCCIONES

El término "construcción"- que es sinónimo de términos tales como "conjugado", "casete" e "híbrido"- incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria para uso según la presente invención directamente o indirectamente unida a un promotor. Un ejemplo de una unión indirecta es el suministro de un grupo espaciador adecuado tal como una secuencia de intrón, tal como el intrón Sh1 o el intrón ADH, entre el promotor y la secuencia de nucleótidos para uso en la presente invención. Lo mismo es cierto para el término "fusionado" en relación con la presente invención que incluye la unión directa o indirecta. En algunos casos, los términos no abarcan la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína asociada habitualmente con el promotor del gen de tipo salvaje y cuando ambos están en su entorno natural.

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

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

5 ORGANISMO

El término "organismo" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que podría comprender una secuencia de nucleótidos para uso en la presente invención o una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria y/o productos obtenidos de él.

10 El término "organismo transgénico" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria y/o los productos obtenidos de él, y/o en el que un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria en el organismo. Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos se incorpora en el genoma del organismo.

15 El término "organismo transgénico" no abarca secuencias de nucleótidos codificadoras nativas en su entorno natural cuando están bajo el control de su promotor nativo que también está en su entorno natural.

20 Por lo tanto, el organismo transgénico para uso en la presente invención incluye un organismo que comprende una cualquiera de, o combinaciones de, una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria, construcciones como se define en la presente memoria, vectores como se define en la presente memoria, plásmidos como se define en la presente memoria, células como se define en la presente memoria o los productos de éstos. Por ejemplo, el organismo transgénico también puede comprender una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria bajo el control de un promotor no asociado con una secuencia que codifica una lípido aciltransferasa en la naturaleza.

25 TRANSFORMACIÓN DE LAS CÉLULAS/ORGANISMO HUÉSPED

El organismo huésped puede ser un organismo procarionta o eucariota.

Los ejemplos de huéspedes procariontas adecuados incluyen bacterias tales como *E. coli* y *Bacillus licheniformis*, preferiblemente *B. licheniformis*.

30 Las enseñanzas sobre la transformación de huéspedes procariontas están bien documentadas en la técnica, por ejemplo véase Sambrook et al (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Si se usa un huésped procarionta puede ser necesario modificar adecuadamente la secuencia de nucleótidos antes de la transformación- tal como por eliminación de intrones.

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

35 Las células de hongos filamentosos pueden transformarse usando varios métodos conocidos en la técnica- tal como un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguido de regeneración de la pared celular de una manera conocida. El uso de *Aspergillus* como un microorganismo huésped se describe en EP 0 238 023.

40 Otro organismo huésped puede ser una planta. Una revisión de las técnicas generales usadas 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 1994 17-27). Pueden encontrarse enseñanzas adicionales sobre la transformación de plantas en EP-A-0449375.

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

HONGOS TRANSFORMADOS

45 Un organismo huésped puede ser un hongo- tal como un hongo filamentosos. Los ejemplos de dichos huéspedes adecuados incluyen cualquier miembro que pertenece a los géneros *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* y semejantes.

Las enseñanzas sobre la transformación de hongos filamentosos se revisan en US-A-5741665 que indica que las técnicas estándar para la transformación de hongos filamentosos y el cultivo de hongos son muy conocidas en la técnica. Una revisión amplia de las técnicas según se aplican a *N. crassa* se encuentra, por ejemplo, en Davis y de Serres, *Methods Enzymol* (1971) 17A: 79-143.

- 5 Las enseñanzas adicionales sobre la transformación de hongos filamentosos se revisan en US-A-5674707.

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

Un *Aspergillus* transgénico para uso en la presente invención también puede prepararse, por ejemplo, según las enseñanzas de Turner G. 1994 (*Vectors for genetic manipulation*. En: Martinelli S.D., Kinghom J.R. (Editores) *Aspergillus: 50 years on*. Progress in industrial microbiology vol. 29. Elsevier Amsterdam 1994. p. 641-666).

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

LEVADURAS TRANSFORMADAS

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

- 15 Una revisión de los principios de expresión génica heteróloga en levaduras 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, las levaduras- tal como las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (véase FEMS *Micorbiol Rev* (2000) 24(1): 45-66) pueden usarse como un vehículo para la expresión génica heteróloga.

- 20 Una revisión de los principios de expresión génica heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y la secreción de productos génicos se proporciona 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, eds, 2ª edición, Academic Press Ltd.).

Para la transformación de levaduras, se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, un *Saccharomyces* transgénico para uso en la presente invención puede prepararse según 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).

- 25 Las células de levadura transformadas pueden seleccionarse usando varios marcadores selectivos- tales como marcadores auxotróficos marcadores de resistencia a antibióticos dominantes.

Un organismo huésped de levadura adecuado puede seleccionarse de especies de levaduras biotecnológicamente relevantes tales como, pero no limitadas a, especies de levadura seleccionadas de *Pichia* sp., *Hansenula* sp., *Kluyveromyces*, *Yarrowinia* sp., *Saccharomyces* sp., incluyendo *S. cerevisiae* o *Schizosaccharomyces* sp., incluyendo *Schizosaccharomyces pombe*.

- 30 Una cepa de la especie de levadura metilotrófica *Pichia pastoris* puede usarse como el organismo huésped.

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

PLANTAS/CÉLULAS DE PLANTAS TRANSFORMADAS

- 35 Un organismo huésped adecuado para la presente invención puede ser una planta. Una revisión de las técnicas generales puede encontrarse en los artículos por Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42: 205-225) y Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech* marzo/abril 1994 17-27) o en WO01/16308. La planta transgénica puede producir niveles aumentados de ésteres de fitoesterol y ésteres de fitoestanol, por ejemplo.

- 40 Por lo tanto, también se refiere a un método para la producción de una planta transgénica con niveles aumentados de ésteres de fitoesterol y ésteres de fitoestanol, que comprende las etapas de transformar una célula de planta con una lipido aciltransferasa como se define en la presente memoria (en particular con un vector o construcción de expresión que comprende una lipido aciltransferasa como se define en la presente memoria) y crecer una planta a partir de la célula de planta transformada.

SECRECIÓN

- 45 Frecuentemente, es deseable que el polipéptido se secrete del huésped de expresión en el medio de cultivo del que la enzima puede recuperarse más fácilmente. Según la presente invención, la secuencia líder de secreción puede

seleccionarse tomando como base el huésped de expresión deseado. Las secuencias señal híbridas también pueden usarse con el contexto de la presente invención.

5 Los ejemplos típicos de secuencias líder de secreción no asociadas con una secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa en la naturaleza son aquellas que se originan del gen de la amiloglucosidasa (AG) de hongos (*glaA*- las dos 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 la α -amilasa (*Bacillus*).

DETECCIÓN

10 En la técnica se conoce una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de la secuencia de aminoácidos. Los ejemplos incluyen el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y separación de células activada por fluorescencia (FACS).

Los expertos en la técnica conocen una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación y pueden usarse en varios ensayos de ácido nucleico y aminoácidos.

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

15 Las moléculas o marcadores informadores adecuados incluyen los radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromogénicos así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y semejantes. Las patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen US-A-3.817.837; US-A-3.850.752; US-A-3.939.350; US-A-3.996.345; US-A-4.277.437; US-A-4.275.149 y US-A-4.366.241.

También pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes como se muestra en US-A-4.816.567.

20 PROTEÍNAS DE FUSIÓN

La lípido aciltransferasa para uso en la presente invención puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo para ayudar en la extracción y purificación de ésta. Los ejemplos de parejas en las proteínas de fusión incluyen glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a ADN y/o activación transcripcional) y β -galactosidasa. También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítica entre la pareja de la proteína de fusión y la secuencia de la proteína de interés para permitir la eliminación de las secuencias de proteínas de fusión. Preferiblemente, la proteína de fusión no dificultará la actividad de la secuencia de la proteína.

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

30 La secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria puede ligarse a una secuencia no nativa para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para cribar bibliotecas de péptidos para agentes capaces de influir en la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia química que expresa un epítipo no nativo que es reconocido por un anticuerpo disponible comercialmente.

La invención se describirá ahora, sólo como ejemplo, con referencia a las Figuras y Ejemplos siguientes.

35 La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa madura mutante de *Aeromonas salmonicida* (GCAT) con una mutación de Asn80Asp (notablemente, el aminoácido 80 está en la secuencia madura) (SEQ ID 16);

La Figura 2 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 1) de una lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC #7965);

La Figura 3 muestra una secuencia consenso pfam00657 de la base de datos versión 6 (SEQ ID No. 2);

40 La Figura 4 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 3) obtenida del organismo *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI:121051);

La Figura 5 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 4) obtenida del organismo *Aeromonas salmonicida* (AAG098404; GI:9964017);

La Figura 6 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 5) obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (número de registro Genbank NP_631558);

- La Figura 7 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 6) obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (número de registro Genbank: CAC42140);
- La Figura 8 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 7) obtenida del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de registro Genbank P41734);
- 5 La Figura 9 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 8) obtenida del organismo *Ralstonia* (número de registro Genbank: AL646052);
- La Figura 10 muestra SEQ ID No. 9 Scoe 1 NCBI código de registro de la proteína CAB39707.1 GI:4539178 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- 10 La Figura 11 muestra una secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 10 Scoe2 NCBI código de registro de la proteína CAC01477.1 GI:9716139 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 12 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 11) Scoe3 NCBI código de registro de la proteína CAB88833.1 GI:7635996 proteína posible secretada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 13 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 12) Scoe4 NCBI código de registro de la proteína CAB89450.1 GI:7672261 proteína posible secretada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- 15 La Figura 14 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 13) Scoe5 NCBI código de registro de la proteína CAB62724.1 GI:6562793 lipoproteína posible [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 15 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 14) Srim1 NCBI código de registro de la proteína AAK84028.1 GI:15082088 GDSL-lipasa [*Streptomyces rimosus*];
- 20 La Figura 16 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 15) de una lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* subesp. *Salmonicida* (ATCC#14174);
- La Figura 17 muestra SEQ ID No. 19 Scoe1 NCBI código de registro de la proteína CAB39707.1 GI:4539178 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 18 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 25) de la construcción de fusión usada para la mutagénesis del gen de la lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila*. Los aminoácidos subrayados son un péptido señal de xilanasas;
- 25 La Figura 19 muestra una secuencia polipeptídica de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces* (SEQ ID No. 26);
- La Figura 20 muestra una secuencia polipeptídica de una enzima lípido aciltransferasa de *Thermobifida* (SEQ ID No. 27);
- La Figura 21 muestra una secuencia polipeptídica de una enzima lípido aciltransferasa de *Thermobifida* (SEQ ID No. 28);
- 30 La Figura 22 muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Corynebacterium efficiens* GDSx 300 aminoácidos (SEQ ID No. 29);
- La Figura 23 muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Novosphingobium aromaticivorans* GDSx 284 aminoácidos (SEQ ID No. 30);
- 35 La Figura 24 muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces coelicolor* GDSx 269 aa (SEQ ID No. 31);
- La Figura 25 muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces avermitilis* I GDSx 269 aminoácidos (SEQ ID No. 32);
- La Figura 26 muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces* (SEQ ID No. 33);
- 40 La Figura 27 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 34) obtenida del organismo *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI: 121051) (notablemente, ésta es la secuencia madura);
- La Figura 28 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 35) de una lípido aciltransferasa madura mutante de *Aeromonas salmonicida* (GCAT (notablemente, ésta es la secuencia madura);
- La Figura 29 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 36) de *Streptomyces thermosacchari*;

- La Figura 30 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 37) de *Streptomyces thermosacchari*;
- La Figura 31 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 38) de *Thermobifida fusca*/GDSx 548 aminoácidos;
- La Figura 32 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 39) de *Thermobifida fusca*;
- La Figura 33 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 40) de *Thermobifida fusca*/GDSx;
- 5 La Figura 34 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 41) de *Corynebacterium efficiens*/GDSx 300 aminoácidos;
- La Figura 35 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 42) de *Corynebacterium efficiens*;
- La Figura 36 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 43) de *S. coelicolor*/GDSx 268 aminoácidos;
- La Figura 37 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 44) de *S. coelicolor*;
- 10 La Figura 38 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 45) de *S. avermitilis*;
- La Figura 39 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 46) de *S. avermitilis*;
- La Figura 40 muestra una secuencia de aminoácidos (SEQ ID No. 47) de *Thermobifida fusca*/GDSx;
- La Figura 41 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 48) de *Thermobifida fusca*/GDSx;
- La Figura 42 muestra el alineamiento de L131 y homólogos de *S. avermitilis* y *T. fusca* ilustra que la conservación del resto GDSx (GDSY en L131 y *S. avermitilis* y *T. fusca*), la caja GANDY, que es bien GGND A o GGNDL y el bloque HPT (que se considera que es la histidina catalítica conservada). Estos tres bloques conservados están resaltados;
- 15 La Figura 43 muestra SEQ ID No. 17 que es la secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;
- La Figura 44 muestra SEQ ID No. 18 que es la secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;
- 20 La Figura 45 muestra una representación con cintas de la estructura cristalina de 1IVN.PDB que tiene glicerol en el sitio activo. La Figura se hizo usando el visor Deep View Swiss-PDB;
- La Figura 46 muestra la Estructura Cristalina de 1IVN.PDB- Vista Lateral usando el visor Deep View Swiss-PDB, con glicerol en el sitio activo- los residuos en 10A del glicerol del sitio activo tienen color oscuro;
- 25 La Figura 47 muestra la Estructura Cristalina de 1IVN.PDB- Vista Superior usando el visor Deep View Swiss-PDB, con glicerol en el sitio activo- los residuos en 10A del glicerol del sitio activo tienen color oscuro;
- La Figura 48 muestra el alineamiento 1;
- La Figura 49 muestra el alineamiento 2;
- Las Figuras 50 y 51 muestran un alineamiento de 1IVN a P10480 (P10480 es la secuencia de la base de datos para la enzima de *A. hydrophila*), este alineamiento se obtuvo a partir de la base de datos PFAM y se usó en el proceso de construcción del modelo;
- 30 La Figura 52 muestra un alineamiento en el que P10480 es la secuencia de la base de datos para *Aeromonas hydrophila*. Esta secuencia se usa para la construcción del modelo y la selección de sitio. Obsérvese que la proteína completa (SEQ ID No. 25) se representa, la proteína madura (equivalente a SEQ ID No. 34) empieza en le residuo 19. A. sal es GDSX lipasa de *Aeromonas salmonicida* (SEQ ID No. 4), A. hyd es GDSX lipasa de *Aeromonas hydrophila* (SEQ ID No. 34). La secuencia consenso contiene un * en la posición de una diferencia entre las secuencias listadas;
- 35 La Figura 53 muestra una construcción génica usada en el Ejemplo 1;
- La Figura 54 muestra una construcción génica con optimización de codones (no. 052907) usada en el Ejemplo 1; y
- La Figura 55 muestra la secuencia del inserto XhoI que contiene el gen precursor LAT-KLM3', las cajas -35 y -10 están subrayadas;
- 40

- La Figura 56 muestra BML780-KLM3'CAP50 (que comprende SEQ ID No. 16- colonia superior) y BML780 (la cepa huésped vacía- colonia inferior) después de 48 h de crecimiento a 37°C en 1% agar tributirín;
- La Figura 57 muestra una secuencia de nucleótidos de *Aeromonas salmonicida* (SEQ ID No. 49) incluyendo la secuencia señal (preLAT- posiciones 1 a 87);
- 5 La Figura 58 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 50) que codifica una lípido aciltransferasa para uso en la presente invención obtenida del organismo *Aeromonas hydrophila*;
- La Figura 59 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 51) que codifica una lípido aciltransferasa para uso en la presente invención obtenida del organismo *Aeromonas salmonicida*;
- 10 La Figura 60 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 52) que codifica una lípido aciltransferasa para uso en la presente invención obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de registro Genbank NC_003888.1: 8327480..8328367);
- La Figura 61 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 53) que codifica una lípido aciltransferasa para uso en la presente invención obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de registro Genbank AL939131.1: 265480..266367);
- 15 La Figura 62 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 54) que codifica una lípido aciltransferasa para uso en la presente invención obtenida del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de registro Genbank Z75034);
- La Figura 63 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 55) que codifica una lípido aciltransferasa para uso en la presente invención obtenida del organismo *Ralstonia*;
- 20 La Figura 64 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 56 que codifica NCBI código de acceso de la proteína CAB39707.1 GI:4539178 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 65 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 57 que codifica Scoe2 NCBI código de acceso de la proteína CAC01477.1 GI:9716139 proteína hipotética conservada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 66 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 58 que codifica Scoe3 NCBI código de acceso de la proteína CAB88833.1 GI:7635996 proteína posible secretada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- 25 La Figura 67 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 59 que codifica Scoe4 NCBI código de acceso de la proteína CAB89450.1 GI:7672261 proteína posible secretada [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- La Figura 68 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 60 que codifica Scoe5 NCBI código de acceso de la proteína CAB62724.1 GI:6562793 lipoproteína posible [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];
- 30 La Figura 69 muestra una secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 61 que codifica Srim1 NCBI código de acceso de la proteína AAK84028.1 GI:15082088 GDSL-lipasa [*Streptomyces rimosus*];
- La Figura 70 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 62) que codifica una lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC #7965);
- La Figura 71 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 63) que codifica una lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* subesp. *Salmonicida* (ATCC #14174);
- 35 La Figura 72 muestra una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 24) que codifica una enzima de *Aeromonas hydrophila* incluyendo un péptido señal de xilanasas;
- La figura 73 muestra la secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa madura mutante de *Aeromonas salmonicida* (GCAT) con una mutación de Asn80Asp (notablemente, el aminoácido 80 está en la proteína madura)-mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 16- y después de experimentar modificación posterior a la traducción como SEQ ID No. 68- los residuos de aminoácidos 235 y 236 de SEQ ID No. 68 no están unidos covalentemente después de la modificación posterior a la traducción. Los dos péptidos formados se mantienen juntos por uno o más puentes S-S. El aminoácido 236 en SEQ ID No. 68 corresponde al residuo de aminoácido número 274 en SEQ ID No. 16 mostrado en la presente memoria;
- 40
- La Figura 74a muestra un proceso convencional para desgomado con agua/refinado de aceite comestible crudo. Al final del desgomado con agua la fase de aceite y la fase de goma se separan. Después de esto, la fase de aceite y la fase de goma pueden procesarse adicionalmente por métodos convencionales/conocidos;
- 45

- La Figura 74b muestra el proceso según la presente invención para el desgomado con agua /refinado de aceite comestible crudo con una enzima. La fase de aceite obtenida cuando se separan la fase de aceite y de goma tiene un rendimiento mucho mayor comparado con la fase de aceite de un proceso comparativo (es decir, uno mostrado en la Figura 74a- es decir, desgomado con agua sin la adición de una enzima). La fase de aceite y/o la fase de goma pueden experimentar opcionalmente un procesamiento adicional, tal como procesamiento convencional adicional;
- 5 La Figura 75 muestra un diagrama de flujo de un proceso de desgomado con agua a escala de laboratorio según la presente invención;
- La Figura 76 muestra un diagrama para el análisis de la fase de goma y la fase de aceite después de del desgomado con agua (es decir, Etapa 1 de la Figura 74a o b);
- 10 La Figura 77 muestra la fase de goma después de 3 horas después del desgomado con agua de aceite de soja crudo según la presente invención;
- La Figura 78 muestra el % de goma después de 30 minutos de desgomado con agua con y sin enzima de aceite de soja crudo;
- 15 La Figura 79 muestra el efecto de la cantidad de agua (1,5, 2 ó 2,5%) en la cantidad de goma después del desgomado con agua de aceite de soja crudo;
- La Figura 80 muestra el efecto con y sin enzima por desgomado con diferentes cantidades de agua (1,5, 2 ó 2,5%) en la cantidad de goma después de desgomado con agua de aceite de soja crudo con y sin enzima;
- La Figura 81 muestra las ppm de fósforo en la fase de aceite después del desgomado con agua de aceite de soja crudo con diferentes dosificaciones de la enzima. La columna 1 es el control sin enzima;
- 20 La Figura 82 muestra el % de triglicéridos en la fase de goma después del desgomado con agua de aceite de soja crudo con diferentes dosificaciones de la enzima. La columna 1 es el control sin enzima;
- La Figura 83 muestra el % relativo de PA en la fase de goma después del desgomado con agua de aceite de soja crudo con diferentes dosificaciones de la enzima. La columna 1 es el control sin enzima;
- 25 La Figura 84 muestra el % relativo de PE en la fase de goma después del desgomado con agua de aceite de soja crudo con diferentes dosificaciones de la enzima. La columna 1 es el control sin enzima;
- Figura 85 Rendimiento de aceite incrementado (%) obtenido en el desgomado enzimático comparado con el control. Los aceites se centrifugan a diferentes fuerzas de centrifugación relativas durante 3 min;
- La Figura 86 muestra el contenido (%) de goma y cantidad de triglicérido en la goma, obtenido de aceites centrifugados a diferentes tiempos (los minutos se muestran en barras) y se muestran diferentes fuerzas de centrifugación relativas. Lote 3: control, 55°C, 4: con enzima (KLM3'), 55°C;
- 30 La figura 87 muestra la viscosidad como una función de la velocidad de cizallamiento. Las mediciones se basan en la goma del lote 1: control, 70°C y lote 2: con enzima, 70°C;
- La Figura 88 muestra el rendimiento de aceite (%) calculado a partir de la cantidad de goma (control) menos la cantidad de goma (muestra enzimática);
- 35 La Figura 89 muestra los resultados de análisis por TLC de la fase de goma. El contenido en triglicéridos (%) en gomas obtenidas a partir del desgomado con cantidades crecientes (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 y 1,9 ml disolución al 4%) de NaOH;
- La Figura 90 muestra los resultados de GC. Los contenidos (%) de FFA, fitoesteroles y ésteres de fitoesterol en los aceites, desgomados con ml crecientes de NaOH- Muestra 1: control (sin enzima ni NaOH); Muestras 2-8: muestras enzimáticas con KLM3' (0,1 TIPU-k/g) y cantidades crecientes (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 y 1,9 ml disolución al 4%) de NaOH;
- 40 La Figura 91 muestra los resultados de análisis por TLC de la fase de goma. Degradación relativa de los fosfolípidos (PA, PE, PC y PI) en gomas. Muestra 1: control (sin enzima ni NaOH), muestra 2-7: muestras enzimáticas con KLM3' (0,1 TIPU-K/g) y ml crecientes de NaOH;
- La Figura 92 muestra el análisis microscópico de gomas de desgomado con agua convencional y desgomado con agua enzimático según la presente invención (fotografías con aumentos de 200 y 400 a 25°C);
- 45 La Figura 93 muestra el análisis por rayos X en las fases de goma de desgomado convencional y enzimático;

- La Figura 94 muestra embudos de sedimentación (día 3). Izquierda: control, derecha: aceite tratado con enzima;
- La Figura 95 muestra el análisis microscópico en gomas de desgomado con agua convencional y enzimático;
- La Figura 96 muestra el rendimiento de aceite incrementado obtenido en desgomado enzimático comparado con el control;
- 5 La Figura 97 muestra la pérdida de aceite en la muestra control y con desgomado con agua enzimático (según la presente invención) realizado con 1, 1,5 y 2% de agua. Cálculo de pérdida de aceite: (% goma/% triglicérido en la goma) x 100%;
- La Figura 98 muestra la degradación relativa de ácido fosfatídico y fosfatidiletanolamina en muestras de goma enzimáticas (KLM3') comparadas con el control (sin enzima);
- 10 La Figura 99 muestra las mediciones de viscosidad de fases de goma enzimáticas, obtenidas del desgomado con cantidad variable de agua (1,25, 1,5, 1,75 y 2%);
- La Figura 100 muestra la Fase de Goma del desgomado con agua de soja crudo con KLM3' y con la adición de aceptor como se muestra en la Tabla 1 del Ejemplo 9;
- La Figura 101 muestra la cantidad relativa de fosfolípido en la fase de goma analizada por HPTLC;
- 15 La Figura 102 muestra análisis por ICP de fósforo en aceite del desgomado con agua de aceite de soja crudo (tabla 1 del Ejemplo 9);
- Figura 103: Ejemplo 13 TLC (tampón de corrida 1) de la muestra 1 a 9 después de 30 minutos de incubación;
- Figura 104: Ejemplo 13 TLC (tampón de corrida 1) de la muestra 1 a 9 después de 240 minutos de incubación;
- Figura 105: Ejemplo 13 TLC (tampón de corrida 6) de la muestra 1 a 9 después de 30 minutos de incubación. PE= fosfatidiletanolamina, PA= ácido fosfatídico, PI= fosfatidilinositol y PC= fosfatidilcolina;
- 20 Figura 106: Ejemplo 13 TLC (tampón de corrida 6) de la muestra 1 a 9 después de 240 minutos de incubación. PE= fosfatidiletanolamina, PA= ácido fosfatídico, PI= fosfatidilinositol y PC= fosfatidilcolina;
- Figura 107: Ejemplo 13 Degradación relativa de los fosfolípidos por tratamiento enzimático del aceite crudo con lípido aciltransferasa (KLM3') y fosfolipasa C (PLC). Tiempo de reacción de 240 minutos;
- 25 Figura 108: Ejemplo 13 Reacción de diglicérido aciltransferasa de fosfolípidos;
- Figura 109: Ejemplo 13 Interacción de Fosfolipasa C y KLM3' en el nivel de diglicérido (DAG) en el desgomado de aceite de soja crudo;
- Figura 110: Ejemplo 13 análisis por TLC;
- La Figura 111 muestra el efecto de la adición de enzima en los triglicéridos;
- 30 La Figura 112 muestra el efecto del tiempo de reacción en los triglicéridos;
- La Figura 113 muestra el análisis por TLC de sustrato diglicérido/PC incubado con aciltransferasa durante 30 y 90 minutos como se detalla en el Ejemplo 13;
- La Figura 114 muestra el análisis por TLC de sustrato diglicérido/PC incubado con aciltransferasa durante 30 y 90 minutos como se detalla en el Ejemplo 13;
- 35 La Figura 115 muestra el efecto de la enzima aciltransferasa en la formación de triglicéridos en un sustrato de diglicérido/PC 80/20;
- La Figura 116 muestra el efecto del tiempo de incubación en la formación de triglicéridos en un sustrato de diglicérido/PC 80/20;
- La Figura 117 muestra un diagrama de flujo para el desgomado con agua enzimático;
- 40 La Figura 118 muestra el análisis por TLC de las muestras de la fase de goma después de desgomado con agua a 55⁰C e incubación durante 0d, 1d ó 7d como se detalla en el Ejemplo 15; y

La Figura 119 muestra el análisis por TLC de las muestras de la fase de goma después de desgomado con agua a 45°C e incubación durante 0d, 1d ó 7d como se detalla en el Ejemplo 15.

EJEMPLO 1

Expresión de KLM3' en *Bacillus licheniformis*

- 5 Una secuencia de nucleótidos (SEQ ID No. 49) que codifica una lípido aciltransferasa (SEQ ID No. 16, de ahora en adelante en la presente memoria KLM3') se expresó en *Bacillus licheniformis* como una proteína de fusión con el péptido señal de la [alfa]-amilasa (LAT) de *B. licheniformis* (véanse las FIGS. 53 y 54). Para la expresión óptima en *Bacillus*, se encargó una construcción génica con optimización de codones (no. 052907) a Geneart (Geneart AG, Regensburg, Alemania).
- 10 La construcción no. 052907 contiene una promotor de LAT incompleto (sólo la secuencia -10) delante del gen precursor LAT-KLM3' y la transcripción de LAT (Tlat) en 3' del gen precursor LAT-KLM3' (véanse las FIGS 53 y 55). Para crear un fragmento *Xho*I que contiene el gen precursor LAT-KLM3' flanqueado por el promotor LAT completo en el extremo 5' y el terminador LAT en el extremo 3', se realizó una amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con los cebadores Plat5XhoI_FW y EBS2XhoI_RV y la construcción génica 052907 como molde.
- 15 Plat5XhoI_FW:

ccccgctcgaggcttttcttttgaagaaaatatagggaaaatggtacttgttaaaaattc
ggaatattatacaatatcataatgtttcacattgaaagggg

EBS2XhoI_RV: tggaatcctcgagttttatcctttacctgtctcc

Se realizó la PCR en un termociclador con ADN Polimerasa de Alta Fidelidad Phusion (Finnzymes OY, Espoo, Finlandia) según las instrucciones del fabricante (temperatura de hibridación de 55°C).

- 20 El fragmento de PCR resultante se digirió con la enzima de restricción *Xho*I y se ligó con ADN ligasa T4 en pCatH digerido con *Xho*I según las instrucciones del proveedor (Invitrogen, Carlsbad, Calif. EEUU).

La mezcla de ligación se transformó en la cepa de *B. subtilis* SC6.1 como se describe en la Solicitud de Patente U.S. US20020182734 (Publicación Internacional WO 02/14490). La secuencia del inserto *Xho*I que contiene el gen precursor LAT-KLM3' se confirmó por secuenciación de ADN (BaseClear, Leiden, Holanda) y uno de los clones con plásmido correcto se designó pCatH-KLM3' (ori1) (Figura 53). pCatH-KLM3' (ori1) se transformó en la cepa de *B. licheniformis* BML780 (un derivado de BRA7 y BML612, véase WO2005111203) a la temperatura permisiva (37°C).

- 25

Se seleccionó un transformante resistente a neomicina (neoR) y resistente a cloranfenicol (CmR) y se designó BML780(pCatH-KLM3'(ori1)). El plásmido en BML780(pCatH-KLM3'(ori1)) se integró en la región catH en el genoma de *B. licheniformis* creciendo la cepa a una temperatura no permisiva (50°C) en medio con 5 µg/ml de cloranfenicol. Se seleccionó un clon resistente CmR y se designó BML780-pCatH-KLM3'(ori1). BML780-pCatH-KLM3'(ori1) se creció de nuevo a la temperatura permisiva durante varias generaciones sin antibióticos para que secuencias del vector formen un bucle y se seleccionó un clon CmR sensible a neomicina (neoS). En este clon, las secuencias del vector de pCatH en el cromosoma se escinden (incluyendo el gen de resistencia a neomicina) y sólo se deja el casete catH-LATKLM3'. A continuación, el casete catH-LATKLM3' en el cromosoma se amplificó creciendo la cepa en medio con concentraciones crecientes de cloranfenicol. Después de varios ciclos de amplificación, se seleccionó un clon (resistente frente a 50 µg/ml de cloranfenicol) y se designó BML780-KLM3'CAP50. Para verificar la expresión de KLM3', BML780-KLM3'CAP50 y BML780 (la cepa huésped vacía) se crecieron durante 48 h a 37°C en una placa de agar Heart Infusion (Bacto) con 1% tributirín. Fue claramente visible una zona de aclaramiento, indicativa de actividad lípido aciltransferasa, alrededor de la colonia de BML780-KLM3'CAP50 pero no alrededor de la cepa huésped BML780 (véase la Figura 56). Este resultado muestra que una cantidad sustancial de KLM3' se expresa en la cepa de *B. licheniformis* BML780-KLM3'CAP50 y que estas moléculas de KLM3' son funcionales.

- 30
- 35
- 40

EJEMPLO COMPARATIVO 1

Construcción del vector

- 45 La construcción del plásmido es pCS32new N80D, que es un derivado pCCmini que porta la secuencia que codifica la forma madura de la Glicerofosfolípido-colesterol aciltransferasa nativa de *Aeromonas salmonicida* con una sustitución Asn a Asp en la posición 80 (KLM3'), bajo el control del promotor p32 y con una secuencia señal CGTasa.

La cepa huésped usada para la expresión es en la cepa de *Bacillus subtilis* OS21ΔAprE.

El nivel de expresión se mide como actividad transferasa, expresada como % de colesterol esterificado, calculado a partir de la diferencia en colesterol libre en la muestra de referencia y colesterol libre en la muestra de enzima en reacciones con PC (T_{PC}) como donante y colesterol como molécula aceptora.

5 Condiciones de cultivo

5 ml de caldo LB (Digerido enzimático de caseína, 10 g/l; extracto de Levadura bajo en sodio, 5 g/l; Cloruro de Sodio, 5 g/l; agentes para formación de comprimidos inertes, 2 g/l) suplementado con 50 mg/l de kanamicina, se inocularon con una única colonia y se incubó a 30°C durante 6 horas a 205 rpm. Se usaron 0,7 ml de este cultivo para inocular 50 ml de medio SAS (K_2HPO_4 , 10 g/l; MOPS (ácido 3-morfolinopropano sulfónico), 40 g/l; Cloruro de Sodio, 5 g/l; Antiespumante (Sin 260), 5 gotas/l; Harina de soja desgrasada, 20 g/l; Biospringer 106 (100% dw YE), 20 g/l) suplementado con 50 mg/l de kanamicina y una disolución de hidrolizados de almidón con alta maltosa (60 g/l). La incubación continuó durante 40 horas a 30°C y 180 rpm antes de separar el sobrenadante del cultivo por centrifugación a 19.000 rpm durante 30 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se usó directamente para la medición de la actividad transferasa.

Preparación de los sustratos y reacción enzimática

15 Se pesaron PC (Avanti Polar Lipids #441601) y colesterol (Sigma C8503) en la proporción 9:1, se disolvió en cloroformo y se evaporó a sequedad.

El sustrato se preparó por dispersión de 3% PC:Colesterol 9:1 en 50 mM tampón Hepes pH 7.

20 Se transfirieron 0,250 ml de disolución de sustrato a un tubo de vidrio de 3 ml con tapa de rosca. Se añadieron 0,025 ml de sobrenadante de cultivo y la mezcla se incubó a 40°C durante 2 horas. También se preparó una muestra de referencia con agua en lugar de la enzima. El calentamiento de la mezcla de reacción en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos paró la reacción enzimática. Se añadieron 2 ml de 99% etanol a la mezcla de reacción antes de someterla a análisis por ensayo de colesterol.

Ensayo de colesterol

25 Se incubaron 100 µl de sustrato que contienen 1,4 U/ml de Colesterol oxidasa (SERVA Electrophoresis GmbH No. de cat. 17109), 0,4 mg/ml ABTS (Sigma A-1888), 6 U/ml Peroxidasa (Sigma 6782) en 0,1 M Tris-HCl, pH 6,6 y 0,5% Tritón X-100 (Sigma X-100) a 37°C durante 5 minutos antes de añadir 5 µl de muestra de reacción con enzima y mezclar. La mezcla de reacción se incubó durante 5 minutos más y se midió la DO_{405} . El contenido de colesterol se calculó a partir de los análisis de disoluciones estándar de colesterol que contienen 0,4 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,05 mg/ml y 0 mg/ml de colesterol en 99% EtOH.

30 Resultados

La tabla muestra la media de 8 cultivos de expresión independientes

Cepa	T_{PC}^a
OS21ΔAprE[πXΣ32vεω]	74,1 ± 10,1 ^b
^a T_{PC} es la actividad transferasa, expresada como % de colesterol esterificado, calculado a partir de la diferencia en colesterol libre en la muestra de referencia y colesterol libre en la muestra de enzima en reacciones con PC como molécula donante y colesterol como molécula aceptora. ^b Media de 8 cultivos de expresión independientes	

EJEMPLO 2

Uso de una lípido aciltransferasa en el desgomado con agua

35 MATERIALES Y MÉTODOS

Enzima:

KLM3': una lipido aciltransferasa enseñada en el Ejemplo 1 que tiene SEQ ID No. 68 (También referida en la presente memoria como "K932")-1.128 TIPU/ml

Aceite:

SBO 1: Aceite de soja crudo de Solae, Aarhus, DK. 27.09.2007 Delite (Basado en judías de Canadá)

5 SBO 2: Aceite de soja crudo de Brasil

RSO 3: Aceite de colza crudo extraído de Aarhus Karishamn

RSO 4: Aceite de colza crudo prensado de Scanola, Aarhus, DK

Estándar de Mezcla de Lecitina de Soja (ST16) de Spectra Lipid, Alemania

Métodos:

10 *HTPLC:*

Aplicador: Muestreador Automático TLC 4, CAMAG

Placa de HPTLC: 20 x 10 cm, Merck no. 1.05641. Activada 10 minutos a 160°C antes de usarla.

Aplicación:

15 Fase de aceite: 5 µl de una disolución al 8% de aceite en Cloroformo:Metanol 2:1 se aplicaron en la placa de HPTLC usando el Muestreador Automático de TLC.

Fase de goma: La fase de goma de 10 gramos de aceite se disolvió en 7,5 ml de cloroformo:metanol 2:1. 1 µl de la muestra se aplicó en la placa de HPTLC.

Aplicador de TLC.

Tampón de corrida 6: Cloroformo:1-propanol:Metilacetato:Metanol:0,25% KCl en agua 25:25:25:10:9

20 Tampón de corrida 5: P-eter:MTBE 30:70

Elución: La placa se eluyó 7 cm usando una Cámara de Revelado Automática ADC2 de Camag.

Revelado:

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

25 Después del revelado, las placas se escanearon en un Escáner Camag y se calculó el área de cada componente (punto) en la placa de TLC.

Cálculo

Fase de aceite:

30 La cantidad de fosfolípido en la fase de aceite se calculó analizando una lecitina Estándar con concentraciones conocidas de fosfolípidos (PE, PA, PI, PC, PS) a diferentes concentraciones en la misma placa de TLC que las muestras de aceite. Tomando como base la mezcla estándar se produjo una curva de calibración para cada fosfolípido y se usó para el cálculo de la concentración de fosfolípidos de cada fosfolípido en la muestra de aceite.

Tomando como base el peso en moles de la concentración de fosfolípidos se convirtió en ppM P (fósforo).

Fase de Goma:

35 El contenido de triglicérido en la fase de goma se calculó tomando como base el análisis de un aceite vegetal refinado estándar en la misma placa que la fase de goma. Tomando como base el análisis del aceite vegetal se produjo una curva de calibración y se usó para el cálculo del triglicérido en la fase de goma.

El análisis de los fosfolípidos en la fase de goma se basó en la aplicación de diferentes volúmenes de la fase de goma del control (sin enzima añadida) en la misma placa que las demás fases de goma. Tomando como base el análisis de los

fosfolípidos (PE y PA) en la fase de goma control se produjo una curva de calibración y se usó para el cálculo de la cantidad de fosfolípidos en las muestras tratadas con enzima respecto a la cantidad de fosfolípido en el control que se definió como 100%.

Medición de pH:

- 5 El pH de las muestras del desgomado de aceite se analizó por un método de fluorescencia descrito en http://www.3i-usa.com/downloads/hydrop_man.pdf, es decir, la medición del pH se realizó usando una HydroPlate® HP96C de Presens, Joef Engert Str. 11, D-93053 Regensburg, Alemania.

10 La HydroPlate® es una placa de microtitulación de poliestireno estéril en el formato común de 96 pocillos con 96 sensores integrados. Un sensor se inmoviliza en la parte inferior de cada pocillo. El sensor puede leerse desde la parte inferior. Esto puede hacerse mediante casi cualquier lector de placas de fluorescencia disponible comercialmente. El ensayo se basa en 2 agentes de tinción fluorescentes diferentes: Un indicador sensible al pH y un agente de tinción inerte de referencia. Esta combinación asegura una señal precisa con referencia interna para conseguir los resultados más exactos de los experimentos.

- 15 El pH puede medirse alternativamente usando un electrodo de pH según Bo Yang et al JAOCS, Vol. 83, No. 7 (2006) p 653-658.

Determinación de agua en el aceite

El agua residual en el aceite se determina por el método AOCS Ca 2c-25 o equivalente.

Análisis de GLC

- 20 Cromatógrafo de Gases Capilar Autosystem 9000 de Perkin Elmer equipado con columna de sílice fusionada WCOT 12,5 m x 0,25 mm ID x 0,1 µm espesor de la película 5% fenil-metil-silicona (CP Sil 8 CB de Chrompack).

Gas transportador: Helio.

Inyector. Inyección split en frío PSSI (temp inicial 50°C calentado hasta 385°C), volumen 1,0 µl. Detector FID: 395°C

Programa del horno (usado desde 30.10.2003):	1	2	3
Temperatura del horno, °C.	90	280	350
25 Isotermal, tiempo min.	1	0	10
Velocidad de la temperatura, °C/min.	15	4	

Preparación de la muestra: 50 mg de la muestra se disolvieron en 12 ml de Piridina, que contiene el estándar interno heptadecano, 0,5 mg/ml. Se transfirieron 500 µl de disolución de la muestra a un vial con tapón de goma, se añadieron 100 µl MSTFA:TMCS- 99:1 (N-Metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) y se hizo reaccionar durante 20 minutos a 60°C.

- 30 Cálculo: Los factores de respuesta para esteroles, palmitato de esteroles y estearato de esteroles se determinaron a partir de un material de referencia puro (peso del material puro 8-10 mg en 12 ml de Piridina, que contiene el estándar interno heptadecano, 0,5 mg/ml).

Ensayo enzimático, TIPU

Sustrato:

- 35 Se disolvieron 0,6% L-α Fosfatidilcolina 95% Planta (Avanti #441601), 0,4% Tritón-X 100 (Sigma X-100) y 5 mM CaCl₂ en 0,05 M tampón HEPES pH 7. Procedimiento del ensayo:

se añadieron 34 µl de sustrato a una cubeta, usando un analizador automático KoneLab. En el tiempo T= 0 min, se añadieron 4 µl de disolución de la enzima. También se analizó un blanco con agua en lugar de la enzima. La muestra se analizó y se incubó a 30°C durante 10 minutos.

- 40 El contenido de ácido graso libre de la muestra se analizó usando el kit NEFA C de WAKO GmbH.

La actividad enzimática TIPU pH 7 se calculó como micromoles de ácido graso producidos por minuto bajo las condiciones del ensayo.

Procedimiento de desgomado a escala de laboratorio.

Se pesaron 100 g de aceite de soja crudo en un matraz con Tapa Azul de 250 ml con tapón y se calentó hasta 50°C ó 55°C ó 60°C ó 65°C ó 70°C.

5 Se añadió agua al aceite seguido de la adición de la enzima. El aceite se homogeneizó con un mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agitó durante 30 minutos con agitación magnética a 450 rpm.

Después de 30, 120 ó 180 minutos, se transfirieron 10 ml de aceite a un tubo de centrifuga de 12 ml (pesado previamente). El aceite se calentó hasta 97°C en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y se centrifugó inmediatamente a 5.000 g durante 5 minutos.

10 El aceite se decantó de la fase de goma y los tubos se drenaron durante 30 minutos y se midió el peso de ambas fases. (Véase la Figura 75).

La fase de aceite se analizó para esteroides libres, ésteres de esteroles y ácidos grasos libres por GLC y la fase de aceite también se analizó por TLC. (Véase la Figura 76).

Resultados

EJEMPLO 2a:

15 En este experimento, se ensayó KLM3' en el proceso de desgomado con agua de SBO 1 crudo.

Se ensayaron diferentes dosificaciones de KLM3' desde 0,1 a 0,5 TIPU/g de aceite y también se ensayó el impacto del mezclado con Ultra Turrax.

La Tabla siguiente junto con la Figura 77 muestra una reducción clara de la fase de goma y un rendimiento mejorado del aceite (en la fase de aceite) en las muestras tratadas con KLM3'.

20 Se observó un incremento de aproximadamente 2% de aceite y había una tendencia de que se obtenía un rendimiento incrementado incrementando la dosificación de la enzima.

25 El mezclado también tuvo un impacto en la fase de goma. Se observó que el tratamiento con Ultra Turrax del aceite durante 30 seg justo después de la adición de la enzima proporcionó una fase de goma menor, pero el efecto de la adición de la enzima fue casi el mismo con o sin mezclado con Ultra Turrax. En la industria, es normal bombear el aceite a través de un mezclador estático o un mezclador dinámico después de la adición del agua y con el fin de imitar esto a escala de laboratorio se decidió usar mezclado con Ultra Turrax.

2460-150 (Ejemplo 2a)		1*	2	3	4	5*	6	7	8
Aceite de Soja Crudo Solae d.27-9-07	g	100	100	100	100	100	100	100	100
KLM3' 100 TIPU/ml	ml	0	0,1	0,25	0,5	0	0,1	0,25	0,5
Agua Extra	ml	2,00	1,90	1,75	1,50	2,00	1,90	1,75	1,50
TIPU/g de aceite		0,00	0,10	0,25	0,50	0,00	0,10	0,25	0,50
% de agua		2	2	2	2	2	2	2	2
Ultra Turrax		-	-	-	-	+	+	+	+
(continuación)									
2460-150 (Ejemplo 2a)		1*	2	3	4	5*	6	7	8
pH		5,39	5,7	5,91	5,72	5,55	5,99	5,72	5,49
Fase de Goma, %		8,48	6,36	5,73	4,76	6,19	4,63	4,44	4,19
Fase de Aceite, %		91,5	93,6	94,3	95,2	93,8	95,4	95,6	95,8

* control sin adición de enzima

EJEMPLO 2b:

Dos SBO crudos diferentes se ensayaron en el desgomado con agua según el procedimiento estándar con o sin la adición de la enzima KLM3'. La dosificación de la enzima fue 0,25 TIPU/g.

Receta

2460-151 (Ejemplo 2b)		1	2	3	4
SBO 1	g	100	100		
SBO 2	g			100	100
KLM3' 100 TIPU/ml	ml	0	0,25	0	0,25
Agua Extra	ml	2,00	1,75	2,00	1,75
TIPU/g de aceite		0,00	0,25	0,00	0,25
% agua		2	2	2	2
pH		5,78	5,75	5,73	5,68

5 Los resultados mostrados en la tabla siguiente indican una clara reducción de la fase de goma tanto después de 30 minutos como de 120 minutos de tiempo de reacción, lo que corresponde a un rendimiento de aceite mayor. El análisis de esteroles y éster de esteroles en la fase de aceite mostró una alta conversión de esteroles a éster de esteroles en las muestras tratadas con enzima. También se observa que la cantidad de ácido graso libre (FFA) se incrementaba, debido a que también había tenido lugar una actividad hidrolítica.

10 Resultados

2460-151	SBO 1	SBO 1	SBO 2	SBO 2
KLM3', U/g de aceite	0	0,25	0	0,25
% Goma, 30 min	6,20	5,21	5,66	4,80
% Goma, 120 min	5,59	4,86	5,24	3,90
% Aceite, 30 min	93,8	94,79	94,34	95,2
% Aceite, 120 min	94,41	95,14	94,76	96,1
Fase de Aceite				
FFA total	0,37	0,53	0,64	0,85
Esteroles	0,31	0,09	0,27	0,07
Éster de esteroles	0,14	0,47	0,12	0,50

EJEMPLO 2c:

En este experimento, se ensayaron diferentes dosificaciones de KLM3' en el desgomado con agua de SBO 2 a 50°C. También se ensayaron diferentes niveles de agua en el proceso, concretamente 1,5%, 2% y 2,5%, con y sin la adición de enzima.

15 Receta

2460-152 (Ejemplo 2c)		1	2	3	4	5	6	7	8
SBO 2	g	100	100	100	100	100	100	100	100
KLM3' 100 TIPU/ml	ml	0	0,1	0,25	0,4	0	0,25	0	0,25

Agua Extra	ml	2,00	1,90	1,75	1,60	1,50	1,25	2,50	2,25
TIPU/g de aceite		0,00	0,10	0,25	0,40	0,00	0,25	0,00	0,25
% agua		2	2	2	2	1,5	1,5	2,5	2,5
pH		5,32	5,92	5,72	5,59	5,58	5,73	5,30	5,81

Los resultados mostrados en las tablas y también en la Figura 78, Figura 79, Figura 80, Figura 81, Figura 82, Figura 83 y Figura 84 siguientes indican claramente una cantidad reducida de fase de goma y debido a que la suma de la fase de goma y la fase de aceite es 100% se concluye que la aciltransferasa (KLM3') contribuye a la mejora del rendimiento de aceite en la fase de aceite.

- 5 También se observó que el contenido de fosfolípido en la fase de goma se redujo en las muestras tratadas con enzima. Tanto la fosfatidiletanolamina (PE) como el ácido fosfatídico (PA) se redujeron en la fase de goma respecto a la cantidad de estos fosfolípidos en la fase de goma sin tratamiento con enzima. La cantidad de triglicérido en la fase de goma también fue menor en las fases de goma tratadas con enzima, lo que también confirma el incremento en el rendimiento de aceite (en la fase de aceite) en las muestras tratadas con enzima.
- 10 La cantidad de agua añadida al aceite de soja crudo también mostró como se esperaba un impacto en la cantidad de fase de goma, pero los resultados también confirmaron el efecto de la aciltransferasa en el rendimiento a diferentes adiciones de agua respecto al control sin adición de enzima (véase la Figura 80).

En los experimentos de desgomado con agua, el pH estaba en el intervalo de 5,5 a 6 lo que explica una alta actividad enzimática a dosificación baja y una alta conversión de esteroles en ésteres de esteroles.

15 Resultados

2460-152		1	2	3	4	5	6	7	8
Fase de goma									
Goma, 30 min	%	6,48	5,14	5,68	5,19	5,73	4,85	7,06	6,03
Goma, 120 min	%	5,79	5,88	4,86	4,94	5,65	5,07	6,12	5,96
Análisis TLC									
Fósforo	ppm	66	73	64	58	76	62	65	62
PA	% rel.	100	61	45	35	86	47	105	50
PE	% rel.	100	45	24	18	88	26	102	34
Triglicérido	%	65	26	37	29	62	41	62	38
2460-152		1	2	3	4	5	6	7	8
Análisis GLC									
FFA	%	0,63	0,71	0,78	0,87	0,57	0,79	0,57	0,73
Esteroles Libres		0,27	0,12	0,06	0,05	0,27	0,06	0,26	0,11
Ésteres de Esteroles		0,18	0,41	0,47	0,51	0,12	0,53	0,13	0,40

Los análisis se hicieron en duplicado y los resultados se usaron para la evaluación Estadística de los resultados usando el software StatGraphic S Plus.

EJEMPLO 2d:

- 20 Con el fin de investigar el efecto de KLM3' en el rendimiento de aceite a diferentes temperaturas, la enzima se ensayó en desgomado con agua de SBO2 a 55, 60, 65 y 70°C.

Receta

2460-154, 155, 156 y 157		1	2	3	4
SBO 2	g	100	100	100	100
KLM3' 100 TIPU/ml	ml	0	0,10	0,20	0,30
Agua Extra	ml	2,00	1,90	1,80	1,70
TIPU/g de aceite		0,00	0,10	0,20	0,30
% agua		2	2	2	2

Los resultados mostrados en la Tabla siguiente ilustran claramente el efecto de KLM3' en la cantidad de fase de goma. Una dosificación de 0,1 TIPU/g de aceite a todas las temperaturas proporcionó una reducción significativa de la cantidad de goma. El incremento de la cantidad de enzima de 0,2 a 0,3 disminuyó un poco más la fase de goma.

5 Resultados

% de Fase de goma por desgomado con agua de SBO 2 a diferentes temperaturas, tiempos de reacción y dosificaciones de enzima.

Temperatura °C	Tiempo de reacción minutos	Enzima 0 TIPU/g	Enzima 0,1 TIPU/g	Enzima 0,2 TIPU/g	Enzima 0,3 TIPU/g
55	30	6,53	4,77	5,12	5,54
60	30	6,64	4,83	4,73	4,55
65	30	6,79	5,63	5,05	4,94
70	30	6,49	4,58	4,36	4,23
55	120	6,29	4,94	4,72	4,80
60	120	5,79	4,76	4,47	4,05
65	120	6,70	5,37	4,84	5,39
70	120	5,05	4,41	3,39	3,00

EJEMPLO 3

Desgomado con agua enzimático en planta piloto

10 **Receta**

Ingredientes aplicados en ensayos de desgomado con agua piloto.

Lote 1: control, 70°C,

Lote 2: con enzima (concretamente la lípido aciltransferasa K932- algunas veces referida en la presente memoria como KLM3'- que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 68), 70°C,

15 Lote 3: control, 55°C y

Lote 4: con enzima (concretamente la lípido aciltransferasa K932- algunas veces referida en la presente memoria como KLM3'- que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 68), 55°C.

Cantidad		Lote			
		1	2	3	4
Publicación no.		2460-158		2460-160	
Aceite de Soja Crudo	kg	20	20	20	20
K932, 1.128 TIPU/ml	MI	0	3,55	0	3,55
Agua Extra	MI	400,30	396,10	400,1	396,47
TIPU-K/g de aceite		0,00	0,2	0,00	0,2
Agua	%	2	2	2	2

Procedimiento de desgomado con agua en planta piloto

5 El aceite se calentó inicialmente bajo cubierta de N₂ y agitación en un tanque de 50 litros. Posteriormente, se añadió agua (y enzima) al aceite. En los experimentos iniciales (lotes 1 y 2), se hizo recircular el aceite después de la adición del agua y la enzima, usando un homogeneizador (Silverson, Chesham Suecia). En los lotes 3 y 4 sólo se usó una bomba de recirculación para disminuir la agitación en el tanque.

10 Las muestras de aceite se recogieron (lotes 1-4) para análisis de laboratorio después de 30 minutos de actividad enzimática y se pusieron en un baño de agua hirviendo (10 minutos) con el fin de inactivar la enzima. La inactivación del aceite restante en el tanque se hizo calentando el aceite hasta 75⁰C (con agitación). Posteriormente, se realizó una centrifugación en una centrífuga precalentada (agua caliente) (Alfa Laval) y la fase de aceite se compactó en cubetas y se pesó. Se ensayaron diferentes ajustes de capacidad de la centrífuga, no fue posible monitorizar la fase de goma separada, ya que el volumen de la centrífuga era demasiado grande comparado con la cantidad de aceite. La fase de goma se recogió así de la tapa de la centrífuga, donde se había acumulado.

Desgomado con agua y centrifugación en laboratorio

15 Se pesaron 100 g de aceite de soja crudo en un matraz con tapa azul de 250 ml con tapón y se calentó hasta 55⁰C. Se añadió agua al aceite seguido de adición de enzima. El aceite se homogeneizó usando un mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agitó durante 30 minutos con agitación magnética a 450 rpm. Después de 30 minutos, se transfirieron 10 ml de aceite a un tubo de centrifuga de 12 ml (pesado previamente). El aceite se calentó hasta 97⁰C en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y se centrifugó inmediatamente a diferentes fuerzas de centrifugado
20 relativas (500, 1.000, 2.500 y 5.000) durante varios tiempos (3, 6 y 10 minutos).

El aceite se decantó de la fase de goma y los tubos se drenaron durante 15 minutos y se midieron los pesos de ambas fases. La fase de aceite se analizó para fitoesteroles libres, ésteres de esteroles y ácidos grasos libres por GLC y la fase de aceite se analizó por HPTLC.

Resultados y discusión

25 Rendimiento de aceite

La figura 85 muestra el rendimiento de aceite incrementado obtenido del desgomado enzimático de aceite de soja crudo según la presente invención comparado con el control. El aceite se centrifuga a una fuerza de centrifugación relativa (rcf) creciente (500, 1.000, 2.500 y 5.000) durante 3 minutos y el rendimiento de aceite se calcula a partir de la cantidad (%) de goma en el control menos la cantidad de goma en las muestras enzimáticas.

30 Claramente, se observa que el rendimiento de aceite se incrementa en el desgomado enzimático comparado con el control y que el rendimiento de aceite se incrementa con rcf decreciente.

Efecto de la centrifugación

La cantidad de triglicéridos en las gomas y la cantidad de goma, obtenidas de muestras de aceite centrifugadas a diferentes tiempos (minutos en barras) se muestran para los lotes 3 y 4 en la Figura 86.

35 Los resultados ilustran que rcf influye en la cantidad (%) de goma obtenida por desgomado convencional (barras azules). Inicialmente, a baja rcf (500-1.000), la cantidad de goma es alta (alto contenido de triglicéridos) comparada con la

cantidad obtenida a fuerzas de centrifugación relativas de 2.500 a 5.000. El tiempo de la centrifugación (3, 6 y 10 minutos) no parece influir en la cantidad de goma, al menos no cuando se centrifuga a 5.000 rcf.

5 Si se inspecciona la goma obtenida del desgomado enzimático según la presente invención, la cantidad no parece estar influida por rcf y tiempo. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, esto puede explicarse por diferencias en la viscosidad entre las gomas obtenidas del desgomado convencional y enzimático según la presente invención. En la Figura 87, se muestran las mediciones de viscosidad, basadas en las fases de goma. La viscosidad disminuye con una velocidad de cizallamiento creciente para ambos tipos de goma, sin embargo, la viscosidad disminuye en mayor grado en las gomas obtenidas del desgomado enzimático según la presente invención.

10 Además del rendimiento de aceite incrementado, la viscosidad disminuida conseguida con la presente invención puede tener otros beneficios para un procesamiento de desgomado con agua industrial. Es probable que la capacidad de la producción pueda incrementarse.

EJEMPLO 4

Evaluación de NaOH en el desgomado con agua de aceite de soja crudo

Receta

15 Tabla 1: Muestras para ensayos de desgomado con agua

Publicación	2460-181	1	2	3	4	5	6	7	8
Aceite de soja crudo	g	100	100	100	100	100	100	100	100
K932 100 TIPU/ml	ml	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
4% disolución NaOH	ml	0	0	0,1	0,2	0,5	1	1,5	1,9
Agua Extra	ml	2,00	1,90	1,80	1,70	1,40	0,90	0,40	0,00
TIPU-K/g de aceite		0,00	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
% agua		2	2	2	2	2	2	2	2

Procedimiento de desgomado con agua en laboratorio

20 Se pesaron 100 g de aceite de soja crudo en un matraz con tapa azul de 250 ml con tapón y se calentó hasta 55⁰C. Se añadieron agua y NaOH al aceite seguido de la adición de la enzima. El aceite se homogeneizó usando un mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agitó durante 30 minutos con agitación magnética a 450 rpm. Después de 30 minutos, aproximadamente 10 ml del aceite se transfirieron a un tubo de centrifuga de 12 ml (previamente pesado). El aceite se calentó hasta 97⁰C en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos.

Resultados y discusión

Análisis del rendimiento de aceite

25 La Figura 88 muestra el rendimiento de aceite incrementado, obtenido del desgomado enzimático con KLM3' (concretamente la lípido aciltransferasa K932- algunas veces referida en la presente memoria como KLM3'- que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 68) (0,1 TIPU-K/g) y cantidad creciente de NaOH (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 y 1,9 ml de disolución al 4%). Los cálculos se basan en la cantidad de goma en el control menos la cantidad de goma en las muestras enzimáticas.

30 El incremento mayor en el rendimiento de aceite se consigue por el desgomado enzimático sin NaOH y generalmente el rendimiento de aceite incrementado (%) disminuye con cantidad creciente de NaOH. Esto puede explicarse muy probablemente por la saponificación incrementada de triglicéridos con cantidad creciente de NaOH. Sin embargo, la inspección de los triglicéridos en las muestras de goma control y enzimática (Figura 89) muestra que el contenido no es mucho mayor en las gomas tratadas con NaOH que lo observado habitualmente sin NaOH. El nivel de triglicérido en las
35 muestras enzimáticas sin NaOH es asimismo comparable con observaciones previas.

Análisis de ácidos grasos, fitoesteroles y éster de fitoesterol en el aceite

5 El contenido de fitoesteroles, ésteres de fitoesterol y ácidos grasos libres en los aceites desgomados control y enzimáticos se representa en la Figura 90. El contenido de ésteres de fitoesterol se incrementa desde 0,19% (control) hasta 0,42% (0,2 ml NaOH), cuando alcanza su máximo. Después de este punto, los ésteres de fitoesterol disminuyen hasta 0,15%. De acuerdo con esto, se observa una disminución inicial de fitoesteroles desde 0,3%-0,12%, seguido de un incremento desde 0,12-0,28%.

Los FFA se incrementan de manera similar hasta el punto de pH 6,3 (0,2 ml NaOH), lo más probablemente debido a una saponificación incrementada.

10 Los resultados ilustran claramente que la realización del desgomado con agua a pH más altos incrementa la actividad transferasa de la lípido aciltransferasa KLM3'. Incluso un ligero incremento del pH (por ejemplo, 0,1 ml NaOH) incrementa la formación de ésteres de fitoesterol aproximadamente un 50%, casi sin afectar la formación de FFA en el aceite (incremento de 0,02%). Es importante considerar el incremento en los FFA, ya que los FFA se evaporan durante la etapa de desodorización y así se consideran como pérdida de aceite.

Análisis del contenido de fosfolípidos en el aceite

15 La Tabla 2 muestra el contenido (ppm) de fosfolípidos (fosfatidil-etanolamina y ácido fosfatídico) en los aceites (muestras control y enzimática) desgomados con cantidad creciente (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1 y 1,9 ml) de NaOH.

Tabla 2: Contenido (ppm) de fósforo de PA, PE, PC y fósforo total en los aceites desgomados con cantidad creciente (0, 0,1, 0,2, 0,5, 1, 1,5 y 1,9 ml) de disolución de NaOH al 4%.

	Muestra							
pH	5,3	5,9	6,3	6,6	7,4	7,8	8,2	8,3
KLM3' (TIPU-K/g)	0	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
NaOH (ml)	0	0	0,1	0,2	0,5	1	1,5	1,9
PA	34,0	33,8	35,3	38,4	36,8	36,7	34,8	38,8
PE	6,8	5,9	5,0	5,6	4,9	4,0	5,0	4,6
PC	1,9	0,8	0	0	0	0,7	2,8	0,9
Contenido de fósforo total	42,8	40,6	40,2	44,1	41,8	41,5	42,6	44,3

20 La mayor reducción (40,2 ppm) de fósforo se observa en los aceites, desgomados con 0,1 ml NaOH (pH 6,3), sin embargo, un contenido comparable se obtiene bajo condiciones normales de desgomado (0 ml NaOH). Por lo tanto, parece que incrementar el pH 1,0 unidad afecta la actividad hidrolítica de KLM3'. A pH mayores de 6,3 (>0,2 ml NaOH), se observa una degradación reducida de fosfolípidos comparada con las condiciones enzimáticas "normales".

Análisis del contenido de fosfolípidos en la goma

25 La Figura 91 muestra la degradación relativa de ácido fosfatídico (PA), fosfatidil-etanolamina (PE), fosfatidilcolina y fosfatidilinositol (PI) en muestras de goma enzimáticas comparada con el control. La degradación de fosfolípidos en el control se ajusta a 100% y el contenido en las muestras enzimáticas se calcula respecto al control.

30 La degradación de fosfolípidos en las muestras enzimáticas con 0, 0,1 y 0,2 ml de NaOH es análoga. Por lo tanto, aplicando NaOH en cantidades menores de 0,2 ml no perjudica la degradación de los fosfolípidos comparado con el desgomado enzimático sólo con KLM3'. Por el contrario, se observa una degradación reducida en los aceites con NaOH aplicado en cantidades mayores (0,5, 1 y 1,9 ml).

CONCLUSIÓN

El incremento del pH con NaOH en el desgomado con agua de aceite de soja crudo resultó, como se esperaba, en un incremento de la actividad de KLM3'. La formación de ésteres de fitoesterol se incrementó concurrente con cantidades crecientes de NaOH. El máximo nivel de éster de fitoesterol (0,42%) se obtuvo a pH 6,3 (0,2 ml NaOH), después de lo cual siguió una disminución continua. Se observó un patrón similar para los FFA en el aceite, que se incrementaron desde 0,46% en el control hasta 0,60% en los aceites desgomados con 0,2 ml NaOH, después de lo cual disminuyó.

Cantidades pequeñas de NaOH no afectaron la actividad hidrolítica de KLM3', como se observa a partir de niveles comparables de fosfolípidos en los aceites, desgomados con 0 y 0,1 ml NaOH. La degradación de los fosfolípidos en la fase de goma se redujo comparada con el desgomado enzimático normal (KLM3' solo) a pH por encima de 7,5 (>0,5 ml NaOH).

El incremento más alto en el rendimiento de aceite se consiguió por el desgomado enzimático sin NaOH y generalmente el % de rendimiento de aceite incrementado disminuyó con cantidades crecientes de NaOH.

La conclusión del presente experimento es que pequeñas cantidades de NaOH pueden ser ventajosas para la formación de ésteres de fitoesterol en el desgomado con agua, sin embargo, el NaOH no contribuye positivamente al rendimiento de aceite y degradación de fosfolípidos.

EJEMPLO 5

Análisis de la fase de goma de desgomado con agua enzimático- Análisis por microscopía y rayos X**Receta**

		1	2
Aceite de Soja Crudo Solae	g	100	100
K932 100 TIPU-K/ml	ml	0	0.20
Agua Extra	ml	2,00	1,80
TIPU-K/g de aceite		0,00	0,20
% agua		2	2

20 **Procedimiento de desgomado con agua en laboratorio**

Se pesaron 100 g de aceite de soja crudo en un matraz con tapa azul de 250 ml con tapón y se calentó hasta 55⁰C. Se añadió agua al aceite seguido de adición de enzima. El aceite se homogeneizó usando un mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agitó durante 30 minutos con agitación magnética a 450 rpm. Después de 30 minutos, el aceite se centrifugó (2.000 rcf durante 3 minutos). La fase de goma se recogió para análisis por microscopía y rayos X.

25 **Resultados y discusión***Análisis por microscopía/rayos X*

Las gomas de ensayos de desgomado con agua control y enzimáticos (el último según la presente invención) se recogieron para análisis por microscopía y rayos X. Las fases de goma se estudiaron en el microscopio (luz polarizada plana) a diferentes temperaturas (25, 35, 45, 55 y 65⁰C). A todas las temperaturas, la goma estaba en una fase lamelar (bicapas lipídicas separadas por capas de agua), como se observa para la muestra control y enzimática (25⁰C) en la Figura 92.

Aparecen algunas diferencias entre la muestra control y enzimática. La goma control parece más rugosa que la muestra de goma enzimática según la presente invención. Las diferencias entre la muestra control y enzimática también pueden observarse a partir de los análisis por rayos X, como se observa en la Figura 93.

El espaciamiento mayor de aproximadamente 20 Å en el control comparado con la muestra tratada con enzima corresponde a la longitud de una cadena de ácido graso (C18). El espaciamiento expresa la capa de agua y fosfolípido, por lo tanto, el mayor espaciamiento en el control podría explicar que el control contiene una monocapa extra de ácidos grasos o que se absorbe más agua en la fase de goma.

EJEMPLO 6

Estudio de sedimentación

Receta

		1	2
Aceite de Soja Crudo Solae	g	200	200
K932 100 TIPU-K/ml	ml	0	0,4
Agua Extra	ml	4,00	3,60
TIPU-K/g de aceite		0,00	0,20
% agua		2	2

5 **Procedimiento**

Se pesaron 200 g de aceite de soja crudo en un matraz con tapa azul de 250 ml con tapón y se calentó hasta 55⁰C. Se añadió agua al aceite seguido de adición de enzima. El aceite se homogeneizó usando un mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agitó durante 30 minutos con agitación magnética a 450 rpm. Después de 30 minutos, las muestras se pusieron en embudos de separación. Las fotografías de la fase de goma se hicieron después de 1, 3 y 6 días. Después del día seis, las gomas se recogieron para análisis por microscopía.

Resultados

Fotografías de las fases de goma/microscopía

En la Figura 94 se puede observar la fase de aceite y de goma para la muestra control y enzimática. La sedimentación por gravedad se llevó a cabo durante 3 días. Existen diferencias claras entre la muestra control y enzimática, como se observa tanto en la fase de aceite como de goma.

La fase de aceite del aceite tratado enzimáticamente (es decir, tratado según la presente invención) es más transparente que el control y se observa una cantidad disminuida de goma comparado con el control. Los resultados pueden explicarse a partir de los análisis por microscopía (Figura 95). La goma tratada enzimáticamente se observa como una emulsión, mientras que la goma control está en fase lamelar.

20 **EJEMPLO 7**

Evaluación de cantidades variadas de agua en el desgomado enzimático de aceite de soja crudo

Recetas

Publicación 2460-165		1	2	3	4	5	6	7	8
Aceite de Soja Crudo Solae	G	100	100	100	100	100	100	100	100
K932 100 TIPU-K/ml	MI	0	0,2	0	0,2	0	0,2	0	0,2
Agua Extra	MI	1,00	0,800	1,50	1,30	2,00	1,80	2,50	2,30
Actividad KLM3' (TIPU-K/g de aceite)		0,00	0,20	0,00	0,20	0,00	0,20	0,00	0,20
% agua		1	1	1,5	1,5	2	2	2,5	2,5

Publicación 2460-169		1	2	3	4	5	6
Aceite de Soja Crudo Solae	g	100	100	100	100	100	100
K932 100 TIPU-K/ml	ml				0,2	0,2	0,2
Agua Extra	ml	1,00	1,50	2,00	0,80	1,30	1,80
Actividad KLM3' (TIPU-K/g de aceite)					0,20	0,20	0,20
% agua		1	1,5	2	1	1,5	2

Publicación 2460-170		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aceite de Soja Crudo Solae	g	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
K932 100 TIPU-K/ml	ml	0	0	0	0	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Agua Extra	ml	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	0,80	1,05	1,30	1,55	1,80
Actividad KLM3' (TIPU-K/g de aceite)		0,00	0,00	0,00	0,00	0	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
% agua		1,00	1,25	1,50	1,75	2,00	1,00	1,25	1,50	1,75	2,00

Procedimiento de desgomado con agua en laboratorio

5 Se pesaron 100 g de aceite de soja crudo en un matraz con tapa azul de 250 ml con tapón y se calentó hasta 55°C. Se añadió agua al aceite seguido de adición de enzima. El aceite se homogeneizó usando un mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agitó durante 30 minutos con agitación magnética a 450 rpm. Después de 30 minutos, se transfirieron aproximadamente 10 ml de aceite a un tubo de centrifuga de 12 ml (previamente pesado). El aceite se calentó hasta 97°C en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Los tubos se centrifugaron a 300 rcf durante 3 minutos. El aceite se decantó de la fase de goma y se drenó durante 15 minutos dando la vuelta al tubo. Tomando como base el peso de la fase de goma se calculó el rendimiento de aceite.

Resultados y discusión

Rendimiento de aceite

15 La Figura 96 muestra el rendimiento de aceite incrementado obtenido a partir de desgomado con agua enzimático de aceite de soja crudo con cantidades variadas de agua. El rendimiento de aceite incrementado se calcula a partir de la cantidad de goma en el control menos la cantidad de goma en las muestras enzimáticas.

El desgomado enzimático contribuye a un rendimiento de aceite incrementado comparado con el control y parece que el rendimiento de aceite se incrementa con cantidades decrecientes de agua. El rendimiento de aceite se incrementa aproximadamente 50% en el desgomado enzimático comparado con el control, cuando el agua se reduce de 2 a 1%.

20 Estos cálculos se basan en la cantidad de goma y por lo tanto también incluyen el contenido de triglicéridos en la fase de goma. Inspeccionando la pérdida real de aceite (tomando como base la cantidad de goma y contenido de triglicéridos en la goma) (Figura 97), la pérdida de aceite disminuye en el control con contenidos crecientes de agua. Sin embargo, en el desgomado enzimático, la pérdida de aceite no se ve afectada en cierto modo por la cantidad de agua. Aproximadamente el 2% de aceite se pierde en el desgomado enzimático comparado con 3,5-6,5% en el control.

25 La cantidad disminuida de agua en el desgomado con agua enzimático puede ser una ventaja económica para la industria (menos agua en el proceso) y también lo más probablemente respecto a ahorros energéticos durante el secado de la fase de goma.

Degradación de fosfolípidos en la fase de goma

La degradación relativa (%) de ácido fosfatídico (PA) y fosfatidiletanolamina (PE) en las fases de goma enzimáticas respecto al control se muestra en la Figura 98.

La degradación de fosfolípidos con KLM3' parece ser más pronunciada a concentraciones menores de agua. Globalmente, el desgomado enzimático con KLM3' y 1% agua parece ser una ventaja respecto a la degradación de fosfolípidos comparado con el desgomado con 2% agua.

Mediciones de viscosidad de la fase de goma

5 La viscosidad de las fases de goma enzimáticas (KLM3' 0,2 TIPU-K/g), del desgomado con diferentes cantidades de agua se muestra en la Figura 99. La viscosidad no se ve influida de manera importante por el diferente contenido de agua. A una velocidad de cizallamiento baja (hasta aproximadamente 10) la viscosidad es similar en cierto modo para todas las muestras, sin embargo, después de este punto, la viscosidad de las muestras con la menor cantidad (1,25%) de agua se incrementa, mientras se incrementa la mayor cantidad de agua (2%) de las muestras de goma.

10 **EJEMPLO 8**

Desgomado con agua de Aceite de Maíz crudo

RESUMEN

15 La lípido aciltransferasa, KLM3' (algunas veces referida como K932 y que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 68) se ensayó en un aceite de maíz crudo con el objetivo de estudiar los efectos en el rendimiento de aceite en el desgomado con agua de este aceite.

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzima:

KLM3' K932. 1.128 TIPU/g

Aceite:

20 Aceite de maíz crudo de Cargill, mayo 2008

Procedimiento de desgomado:

Se pesaron 100 g de aceite de maíz crudo en un matraz con tapa azul de 250 ml con tapón y se calentó hasta 55⁰C.

Se añadieron el agua y la enzima y el aceite se homogeneizó con un mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agitó durante 30 minutos con agitación magnética a 450 rpm.

25 Después de 30 minutos, se transfirieron 10 ml de aceite a un tubo de centrifuga alquitranado de 12 ml y el peso del aceite se registró. El aceite se calentó hasta 97⁰C en un baño con agua hirviendo durante 10 minutos y se centrifugó inmediatamente a 3.000 rcf durante 3 minutos.

El aceite se decantó de la fase de goma y se drenó durante 15 minutos dando la vuelta al tubo. Tomando como base el peso de la fase de goma el rendimiento de aceite se calculó respecto a un aceite no tratado con enzima.

30 La fase de goma se analizó por HPTLC y se calculó la degradación de los fosfolípidos en la fase de goma.

Resultados

El proceso de desgomado del aceite se realizó con diferentes concentraciones de KLM3'

Tabla 1. Receta para el desgomado de Aceite de Maíz Crudo

2460-182		1	2	3	4	5
Aceite de Maíz Crudo	g	100	100	100	100	100
K932 100 TIPU-K/ml	ml	0	0,050	0,10	0,20	0,50
Agua Extra	ml	2,00	1,95	1,90	1,80	1,50
TIPU/g de aceite		0,00	0,05	0,10	0,20	0,50
% agua		2	2	2	2	2

Las muestras se trataron como se describe en "procedimiento de desgomado" y la cantidad de goma húmeda se determinó en duplicado con los resultados mostrados a continuación.

Tabla 2 Fase de Goma, % de desgomado con agua de aceite de maíz crudo

Muestra	Enzima, Unidades/g	Fase de Goma	Incremento del rendimiento
1	0	6,0	0,00
2	0,05	5,7	0,28
3	0,1	5,5	0,44
4	0,2	5,6	0,36
5	0,5	5,6	0,38

5 A partir de los resultados de la tabla 2, se observa que KLM3' contribuye a una disminución de la cantidad de la fase de goma por el desgomado con agua de aceite de maíz crudo. La cantidad reducida de la fase de goma corresponde a un incremento en la fase de aceite de 0,28 a 0,44%.

La fase de goma aislada del desgomado con agua del aceite de maíz crudo se analizó por TLC y la reducción de fosfatidiletanolamina y ácido fosfatídico se calculó respecto a la cantidad en la goma sin tratamiento con enzima (Tabla 3).

10 Tabla 3: Análisis por TLC de la Fase de goma. PE= fosfatidiletanolamina, PA= Ácido fosfatídico

Dosificación de la enzima TIPU/g de aceite	PA % Relativo	PE % Relativo
0	100	100
0,05	88	85
0,1	73	68
0,2	75	72
0,5	72	64

Los resultados de la tabla 3 indican la actividad de KLM3' en los fosfolípidos de aceite de maíz crudo. Se observa una actividad enzimática incrementada hasta la dosificación de 0,1 TIPU/g de aceite. A dosificaciones de enzima superiores, la actividad en los niveles de fosfolípidos desaparece.

EJEMPLO 9

15 Desgomado con agua de Aceite de Soja crudo y adición de aceptores.

La lípido aciltransferasa, KLM3', se ensayó en un aceite de soja crudo de Solae con el objetivo de estudiar los efectos de la adición de sustrato aceptor para la enzima KLM3'.

En este estudio, se ensayó un producto fitoesterol General 122 de Henkel, Alemania y un alcohol graso, laurilalcohol.

20 La adición de fitoesterol al aceite produjo más éster de estero concomitante con una reducción de la formación de ácidos grasos libres. Se concluye que se puede conseguir un mayor grado de conversión de fosfolípidos sin una producción de ácidos grasos incrementada cuando está disponible más sustrato aceptor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzima:

KLM3' K932 (que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 68- 1.128 TIPU/g

25 Fitoesterol de soja: General 122 N, de Grünau, Illertissen, Alemania. Laurilalcohol: Sigma L-5375.

Aceite:

Aceite de Soja Crudo de Solae, enero 2008

Estándar de Mezcla de Lecitina de Soja (ST16) de Spectra Lipid, Alemania.

Procedimiento de desgomado:

5 Se pesaron 100 g de aceite de soja crudo, fitoesterol y laurilalcohol en un matraz con tapa azul de 250 ml con tapón y se calentó hasta 55°C. El fitoesterol se disolvió completamente en el aceite antes del procesamiento adicional.

Se añadieron el agua y la enzima y el aceite se homogeneizó con un mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agitó durante 30 minutos con agitación magnética a 450 rpm.

10 Después de 30 minutos, se transfirieron 10 ml de aceite a un tubo de centrifuga alquitranado de 12 ml y el peso del aceite se registró. El aceite se calentó hasta 97°C en un baño con agua hirviendo durante 10 minutos y se centrifugó inmediatamente a 3.000 rcf durante 3 minutos.

El aceite se decantó de la fase de goma y se drenó durante 15 minutos dando la vuelta al tubo. Tomando como base el peso de la fase de goma se calculó el rendimiento de aceite. La fase de aceite y la fase de goma se analizaron por HPTLC y se calculó la cantidad de triglicéridos en la fase de goma y la degradación de los fosfolípidos en la fase de aceite.

15 **Resultados**

El proceso de desgomado del aceite se realizó con diferentes concentraciones de KLM3', fitoesterol y alcohol graso como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Receta para el desgomado de Aceite de Soja Crudo

2460-182		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aceite de Soja Crudo, Solae d. 16-01-2008	g	100	100	100	100	100	100	100	100	100
K932 100 TIPU-K/ml	ml	0	0,20	0,20	0,20	0,2	0,2	1	1	0,2
Generol 122 N	g		0	0,25	0,50	0,75	0,75		0,75	
4% NaOH	ml						0,2			
2460-182		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Lauril alcohol	g									0,5
Agua Extra	ml	2,00	1,80	1,80	1,80	1,80	1,80	1,00	1,00	1,80
pH		4,90	5,65	5,55	5,48	5,41	6,18	5,29	5,27	5,57
TIPU/g de aceite		0,00	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	1,00	1,00	0,20
% agua		2	2	2	2	2	2	2	2	2

20 Las muestras se trataron como se ha descrito en el "procedimiento de desgomado" y la cantidad de goma húmeda se determinó en duplicado con los resultados mostrados en la Figura 100.

25 La adición de una cantidad creciente de fitoesterol no contribuyó a ninguna disminución en el % de goma, y el ajuste de pH (ensayo 6) no tuvo ningún efecto significativo en la cantidad de goma aunque hay una tendencia a más goma en este ensayo. La adición de 0,2 TIPU/g de KLM3' tuvo un efecto significativo en el contenido de goma y se mostró que un incremento a 1 TIPU/g disminuyó más la cantidad de goma. El lauril alcohol no tuvo ningún efecto en la cantidad de goma.

La fase de aceite separada de la goma se analizó para ácidos grasos libres, esteroides y ésteres de esterol por GLC.

Los resultados en la tabla 2 indican un incremento de 0,09% de ácido graso libre por tratamiento enzimático con 0,2 TIPU/g (muestra 2) pero se observa que la muestra 3 a 5 con nivel incrementado de fitoesteroides contiene menos ácidos grasos libres. También en las muestras 7 y 8 tratadas con 1 TIPU/g se observa una reducción en los ácidos grasos libres

cuando se añade más esteroles al aceite. Estos resultados indican que la reacción hidrolítica disminuye con una cantidad incrementada de esteroides en el aceite.

Entonces debería esperarse que la cantidad de éster de esteroles se incremente con esteroles incrementados en el aceite. Esto también se observa para la muestra 3, pero con cantidad incrementada de esteroides (muestras 4 y 5), la cantidad de ésteres de esteroles no cambia. Se observa incluso una tendencia a una cantidad disminuida de éster de esteroles en la muestra 5, pero esto está dentro del error experimental. El ajuste del pH por la adición de NaOH, sin embargo, tiene un efecto fuerte en la formación de ésteres de esteroles como se ha observado anteriormente. Una cantidad incrementada de enzima (muestras 7 y 8) también contribuye a un incremento en la formación de ésteres de esteroles.

Tabla 2. Análisis por GLC de la fase de aceite del desgomado con agua de muestras (véase la tabla 1)

Muestra	Ácidos grasos libres, %	Esteroides, %	Éster de esteroles, %
1	0,46	0,30	0,20
2	0,55	0,15	0,40
3	0,54	0,36	0,45
4	0,52	0,60	0,40
5	0,50	0,83	0,38
6	0,55	0,69	0,63
7	0,86	0,12	0,47
8	0,80	0,65	0,64
9	0,53	0,20	0,39

La fase de goma aislada del desgomado con agua de las muestras (tabla 1) se analizó por HPTLC y la degradación de determinados fosfolípidos fosfatidiletanolamina (PE) y ácido fosfatídico (PA) se cuantificó respecto a la muestra control no 1. (Figura 101).

Los resultados en la Figura 101 indican una degradación incrementada de PA y PE cuando se añade 0,25% esteroles.

15 Pero la dosificación incrementada (0,5 y 0,75% esteroles) no contribuye a una degradación adicional de fosfolípidos. Esto está de acuerdo con la observación acerca del efecto en la formación de ésteres de esteroles (véase la tabla 2). El ajuste del pH con NaOH también tiene un efecto fuerte en la degradación de fosfolípidos, pero esto está relacionado con más actividad enzimática con pH incrementado.

20 También se observa que el incremento de la dosificación de enzima hasta 1 TIPU/g degrada adicionalmente los fosfolípidos.

La fase de aceite aislada del desgomado con agua se analizó por ICP con el objetivo de analizar la cantidad de fósforo residual en el aceite.

25 Los resultados en la Figura 102 indican que el nivel de fósforo en el aceite no depende mucho de la cantidad de esteroles en el aceite, pero los resultados indican que una dosificación de enzima incrementada (1 TIPU/g) tiene un efecto en el nivel de fósforo. La adición de laurilalcohol (alcohol C12) tiene un efecto negativo en el nivel de fósforo en la fase de aceite.

Conclusión.

30 La adición de lípido aciltransferasa KLM3' al aceite crudo cataliza la transferencia del resto de ácido graso desde el fosfolípido al esteroles durante la formación de ésteres de esteroles. A nivel molecular, la cantidad de esteroles es menor de 1/3 de la cantidad de fosfolípidos en el aceite de soja crudo. Debido a que el esteroles aceptor de acilo es el factor limitante para KLM3' en el aceite de soja crudo, la reacción de hidrólisis podría ocurrir dependiendo de la dosificación de enzima y el tiempo de reacción.

En este estudio, se encontró que la adición de más esteroles al aceite crudo producirá más éster de esteroles, cuando el aceite se trata con la lipasa KLM3' y la cantidad de ácidos grasos libres formados se reduce comparado con un aceite al que no se ha añadido esteroles.

- 5 La adición de esteroles extra no tiene mucho impacto en el nivel de fósforo en la fase de aceite después del desgomado con agua, pero se observa que una dosificación incrementada de KLM3' reduce el nivel de fósforo en la fase de aceite. La adición de 0,5% laurilalcohol no tuvo mucho efecto en el nivel de ácidos grasos libres y no se observó éster de laurilalcohol por en el análisis por GLC.

Ejemplo 10

Combinación de una lipasa y una fosfolipasa C

10 MATERIALES Y MÉTODOS

Enzima:

Lipasa KLM3' K932. 1.128 LATU/g (que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la presente memoria como SEQ ID No. 68)

Fosfolipasa C, Sigma P7633 15 Unidades/mg

15 Aceite:

Aceite de Soja Crudo de Solae, Aarhus, DK

Procedimiento de desgomado

- 20 Se pesaron 100 g de aceite de soja crudo en un matraz con tapa azul de 250 ml con tapón y se calentó hasta 55°C. Se añaden 14 ml de ácido cítrico monohidrato al 50%. El aceite se homogeneiza con un mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agita durante 15 minutos con agitación magnética a 450 rpm. Se añaden 0,367 ml de 1 N NaOH seguido de 2,5% agua y 5 Unidades/g de Fosfolipasa C. El aceite se homogeneiza de nuevo con mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agita a 450 rpm con un agitador magnético. Después de 2 horas de tiempo de reacción, se añaden 0,2 LATU/g de aceite de enzima Lipasa KLM3' y la reacción se continúa durante una hora más con agitación.

- 25 El aceite se calienta hasta 97°C en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos y se centrifuga inmediatamente a 3.000 rcf durante 3 minutos.

La fase de aceite se decanta de la fase de goma. Se mide el peso de la fase de goma y la fase de aceite.

La fase de aceite se analiza para fosfolípidos residuales por TLC y las ppm de fósforo se analizan por ICP. El esteroles libre, ésteres de esteroles y ácidos grasos libres y diglicérido se analizan por GLC.

La fase de goma se analiza para triglicéridos, diglicéridos, fosfolípidos residuales y ácidos grasos libres.

- 30 La degradación de los fosfolípidos en la fase de goma se analiza por TLC.

Resultados

El proceso de desgomado con una combinación de lipasa y fosfolipasa C se espera que incremente el rendimiento de aceite más del 2% comparado con un aceite sin tratamiento con enzima. Los estudios iniciales sugieren que se ha producido diglicérido en la fase de aceite en la muestra tratada con enzima.

- 35 En la fase de aceite después de la centrifugación una parte principal de los esteroides estará esterificada.

Las investigaciones preliminares muestran que el nivel de fósforo está por debajo de 5 ppm en la fase de aceite y una degradación fuerte de los fosfolípidos en la fase de goma (es decir, Fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) desapareciendo casi completamente y una degradación fuerte de fosfatidilinositol (PI) y ácido fosfatídico (PA)).

40

Ejemplo 11

Lípido aciltransferasa en combinación con Fosfolipasa C

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzima:

5 Lípido aciltransferasa KLM3' K932. 1.128 LATU/g

Fosfolipasa C Sigma P7633 15 Unidades/mg

Aceite:

Aceite de Soja Crudo de Solae, Aarhus, DK

Procedimiento de desgomado

10 Se pesaron 100 g de aceite de soja crudo en un matraz con tapa azul de 250 ml con tapón y se calentó hasta 55°C.

Se añade 3% agua seguido de 0,1 Unidades/g de aceite de Aciltransferasa KLM3' y 5 Unidades de Fosfolipasa C. El aceite se homogeneiza con un mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agita durante 30 minutos con agitación magnética a 450 rpm.

15 Después de 30 minutos, se transfieren 10 ml de aceite a un tubo de centrifuga alquitranado de 12 ml y el peso del aceite se registra. El aceite se calienta hasta 97°C en un baño con agua hirviendo durante 10 minutos y se centrifuga inmediatamente a 3.000 rcf durante 3 minutos.

La fase de aceite se decanta de la fase de goma y se drena durante 15 minutos dando la vuelta al tubo. Tomando como base el peso de la fase de goma se calcula el rendimiento de aceite. La fase de aceite se analiza para fosfolípidos residuales por TLC e ICP. El esteroles libres, ésteres de esteroles, ácidos grasos libres y diglicérido se analizan por GLC.

20 La fase de goma se analiza para triglicéridos, fosfolípidos residuales y ácidos grasos libres.

Resultados

25 Las investigaciones preliminares sugieren que el proceso de desgomado con agua con una combinación de Lípido aciltransferasa y fosfolipasa C resulta en un incremento significativo del rendimiento de aceite con más del 2% comparado con un aceite sin tratamiento con enzima. Los estudios iniciales muestran que se produce diglicérido en la fase de aceite y una parte principal de los esteroides en la fase de aceite está esterificada.

Ejemplo 12

Desgomado enzimático con lípido aciltransferasa KLM3 y Fosfolipasa C (PLC)

MATERIALES Y MÉTODOS

Enzima:

30 Lípido aciltransferasa KLM3' K932. 1.128 LATU/g

Fosfolipasa C Sigma P7633 15 Unidades/mg

Aceite:

Aceite de Soja Crudo de Solae, Aarhus, DK

Procedimiento de desgomado

35 Se pesaron 100 g de aceite de soja crudo en un matraz con tapa azul de 250 ml con tapón y se calentó hasta 55°C.

Se añade 3% agua seguido de 5 Unidades/g de aceite de Fosfolipasa C. El pH se ajusta a 5,5 con NaOH. El aceite se homogeneiza con un mezclador Ultra Turrax durante 30 segundos y se agita durante 15 minutos con agitación magnética a 450 rpm. Después de 15 minutos, se toma una muestra y se añaden 0,1 Unidades/g de aceite de Aciltransferasa. El aceite se agita durante 15 minutos más a 55°C.

Después de 2x15 minutos de tiempo de reacción, se transfieren 10 ml de aceite a un tubo de centrífuga alquitranado de 12 ml y el peso del aceite se registra. El aceite se calienta hasta 97°C en un baño con agua hirviendo durante 10 minutos y se centrifuga inmediatamente a 3.000 rcf durante 3 minutos.

5 El aceite se decanta de la fase de goma y se drena durante 15 minutos dando la vuelta al tubo. Tomando como base el peso de la fase de goma se calcula el rendimiento de aceite.

La fase de aceite se analiza para fosfolípidos residuales por TLC e ICP. El esteroles libres, ésteres de esteroles, ácidos grasos libres y diglicérido se analizan por GLC.

La fase de goma se analiza para triglicéridos, fosfolípidos residuales y ácidos grasos libres.

Resultados

10 Los estudios iniciales sugieren que el proceso de desgomado con agua usando una combinación de Lípido aciltransferasa y fosfolipasa C incrementa el rendimiento de aceite más de un 2,5% comparado con un aceite sin tratamiento con enzima. Las investigaciones preliminares sugieren que se ha producido diglicérido después de 15 minutos en la fase de aceite.

Una parte principal de los esteroides en la fase de aceite estará esterificada.

15 Las investigaciones preliminares muestran que después de 15 minutos, una parte principal de la fosfatidiletanolamina (PE) y de la fosfatidilcolina (PC) ha desaparecido pero puede observarse una menor actividad en fosfatidilinositol (PI) y ácido fosfatídico (PA). En la muestra después de 30 minutos y centrifugación también una parte principal de PI y PA habrá desaparecido.

Ejemplo 13

20 Desgomado enzimático con lípido aciltransferasa KLM3 y Fosfolipasa C (PLC)

La Lípido Aciltransferasa KLM3' y la Fosfolipasa C (PLC) de Sigma se ensayaron solas y en combinaciones en el desgomado con agua de aceite de soja crudo. La Fosfolipasa C en el desgomado del aceite produjo diglicérido a partir de los fosfolípidos en el aceite. Se mostró sorprendentemente que KLM3' puede usar el diglicérido como una molécula aceptora durante la producción de triglicérido. Los experimentos modelo con sustrato que contiene diglicérido y fosfatidilcolina confirmaron que la lípido aciltransferasa (KLM3') cataliza una reacción de transferencia del resto de ácido graso desde el fosfolípido al diglicérido durante la producción de triglicérido.

25

RELEVANCIA COMERCIAL DE LOS RESULTADOS

Este estudio se inició con el objetivo de mostrar que la combinación de KLM3' y Fosfolipasa C (PLC) es altamente ventajosa en el desgomado de aceites vegetales crudos.

30 Una fosfolipasa C de Verenium, EEUU (concretamente Purifine®) se ha introducido para uso en el desgomado de aceites (WO 2008/036863).

Esta enzima es activa en fosfolípidos (tales como fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) en aceite crudo formando diglicérido (diacilglicerol) y fosfo-colina, -etanolamina, -inositol o -ácido. El diglicérido producido durante este proceso formará parte del aceite durante el proceso de desgomado del aceite y así contribuye a un rendimiento de aceite mejorado.

35

Los inventores han mostrado que las lípido aciltransferasas (tales como KLM3') pueden contribuir a un rendimiento mejorado en el desgomado del aceite mediante la modificación de los fosfolípidos concomitante con la formación de éster de esteroles.

40 Las lípido aciltransferasas (tales como KLM3') pueden usar esteroides como un aceptor de acilo así como otros aceptores como alcoholes incluyendo alcoholes grasos.

El objetivo del presente estudio fue investigar cualquier efecto sinérgico cuando una lípido aciltransferasa (por ejemplo, KLM3') se usaba en combinación con una fosfolipasa C.

Material y Métodos:

45 • KLM3': Glicerofosfolípido colesterol aciltransferasa (FoodPro LysoMax • Aceite) (K932) (SEQ ID No. 68) Lote no 102629600. Actividad 1.128 LATU/g

- Fosfolipasa C P7633 Sigma, de *Clostridium perfringens*, 135,3 mg sólido:3,8 unidades/mg de sólido, 13,2 unidades/mg de proteína
- Fosfolipasa C P6621 Sigma, de *Bacillus cereus*, 250 Unidades

Diglicérido. Diglicérido destilado de aceite de girasol, Publicación 2641/064 Fosfatidilcolina, Avanti #441601

5 Mono-di-triglicérido: GRINDSTED® MONO-DI R 50/D

Aceite de soja crudo no 18 de Argentina

Análisis por HPTLC

La degradación de los fosfolípidos en la fase de goma de las muestras tratadas con enzima se analizó por HPTLC. Aplicador: Muestreador Automático de TLC 4, CAMAG

10 Placa de HPTLC: 20 x 10 cm, Merck no. 1.05641. Activada 10 minutos a 160°C antes del uso.

Aplicación:

La fase de goma de 10 gramos de aceite se disolvió en 7,5 ml de Hexano:Isopropanol 3:2.

1 µ de la muestra se aplicó en la placa de HPTLC.

15 Se aplicó un estándar de fosfolípido (0,5% fosfolípido (Spectra Lipid, Alemania) (0,1, 0,3, 0,5, 0,8 y 1,5 µl) y se usó para el cálculo de los fosfolípidos individuales en la goma.

En algunas aplicaciones el contenido de fosfolípidos se calculó respecto a una goma control no tratada con enzima. Esta muestra control se aplicó 0,1-0,3-0,5-0,8-1 µl y se usó para hacer las curvas de calibración.

Fase de aceite. Aproximadamente 90 mg se pesaron y se disolvieron en 1 ml de Hexano:Isopropanol 3:2.

20 Se aplicaron 5 µl de la muestra en la placa de HPTLC. Se aplicó mono-diglicérido 5 mg/ml de concentración conocida a 0,1-0,3-0,5-0,8-1,5 µl y se usó para el cálculo de los componentes glicérido individuales.

Aplicador de TLC.

Tampón de corrida no. 1: P-éter:Metil Terc Butil Cetona:Ácido acético 50:50:1

Tampón de corrida no. 6: Cloroformo:1-propanol:Metilacetato:Metanol:0,25% KCl en agua 25:25:25:10:9

Elución: La placa se eluyó 7 cm usando una Cámara de Revelado Automático ADC2 de Camag.

25 Revelado:

La placa se secó en un Calentador de Placas de TLC III de Camag durante 6 minutos a 160°C, se enfrió y se sumergió en 6% acetato de cobre en 16% H₃PO₄. Se secó adicionalmente 10 minutos a 160°C y se evaluó directamente.

La densidad de los componentes en la placa de TLC se analizó con un Escáner de TLC 3 de Camag.

Cromatografía de gases

30 Los ácidos grasos libres en la fase de goma se analizaron por GLC.

El mono-di-triglicérido, esteroles y ésteres de esteroles de la fase de aceite también se analizaron por GLC.

Aparato:

- Cromatógrafo de Gases Capilar Autosystem 9000 de Perkin Elmer equipado con una columna de sílice fusionada WCOT 12,5 m x 0,25 mm ID x 0,1 µm espesor de la película 5% fenil-metil-silicona (CP Sil 8 CB de Chrompack).
- Gas transportador: Helio.
- Inyector: Inyección split en frío PSSI (temp inicial 50°C calentado hasta 385°C), volumen 1,0 µl.
- Detector FID: 395°C

Programa del horno (usado desde 30.10.2003):	1	2	3
Temperatura del horno, °C.	90	280	350
Isotermal, tiempo, min.	1	0	10
Velocidad de la temperatura, °C/min.	15	4	

5 Preparación de la muestra:

La muestra se disolvió en 12 ml de Heptano:Piridina 2:1, que contiene el estándar interno heptadecano, 0,5 mg/ml. Se transfirieron 500 µl de disolución de la muestra a un vial con tapón de goma, se añadieron 100 µl de MSTFA (N-Metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) y se hizo reaccionar durante 15 minutos a 60°C.

Cálculo:

10 Los factores de respuesta para esterol, éster de esterol, ácidos grasos libres, mono, di y triglicérido se determinaron tomando como base material de referencia puro.

Experimental:

La aciltransferasa KLM3' y PLC se ensayaron en un proceso de desgomado con agua usando aceite de soja crudo con las recetas mostradas en la Tabla 1

15 Tabla 1

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Aceite de soja crudo de Argentina n	g	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Fosfolipasa C P7633	ml		0,2	0,2	0,2					
Fosfolipasa C P6621								0,2	0,2	0,2
K932 10 U/ml	ml			0,01	0,05	0,01	0,05		0,01	0,05
Agua	ml	0,250	0,050	0,040	0,000	0,240	0,200	0,050	0,040	0,000
% agua		2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50

Fosfolipasa C P7633 Sigma, De *C. perfringens*, 135,3 mg sólido:3,8 unidades/mg de sólido, 32,9 mg de enzima en 0,5 ml de agua

Fosfolipasa C P6621 Sigma, De *Bacillus cereus*, 250 Unidades disueltas en 1 ml de agua

20 Aciltransferasa KLM3' (K932) diluida hasta 10 LATU/ml

El aceite de soja crudo se calentó hasta 45°C en un vaso Wheaton de 20 ml. Se añadió agua y enzima.

La muestra se homogeneizó por cizallamiento alto mezclando durante 30 segundos.

25 Las muestras se pusieron en un bloque calefactor a 45°C con agitación magnética. Se tomaron muestras de 1 ml después de 30 y 240 minutos en un tubo Eppendorf y las enzimas se inactivaron durante 10 minutos a 97°C. De forma importante, aunque se realiza la inactivación de la enzima en los experimentos- esto no se hace generalmente en la práctica en la industria. La inactivación sólo se realiza en los experimentos en la presente memoria por lo que es un análisis exacto de la degradación de la enzima.

Las muestras se centrifugaron 3.000 rcf durante 3 minutos. La fase de aceite se separó de la fase de goma y ambas fases se analizaron por TLC y GLC.

30

Resultados

Análisis por TLC

Las muestras tomadas después de 30 minutos y 240 minutos se analizaron por TLC con los resultados mostrados en las Figuras 103 a 106.

- 5 Las placas de TLC (Figura 103 y Figura 104) se escanearon y se usaron para la determinación cuantitativa de 1,2 diglicérido (DAG sn1,2) con los resultados mostrados en la Tabla 2 y 3 a continuación.

La degradación relativa de los fosfolípidos se muestra en la Figura 107.

Tabla 2: Análisis por TLC de la fase de aceite después de 30 minutos de tiempo de reacción.

Ensayo no.	Fosfolipasa C P7633 U/g	Fosfolipasa C P6621 U/g	K932 10 U/ml LATU/g	DAG sn_1,2 %
1	0	0	0	0,33
2	5	0	0	0,72
3	5	0	0,01	0,67
4	5	0	0,05	0,60
5	0	0	0,01	0,37
6	0	0	0,05	0,29
7	0	5	0	1,28
8	0	5	0,01	1,22
9	0	5	0,05	1,19

- 10 Tabla 3: Análisis por TLC de la fase de aceite después de 240 minutos de tiempo de reacción.

Ensayo no.	Fosfolipasa C P7633 U/g	Fosfolipasa C P6621 U/g	K932 LATU/g	DAG sn_1,2 %
1	0	0	0	0,27
2	5	0	0	0,64
3	5	0	0,01	0,60
4	5	0	0,05	0,50
5	0	0	0,01	0,34
6	0	0	0,05	0,27
7	0	5	0	1,06
8	0	5	0,01	1,04
9	0	5	0,05	1,01

Los resultados de las Tablas 2 y 3 anteriores indican claramente la formación de diglicérido causada por la degradación de fosfolípidos por PLC. Se observa que con la dosificación de PLC usada, la formación de sn 1,2 diglicérido ha

alcanzado su máximo después de 30 minutos de tiempo de reacción. También se observa que la cantidad de sn 1,2 diglicérido disminuye con una dosificación incrementada de KLM3' cuando se usa en combinación con PLC.

5 Este efecto se observó para ambas enzimas fosfolipasa C pero el efecto fue más pronunciado cuando KLM3' se combinó con Fosfolipasa C P7633 de Sigma, de *C. perfringens*. Esto se explica lo más probablemente por el hecho de que la PLC de *C. perfringens* sólo degradaba una pequeña parte de los fosfolípidos, de manera que estaba disponible mas sustrato para KLM3'.

10 Los resultados de la Figura 107 también muestran claramente que la Fosfolipasa C P7633 de Sigma, de *C. perfringens* es activa principalmente sobre fosfatidilcolina (PC) y la Fosfolipasa C P6621 de Sigma, de *Bacillus cereus* tiene una actividad principal sobre fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE) y menos actividad sobre el ácido fosfatídico (PA) y fosfatidilinositol (PI). Los resultados también prueban que KLM3' puede usar los cuatro tipos de fosfolípidos.

Por lo tanto, se concluye que la aciltransferasa KLM3' puede usar sn 1,2 diglicérido como una molécula aceptora y cataliza la reacción en la Figura 108.

Análisis por GLC

Las muestras no 1 a 6 de la fase de aceite del experimento en la Tabla 1 también se analizaron por GLC.

15 Los análisis por GLC de diglicérido (DAG) total, esterol, éster de esterol y FFA se listan en la Tabla 4 siguiente.

Tabla 4 Análisis por GLC de la fase de aceite después de 30 minutos y 240 minutos de incubación.

muestra no	PLC U/g	KLM3 U/g	Tiempo de Reacción minutos	DAG %	Esterol %	Éster de esterol %	FFA %
1	0	0	30	1,34	0,25	0,12	0,22
2	5	0	30	2,58	0,26	0,13	0,21
3	5	0,05	30	2,39	0,18	0,26	0,22
4	5	0,1	30	2,10	0,09	0,42	0,28
5	0	0,05	30	1,43	0,15	0,33	0,22
6	0	0,1	30	1,24	0,06	0,49	0,33
1	0	0	240	1,63	0,22	0,13	0,20
2	5	0	240	2,33	0,25	0,13	0,20
3	5	0,05	240	2,13	0,08	0,45	0,29
4	5	0,1	240	2,08	0,04	0,48	0,43
5	0	0,05	240	1,69	0,04	0,49	0,32
6	0	0,1	240	1,68	0,04	0,50	0,56

20 Los análisis por GLC de las muestras tomadas después de 30 y 240 minutos de tiempo de reacción confirmaron lo que ya se había observado por análisis de TLC, que la Fosfolipasa C P7633 de sigma, de *C. perfringens* producía diglicérido a partir de fosfolípidos en el aceite. Los resultados también confirman el efecto sinérgico por cantidad reducida de diglicérido cuando la Fosfolipasa C se combina con KLM3'. Una evaluación estadística por ANOVA usando el software Statgraphic del efecto de PLC y KLM3' en la cantidad de diglicérido indica claramente el efecto de interacción entre estas dos enzimas, véase la Figura 109.

25 La PLC no tuvo un efecto significativo en los esteroles en el aceite pero KLM3' convierte los esteroles libres en ésteres de esteroles. Los esteroles son una molécula aceptora mejor que el DAG para KLM3' y por lo tanto, sólo el 10-15% del DAG en la mezcla de reacción se convirtió en triglicérido.

La PLC no tiene mucho impacto en el nivel de ácidos grasos libres (FFA) pero se observa que KLM3' en la dosificación alta y en un tiempo de reacción amplio contribuye a un nivel incrementado de FFA.

Publicación 2460-224:

5 Sin pretender la vinculación a ninguna teoría, la disminución en diglicérido combinando aciltransferasa (KLM3') y fosfolipasa C (PLC) puede estar causada por la competición de sustrato (fosfolípido) cuando las dos enzimas se usan conjuntamente.

Con el fin de probar que KLM3' es capaz de usar diglicérido como aceptor y catalizar la reacción mencionada en la Figura 108 se realizó un experimento modelo con la receta mostrada en la Tabla 5 siguiente.

Tabla 5 Receta para la investigación del efecto aciltransferasa de KLM3' en el sustrato diglicérido/fosfatidilcolina.

		1	2	3	4	5	6
Diglicérido/PC 80/20		3	3	3	3	3	3
Aciltransferasa KLM3': 300 LATU/g	ml	0	0,01		0,01		0,01
Tampón	ml	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03
Agua 3% sal		0,01		0,01	0,01	0,01	
Tampón 1: 100 mM Acetato pH 5,5		X	X				
Tampón 2: 100 mM HEPES pH 7				X	X		
Tampón 3: 100 mM MES pH 6						X	X

10

Se mezclaron diglicérido destilado basado en aceite de girasol y fosfatidilcolina (PC) durante el calentamiento y agitación hasta 80°C hasta que la PC se disolvió en el diglicérido.

El sustrato se pesó en un Vaso Dram de 7 ml con tapón de rosca y se calentó hasta 55°C. Se añadió enzima, tampón y agua y la muestra se agitó con agitación magnética a 450 rpm.

15 Después de 30 y 180 minutos se tomó una muestra y se analizó por TLC (Figura 110).

La placa de TLC se escaneó y el contenido de triglicérido en las muestras se cuantificó a partir de una curva estándar hecha a partir del análisis de aceite de Canola con los resultados mostrados en la Tabla 6 siguiente.

Tabla 6

pH del Tampón	Enzima U/g	Tiempo de reacción minutos	Triglicérido %
5,5	0	30	1,42
5,5	1	30	1,74
6	0	30	1,63
6	1	30	1,79
7	0	30	1,49

7	1	30	1,55
5,5	0	180	1,75
5,5	1	180	1,79
6	0	180	1,76
6	1	180	1,80
7	0	180	1,67
	Enzima	Tiempo de reacción	Triglicérido
pH del Tampón	U/g	minutos	%
7	1	180	2,01

Los resultados mostrados en la Tabla 6 se analizaron estadísticamente por ANOVA usando el software Statgraphic con los resultados mostrados en las Figuras 111 y 112.

5 La evaluación estadística de los resultados de triglicérido de la Tabla 6 confirma un incremento significativo de la cantidad de triglicérido por la adición de la aciltransferasa KLM3' a un sustrato que contiene diglicérido y fosfatidilcolina.

Publicación 2460-228

El experimento mencionado anteriormente en la Tabla 5 se estudió con más detalle para investigar el efecto de un mayor nivel de agua en la reacción de transferencia del resto de ácido graso desde fosfolípidos a diglicérido durante la formación de triglicérido. La puesta a punto experimental se lista en la Tabla 7 siguiente.

10 Tabla 7: Receta para la investigación del efecto aciltransferasa de KLM3' en el sustrato diglicérido/fosfatidilcolina.

	1	2	3	4	5
Diglicérido/Fosfatidilcolina 80/20 g	3	3	3	3	3
Aciltransferasa KLM3': 1.128 LATU/ml	0	0,01	0,01	0,01	0,01
Tampón 1: 100 mM Acetato pH 5,5 ml	0,05	0,05	0,05	0,05	
Agua ml	0,01		0,09	0,165	0,14
% agua	2,00	2,00	5,00	7,50	5,00
LATU/g de sustrato	0,0	3,8	3,8	3,8	3,8

Se mezclaron diglicérido destilado basado en aceite de girasol y fosfatidilcolina (PC) durante el calentamiento y agitación hasta 80°C hasta que la PC se disolvió en el diglicérido.

15 El sustrato se pesó en un Vaso Dram de 7 ml con tapón de rosca y se calentó hasta 55°C. Se añadió enzima, tampón y agua y la muestra se agitó con agitación magnética a 450 rpm.

Después de 30, 90 y 240 minutos se tomó una muestra y se analizó por TLC.

Los cromatogramas de TLC de muestran en la Figura 113 y Figura 114.

20 Las placas de TLC se escanearon y el contenido de triglicérido en las muestras se calculó tomando como base una curva de calibración hecha a partir de triglicérido (Aceite de Canola). Los resultados de la determinación de triglicérido se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Análisis de triglicérido en el sustrato diglicérido/PC incubado con aciltransferasa KLM3'

Ensayo no	Triglicérido, %	Triglicérido, %	Triglicérido, %
	30 minutos	90 minutos	240 minutos
1	1,33	1,36	1,58
2	1,55	1,91	2,56
3	1,59	2,02	2,65
Ensayo no	Triglicérido, %	Triglicérido, %	Triglicérido, %
	30 minutos	90 minutos	240 minutos
4	1,57	1,81	2,29
5	1,56	1,91	2,46

Los resultados de la Tabla 8 se analizaron estadísticamente por ANOVA usando software Statgraphic con los resultados mostrados en la Figura 115 y Figura 116.

- 5 Los resultados de la Tabla 8 y la Figura 115 y la Figura 116 demuestran claramente la capacidad de la aciltransferasa KLM3' para producir triglicérido a partir de un sustrato de diglicérido y fosfatidilcolina.

Conclusión

Se sabe que la lípido aciltransferasa KLM3' así como la fosfolipasa C (PLC) contribuyen a un rendimiento de aceite incrementado en el desgomado del aceite vegetal.

- 10 El efecto de la lípido aciltransferasa KLM3' en el desgomado del aceite se basa en una reacción de transferencia de resto de ácido graso desde los fosfolípidos al esteroil durante la producción de lisofosfolípidos y ésteres de esteroil.

El efecto de la fosfolipasa C (PLC) se basa en la conversión de los fosfolípidos en diglicérido y derivados de fósforo solubles en agua. El diglicérido producido en esta reacción se acumulará en la fase de aceite por el proceso de desgomado, pero no es siempre preferible tener alto diglicérido en el aceite porque tendrá un impacto en el punto de humo del aceite y también tendrá un impacto en las propiedades de cristalización de las fuentes grasas más saturadas.

- 15 En el presente estudio, la lípido aciltransferasa KLM3' y la Fosfolipasa C (PLC) se ensayaron solas o en combinación en un proceso de desgomado con agua. Los experimentos mostraron que la PLC en el desgomado con agua de aceite de soja produce diglicérido que forma parte de la fase de aceite. Cuando la PLC se usó en combinación con KLM3' se mostró sorprendentemente que la cantidad de diglicérido producido por la PLC se reducía y que el esteroil se convertía en ésteres de esteroil lo que indica un efecto sinérgico entre estas dos enzimas porque KLM3' cataliza la reacción de transferencia de resto de ácido graso desde el fosfolípido al diglicérido durante la formación de triglicérido.

La reacción de transferencia catalizada por KLM3' del resto de ácido graso desde el fosfolípido al diglicérido durante la formación de triglicérido se confirmó en un sistema modelo compuesto por diglicérido y fosfolípido.

- 25 Los resultados también mostraron que los dos fosfolípidos ensayados no tienen la misma actividad en todos los tipos de fosfolípidos, pero KLM3' tiene casi la misma actividad en los cuatro tipos de fosfolípidos encontrados en el aceite de soja crudo. Esto también abre la posibilidad de usar Fosfolipasa C en combinación con KLM3' con el fin de obtener una conversión adicional de fosfolípidos.

Ejemplo 14

Uso de KLM3' en el desgomado con agua de aceite de soja crudo.

- 30 El aceite vegetal incluyendo el aceite de soja contiene 1 a 3% de fosfolípidos, que se eliminan por un proceso de desgomado del aceite. El proceso de desgomado del aceite se divide normalmente en un proceso de desgomado con agua y un proceso de neutralización. El aceite de Soja Crudo con 1-3% de fosfolípidos no puede transportarse para exportación sin desgomado con agua con el objetivo de reducir el nivel de fósforo hasta 200 ppm de Fósforo o menos para cumplir con la especificación del aceite crudo desgomado con agua.

Si el nivel de fósforo es mucho menor de 200 ppm esto puede ser desventajoso. Típicamente, el desgomado convencional resulta en un nivel de fósforo después de la centrifugación de aproximadamente 50 ppm. Esto es porque no es posible controlar la centrifuga para proporcionar niveles de fósforo que son menores de 200 ppm pero tan cercanos como es posible a este nivel.

- 5 Por el contrario, en el presente caso el uso de la lípido aciltransferasa el aceite desgomado con agua podría ajustarse preferiblemente a aproximadamente 180 ppm de fósforo.

10 El ajuste del nivel de fósforo en el proceso de desgomado con agua enzimático de la presente invención puede hacerse preferiblemente ajustando la interfase entre la goma y el aceite en la centrifuga para obtener un poco más de fosfolípido en la fase de aceite. En un proceso de desgomado con agua convencional la fase de goma es sin embargo muy espesa y viscosa y por lo tanto no es fácil ajustar la interfase en la centrifuga.

Los presentes inventores han encontrado sorprendentemente que cuando se usa lípido aciltransferasa (por ejemplo, KLM3') en el proceso de desgomado con agua la interfase podía ajustarse sin problemas en la centrifuga y podía producir un aceite desgomado que estaba más cerca de la especificación de un máximo de 200 ppm de fósforo.

Experimental

- 15 La lípido aciltransferasa KLM3' (SEQ ID No. 68) se usó en el desgomado con agua de aceite de soja crudo en el proceso indicado en la Figura 117.

20 El aceite de soja crudo que contiene 1.100 ppm de fósforo se expuso al proceso de desgomado con agua mostrado en la Figura 117. En el primer experimento, el proceso de desgomado se realizó sin la adición de la enzima. En el segundo experimento, se añadió la enzima KLM3' y después de analizar el contenido de fósforo del aceite desgomado con agua la interfase entre la goma y el aceite en la centrifuga se ajustó hacia el centro de la centrifuga. Cuando el proceso estuvo de nuevo en equilibrio el fósforo se analizó de nuevo.

El resultado de los ensayos se muestra en la Tabla 1 siguiente:

Tabla 1

Desgomado con agua	1	2	3
Enzima KLM3', LATU/kg	0	200	200
Ajuste preciso de la centrifuga	185	185	195
Fósforo en el aceite después de la centrifugación, ppm	44*	35*	185

* no significativo

Conclusión

- 25 En el experimento con desgomado con agua enzimático usando KLM3', se mostró que la interfase entre el aceite y la goma en la centrifuga podía ajustarse o controlarse fácilmente para producir aceite desgomado con agua con un nivel de fósforo cercano a la especificación (es decir, cercano a pero menor de 200 ppm).

Bajo las condiciones del desgomado con agua convencional no es siempre fácil ajustar la interfase debido a que la consistencia (alta viscosidad) de la fase de goma no permite dicho ajuste.

30 **Ejemplo 15**

Reacción enzimática en la "fase de goma" después del desgomado con agua enzimático de aceites vegetales.

35 La lípido aciltransferasa, Aceite LysoMax (KLM3') se ensayó en el desgomado con agua de aceite de soja crudo. De forma importante, la enzima no se inactivó al final del proceso de desgomado con agua enzimático- como sería la práctica rutinaria en la industria. Por lo tanto, el proceso de desgomado con agua enzimático se realizó según el protocolo Experimental mostrado a continuación. De forma importante, la enzima no se inactivó después del desgomado.

La fase de goma aislada de este proceso se incubó a 40°C y se analizó la degradación adicional de los fosfolípidos en la fase de goma. Los resultados mostraron sorprendentemente que la enzima hidrolizaba además los fosfolípidos en lisofosfolípidos y ácido graso libre. Esto se explica por el hecho de que la enzima se asocia con la fase de goma cuando la fase de goma se separa de la fase de aceite por centrifugación.

También los liso-fosfolípidos se hidrolizaron durante el almacenamiento y después de 7 días de almacenamiento casi todos los fosfolípidos habían desaparecido de la fase de goma.

RELEVANCIA COMERCIAL DE LOS RESULTADOS

- 5 El desgomado enzimático de aceite de soja crudo con KLM3' ha mostrado que es posible mejorar el rendimiento de aceite desde 0,5 hasta 1,5%. La fase de goma aislada de este proceso típicamente contiene aún algo de aceite y fosfolípidos (EP1 624 047). Se sabe que mediante la hidrólisis de la fase de goma puede separarse una fase de aceite de la goma, que puede aislarse por centrifugación u otros medios de separación. Esta fase de aceite que contiene altos niveles de ácido graso libre puede venderse como aceite ácido con un valor más alto que la fase de goma normal que se añade a los alimentos.
- 10 Un aspecto adicional es que la fase sólida remanente después de la separación del aceite ácido tiene un nivel de fósforo más alto que la goma normal y puede usarse como una fuente de fósforo orgánico.

Introducción

- 15 Los inventores han mostrado sorprendentemente que la lipido aciltransferasa, Aceite LysoMax (KLM3') es activa en la fase de goma aislada del desgomado con agua enzimático de aceite de soja crudo. Por lo tanto, se especuló si la enzima podría degradar más los fosfolípidos en ácidos grasos libres que, por centrifugación, podrían aislarse como un aceite ácido junto con el triglicérido remanente en la fase de goma.

En este estudio se examinó el efecto de diferentes dosificaciones de enzima y temperaturas de desgomado con agua en la degradación de fosfolípidos en la fase de goma.

Material y Métodos:

- 20 • KLM3': Glicerofosfolípido colesterol aciltransferasa (Aceite FoodPro LysoMax) (K932)
Lote no 102629600. 1 Actividad 1.128 LATU/g

Aceite de soja crudo no 18: de, Argentina

Análisis por HPTLC

La degradación de los fosfolípidos en la fase de goma de las muestras tratadas con enzima se analizó por HPTLC.

- 25 Aplicador: Muestreador Automático de TLC 4, CAMAG

Placa de HPTLC: 20 x 10 cm, Merck no. 1.05641. Activada 10 minutos a 160°C antes del uso.

Aplicación:

La fase de goma de 10 gramos de aceite se disolvió en 7,5 ml de Hexano:Isopropanol 3:2.

1 µl de la muestra se aplicó en la placa de HPTLC.

- 30 Se aplicó un estándar de fosfolípido (0,5% fosfolípido (Spectra Lipid, Alemania) (0,1, 0,3, 0,5, 0,8 y 1,5 µl) y se usó para el cálculo de los fosfolípidos individuales en la goma.

En algunas aplicaciones el contenido de fosfolípidos se calculó respecto a una goma control no tratada con enzima. Esta muestra control se aplicó 0,1-0,3-0,5-0,8-1 µl y se usó para hacer las curvas de calibración.

Fase de aceite. Aproximadamente 90 mg se pesaron y se disolvieron en 1 ml de Hexano:Isopropanol 3:2.

- 35 Se aplicaron 5 µl de la muestra en la placa de HPTLC. Se aplicó mono-diglicérido 5 mg/ml de concentración conocida a 0,1-0,3-0,5-0,8-1,5 µl y se usó para el cálculo de los componentes glicérido individuales.

Aplicador de TLC.

Tampón de corrida no. 1: P-éter:Metil Terc Butil Cetona:Ácido acético 50:50:1

Tampón de corrida no. 6: Cloroformo:1-propanol:Metilacetato:Metanol:0,25% KCl en agua 25:25:25:10:9

- 40 Elución: La placa se eluyó 7 cm usando una Cámara de Revelado Automático ADC2 de Camag.

Revelado:

La placa se secó en un Calentador de Placas de TLC III de Camag durante 10 minutos a 160°C, se enfrió y se sumergió en 6% acetato de cobre en 16% H₃PO₄. Se secó adicionalmente 10 minutos a 160°C y se evaluó directamente.

La densidad de los componentes en la placa de TLC se analizó con un Escáner de TLC 3 de Camag.

5 *Cromatografía de gases*

Los ácidos grasos libres en la fase de goma se analizaron por GLC.

También se analizaron por GLC esterol, éster de esterol y Mono-di-triglicérido de la fase de aceite.

Aparato:

- 10 • Cromatógrafo de Gases Capilar Autosystem 9000 de Perkin Elmer equipado con una columna de sílice fusionada WCOT 12,5 m x 0,25 mm ID x 0,1 µm espesor de la película 5% fenil-metil-silicona (CP Sil 8 CB de Chrompack).
- Gas transportador: Helio.
- Inyector. Inyección split en frío PSSI (temp inicial 50°C calentado hasta 385°C), volumen 1,0 µl.
- Detector FID: 395°C

Programa del horno (usado desde 30.10.2003):	1	2	3
15 Temperatura del horno, °C.	90	280	350
Isotermal, tiempo, min.	1	0	10
Velocidad de la temperatura, °C/min.	15	4	

Preparación de la muestra

- 20 La muestra se disolvió en 12 ml de Heptano:Piridina 2:1, que contienen el estándar interno heptadecano, 0,5 mg/ml. Se transfirieron 500 µl de disolución de la muestra a un vial con tapón de goma, se añadieron 100 µl de MSTFA (N-Metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) y se hizo reaccionar durante 15 minutos a 60°C.

Cálculo

Los factores de respuesta para ácidos grasos libres, mono- di- y triglicérido se determinaron tomando como base material de referencia puro.

25 Experimental:

La lípido aciltransferasa KLM3' se ensayó en aceite de soja crudo en las recetas mostradas en la tabla 1 siguiente.

Los experimentos de desgomado en la Tabla 1 se realizaron a 45 y 55°C.

Publicación 2460-220		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Aceite de soja crudo	g	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
K932: 100 LATU-K/ml	ml	0	0,01	0,02	0,05	0,01	0,02	0,05	0,01	0,02	0,05
Agua Extra	ml	0,10	0,09	0,08	0,05	0,09	0,08	0,05	0,09	0,08	0,05
LATU-K/g de aceite		0,00	0,10	0,20	0,50	0,10	0,20	0,50	0,10	0,20	0,50
% agua		1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

El aceite de soja crudo se calentó hasta 55⁰C (ó 45⁰C) en un vaso Wheaton de 20 ml. Se añadió agua y enzima. La muestra se homogeneizó por cizallamiento alto mezclando durante 30 segundos. Las muestras se pusieron en un bloque calefactor a 55⁰C (ó 45⁰C) con agitación magnética (450 rpm). Después de 30 minutos de incubación las muestras se centrifugaron a 3.000 rcf durante 3 minutos.

- 5 La fase de aceite se separó de la fase de goma dando la vuelta a los tubos durante 15 minutos, lo que dejó la goma en los tubos.

La fase de goma de cada una de las muestras 1 a 4 se congeló inmediatamente.

La fase de goma de cada una de las muestras 5 a 8 se incubó a 40⁰C durante 1 día y se congeló.

La fase de goma de cada una de las muestras 9-12 se incubó 7 días a 40⁰C.

- 10 Todas las muestras se analizaron al mismo tiempo por TLC y GLC.

Resultados:

El análisis por TLC de las muestras de fase de goma del desgomado a 55⁰C se muestran en la Figura 118 y las muestras del desgomado a 45⁰C se muestran en la Figura 119.

- 15 Tomando como base el escaneo del cromatograma de TLC, se calculó el contenido relativo de fosfolípidos en la fase de goma tratada con enzima comparado con la fase de goma sin tratamiento con enzima (véanse las Tablas 2 y 3 siguientes).

Tabla 2: Fosfolípidos relativos en la fase de goma después de desgomado con agua a 55⁰C

muestra no	Enzima LATU/g	Tiempo días	LPC Rel. %	PC Rel. %	PA Rel. %	PE Rel. %	PI Rel. %
1	0	0	100,0	100	100	100	100
2	0,1	0	571,2	31,2	35,8	26,1	55,0
3	0,2	0	144,5	18,0	24,1	13,1	39,6
4	0,5	0	45,6	3,3	17,1	3,0	16,3
5	0,1	1	452,5	4,6	17,6	3,0	24,6
6	0,2	1	26,7	1,0	15,5	0,4	9,5
7	0,5	1	2,0	0,0	6,2	0,0	2,5
8	0,1	7	3,0	0,0	8,0	0,0	3,2
9	0,2	7	1,0	0,0	4,0	0,0	2,1
10	0,5	7	0,2	0,0	0,0	0,0	2,6

Tabla 2: Fosfolípidos relativos en la fase de goma después de desgomado con agua a 45⁰C

muestra no	Enzima LATU/g	Tiempo días	PC Rel. %	PA Rel. %	PE Rel. %	PI Rel. %
1	0	0	100,0	100,0	100,0	100,0
2	0,1	0	40,5	48,6	38,5	43,0
3	0,2	0	21,5	33,7	22,4	26,9
4	0,5	0	7,4	23,1	9,0	15,6

5	0,1	1	6,4	41,9	6,0	17,2
6	0,2	1	2,3	25,7	1,9	12,5
7	0,5	1	1,3	10,7	0,0	4,2
8	0,1	7	0,0	17,1	0,0	8,1
9	0,2	7	2,5	9,4	0,0	4,8
10	0,5	7	0,0	0,0	0,0	3,7

5 Las muestras de la fase de goma de 0 días se tomaron justo después de la reacción de desgomado y centrifugación. En este momento una parte principal de los fosfolípidos ya se ha degradado y se observa que la cantidad de liso-fosfolípido se incrementa (Tabla 2). Durante la incubación de la fase de goma ocurre una hidrólisis adicional de los fosfolípidos pero también se hidrolizan los liso-fosfolípidos.

Las fases de goma se analizaron por GLC para ácidos grasos libres (FFA) y triglicérido (véase la Tabla 3 siguiente).

Una fracción de la fase de goma se extrajo dos veces con Hexano Isopropanol 2:1 y la parte insoluble se secó y se cuantificó gravimétricamente.

Tabla 3: Análisis por GLC de FFA y triglicérido en la fase de goma y material insoluble

Muestra No	Días de Incubación	Enzima LATU/g	% FFA como materia seca	% Triglicérido como materia seca	% FFA+Triglicérido como materia seca	Hexano:IPA insoluble, %.
1	0	0	1,9	64,0	66,0	2,7
2	0	0,1	7,0	41,5	48,6	3,6
3	0	0,2	8,2	42,5	50,7	6,0
4	0	0,5	7,4	43,1	50,5	26,9
5	1	0,1	16,3	36,4	52,7	15,7
6	1	0,2	16,6	39,8	56,4	nd.
7	1	0,5	12,6	40,3	53,0	41,1
8	7	0,1	21,2	37,3	58,5	35,6
9	7	0,2	19,2	37,1	56,4	33,3
10	7	0,5	14,6	42,1	56,7	38,7

10

Los resultados mostrados en la Tabla 3 confirman claramente que la hidrólisis enzimática continúa durante el almacenamiento de la fase de goma a 40°C hasta 7 días.

15 El contenido de la fase de goma que no se puede extraer con disolvente orgánico (Hexano Isopropanol 2:1) es una medida de la cantidad de sólido en la fase de goma. Cuando los fosfolípidos en la fase de goma se hidrolizan a FFA y fosfatidilglicerol la cantidad de material que no es soluble en Hexano:isopropanol se incrementa. Después de 7 días de incubación, más del 90% de la fase de goma está compuesto por FFA, triglicérido y fosfatidilglicerol y no quedan fosfolípidos en la fase de goma. La composición de la fase de goma después de la incubación facilita mucho la separación en una fase de aceite y una fase sólida/soluble en agua porque no quedan emulsionantes (fosfolípidos y lisofosfolípidos) en la goma.

20

Conclusión

5 Durante el desgomado enzimático con una lípido aciltransferasa (por ejemplo, KLM3') se aísla una fase de goma que contiene enzima activa. La incubación de la fase de goma a 40⁰C hidroliza más los fosfolípidos en la fase de goma. Dependiendo de la dosificación de la enzima, todos los fosfolípidos así como los liso-fosfolípidos se hidrolizan en ácidos grasos y fosfatidilglicerol. La eliminación de los fosfolípidos en la fase de goma hace posible aislar una fase de aceite que contiene ácidos grasos libres y el triglicérido remanente en la fase de goma.

10 En el experimento de desgomado realizado a 55⁰C, se observaron niveles de degradación de fosfolípidos más altos que cuando se realizó el experimento a 45⁰C. En ambos experimentos la enzima era activa en la fase de goma después de la separación y hubo una tendencia a un grado global mayor de hidrólisis durante el almacenamiento a 40⁰C cuando el desgomado con agua se realizó a 55⁰C.

REIVINDICACIONES

1. Un método de desgomado con agua de un aceite comestible que comprende las etapas de: a) mezclar 0,1-5% p/p de agua con aceite comestible y una lipido aciltransferasa, b) agitar la mezcla durante entre 10 minutos y 180 minutos a 45 a 90°C, y c) separar la fase de aceite y la fase de goma, en el que la lipido aciltransferasa usada tiene una actividad transferasa (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína enzimática según se determina usando el ensayo siguiente:
- 5 a) se disuelven 50 mg de colesterol y 450 mg de fosfatidilcolina (PC) de soja en cloroformo y el cloroformo se evapora a 40°C en vacío; se dispersan 300 mg de PC:colesterol 9:1 a 40°C en 10 ml de 50 mM tampón HEPES pH 7 para formar el sustrato;
- 10 c) se añaden 250 µl de sustrato en un vaso con tapa a 40°C, se añaden 25 µl de disolución de enzima y se incuba con agitación durante 10 minutos a 40°C;
- d) después de 10 minutos, se añaden 5 ml de Hexano:Isopropanol 3:2;
- e) la cantidad de éster de colesterol se analiza por HPTLC usando estándar de estearato de colesterilo para la calibración;
- 15 f) la actividad transferasa se calcula como la cantidad de la formación de éster de colesterol (en µmoles) por minuto.
2. Un método según la reivindicación 1 en el que el método comprende además d) incubar la fase de goma que comprende la enzima lipido aciltransferasa activa durante entre un mínimo de 2 horas y un máximo de 7 días y e) separar el aceite de la fase de goma.
3. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la lipido aciltransferasa es un polipéptido que tiene actividad lipido aciltransferasa, polipéptido que se obtiene por la expresión de:
- 20 a) la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 49 o una secuencia de nucleótidos que tiene 75% o más de identidad con ésta;
- b) un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido en el que dicho polipéptido es al menos 70% idéntico a la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID No. 16 o a la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID No. 68;
- 25 c) o un ácido nucleico que hibrida en condiciones de astringencia media con una sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 49.
4. Un método según la reivindicación 3 en el que la lipido aciltransferasa es un polipéptido obtenido por la expresión de las secuencias de nucleótidos en *Bacillus licheniformis*.
5. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la lipido aciltransferasa es un polipéptido que tiene actividad lipido aciltransferasa, polipéptido que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 o una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más de identidad con éstas.
- 30 6. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que la lipido aciltransferasa es un polipéptido que tiene actividad lipido aciltransferasa, polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 68 o una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más de identidad con ésta.
7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el que una fosfolipasa C se mezcla adicionalmente con el aceite y/o agua y/o lipido aciltransferasa.
- 40 8. Uso de una lipido aciltransferasa en el desgomado con agua de un aceite comestible para incrementar el rendimiento de aceite en la fase de aceite después de la finalización del proceso de desgomado con agua; en el que 0,1-4% p/p de agua se mezcla con el aceite comestible; la enzima se añade a un aceite comestible a una temperatura en el intervalo de 45 a 90°C; y la lipido aciltransferasa se hace reaccionar con el aceite comestible durante entre 10 minutos a 180 minutos, en el que la lipido aciltransferasa usada tiene una actividad transferasa (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína enzimática según se determina usando el ensayo siguiente:
- 45

- a) se disuelven 50 mg de colesterol y 450 mg de fosfatidilcolina de soja en cloroformo y el cloroformo se evapora a 40°C en vacío; se dispersan 300 mg de PC:colesterol 9:1 a 40°C en 10 ml de 50 mM tampón HEPES pH 7 para formar el sustrato;
- 5 c) se añaden 250 µl de sustrato en un vaso con tapa a 40°C, se añaden 25 µl de disolución de enzima y se incuba con agitación durante 10 minutos a 40°C;
- d) después de 10 minutos, se añaden 5 ml de Hexano:Isopropanol 3:2;
- e) la cantidad de éster de colesterol se analiza por HPTLC usando estándar de estearato de colesterilo para la calibración;
- f) la actividad transferasa se calcula como la cantidad de la formación de éster de colesterol (en µmoles) por minuto.
- 10 9. Uso de una lípido aciltransferasa en el desgomado con agua de un aceite comestible para disminuir la viscosidad de la fase de goma después de la finalización del proceso de desgomado con agua; en el que 0,1-4% p/p de agua se mezcla con el aceite comestible; la enzima se añade a un aceite comestible a una temperatura en el intervalo de 45 a 90°C; y la lípido aciltransferasa se hace reaccionar con el aceite comestible durante entre 10 minutos a 180 minutos, en el que la lípido aciltransferasa usada tiene una actividad transferasa (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína
- 15 enzimática según se determina usando el ensayo siguiente:
- a) se disuelven 50 mg de colesterol y 450 mg de fosfatidilcolina de soja en cloroformo y el cloroformo se evapora a 40°C en vacío; se dispersan 300 mg de PC:colesterol 9:1 a 40°C en 10 ml de 50 mM tampón HEPES pH 7 para formar el sustrato;.
- 20 c) se añaden 250 µl de sustrato en un vaso con tapa a 40°C, se añaden 25 µl de disolución de enzima y se incuba con agitación durante 10 minutos a 40°C;
- d) después de 10 minutos, se añaden 5 ml de Hexano:Isopropanol 3:2;
- e) la cantidad de éster de colesterol se analiza por HPTLC usando estándar de estearato de colesterilo para la calibración;
- f) la actividad transferasa se calcula como la cantidad de la formación de éster de colesterol (en µmoles) por minuto.
- 25 10. Uso de una lípido aciltransferasa en combinación con una fosfolipasa C en el desgomado con agua de un aceite comestible para incrementar el rendimiento de aceite y/o para incrementar los niveles de triglicérido en la fase de aceite después de la finalización del proceso de desgomado con agua y/o para reducir el nivel de diglicérido en la fase de aceite después de la finalización del proceso de desgomado con agua; en el que 0,1-4% p/p de agua se mezcla con el
- 30 aceite comestible; la enzima se añade a un aceite comestible a una temperatura en el intervalo de 45 a 90°C; y la lípido aciltransferasa se hace reaccionar con el aceite comestible durante entre 10 minutos a 180 minutos, en el que la lípido aciltransferasa usada tiene una actividad transferasa (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína enzimática según se determina usando el ensayo siguiente:
- 35 a) se disuelven 50 mg de colesterol y 450 mg de fosfatidilcolina de soja en cloroformo y el cloroformo se evapora a 40°C en vacío; se dispersan 300 mg de PC:colesterol 9:1 a 40°C en 10 ml de 50 mM tampón HEPES pH 7 para formar el sustrato;
- c) se añaden 250 µl de sustrato en un vaso con tapa a 40°C, se añaden 25 µl de disolución de enzima y se incuba con agitación durante 10 minutos a 40°C;
- d) después de 10 minutos, se añaden 5 ml de Hexano:Isopropanol 3:2;
- 40 e) la cantidad de éster de colesterol se analiza por HPTLC usando estándar de estearato de colesterilo para la calibración;
- f) la actividad transferasa se calcula como la cantidad de la formación de éster de colesterol (en µmoles) por minuto.
11. El método o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8-10, en el que el pH del proceso de desgomado es entre pH 5,0 a pH 10,0.
- 45 12. El método o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8-11, en el que la lípido aciltransferasa comprende un resto GDSx y/o un resto GANDY.

13. El método o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8-12, en el que la enzima lípido aciltransferasa se caracteriza como una enzima que posee actividad aciltransferasa y que comprende el resto de la secuencia de aminoácidos GDSX, en el que X es uno o más de los residuos de aminoácidos siguientes L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.
- 5 14. El método o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8-13, 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*, *Desulfotobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*, *Schizosaccharomyces*, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Candida*.
- 10 15. El método o uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 u 8-13, en el que la lípido aciltransferasa se obtiene por la expresión de una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas como SEQ ID No. 49, SEQ ID No. 36, SEQ ID No. 39, SEQ ID No. 42, SEQ ID No. 44, SEQ ID No. 46, SEQ ID No. 48, SEQ ID No. 50, SEQ ID No. 51, SEQ ID No. 52, SEQ ID No. 53, SEQ ID No. 54, SEQ ID No. 55, SEQ ID No. 56, SEQ ID No. 57, SEQ ID No. 58, SEQ ID No. 59, SEQ ID No. 60, SEQ ID No. 61, SEQ ID No. 62 o SEQ ID No. 63 o una secuencia de nucleótidos que tiene 75% o más de identidad con éstas.
- 15 16. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8-15, en el que la lípido aciltransferasa es un polipéptido obtenido por la expresión de:
- a. la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 49 o una secuencia de nucleótidos que tiene 75% o más de identidad con ésta;
- 20 b. un ácido nucleico que codifica dicho polipéptido en el que dicho polipéptido es al menos 70% idéntico a la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID No. 16 o a la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID No. 68; o
- c. un ácido nucleico que hibrida en condiciones de astringencia media con una sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID No. 49.
- 25 17. Uso según la reivindicación 16, en el que la lípido aciltransferasa es un polipéptido obtenido por la expresión de las secuencias de nucleótidos en *Bacillus licheniformis*.
18. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8-17, en el que la lípido aciltransferasa es un polipéptido que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEQ ID No. 68, SEQ ID No. 16, SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 9, SEQ ID No. 10, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, SEQ ID No. 13, SEQ ID No. 14, SEQ ID No. 15, SEQ ID No. 17, SEQ ID No. 18, SEQ ID No. 34, SEQ ID No. 35 o una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más de identidad con éstas.
- 30 19. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8-18, en el que la lípido aciltransferasa es un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada como SEQ ID No. 68 o una secuencia de aminoácidos que tiene 75% o más de identidad con ésta.
- 35 20. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 8-19, en el que la lípido aciltransferasa se usa en combinación con una fosfolipasa C.

FIGURA 1

SEQ ID No. 16

```

1  ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTKQFPGLT
61  IANAEGGAT AVAYNKISWD PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVLV WVGANDYLAY
121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLENLPDLGQ NPSARSQKVV EAVSHVSAYH
181 NKLLLNLARQ LAPTMVKLF EIDKQFAEML RDPQNEGLSD VENPCYDGGY VWKPFATRSV
241 STDRQLSAFS PQERLAIAGN PLLAQAVASP MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL
301 SERAATFIET QYEFLAHG
    
```

FIGURA 2

(SEQ ID No. 1)

```

1  MKKWFVCLLG LVALTVQAAD SRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
51  SSPPYYEGRF SNGPVWLEQL TKQFPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNPK
101 YQVINNLDYE VTQFLQKDSF KPDDLVLVWV GANDYLAYGW NTEQDAKRVR
151 DAISDAANRM VLNGAKQILL FNLPLDGQNP SARSQKVVEA VSHVSAYHNQ
201 LLLNLARQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNEGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASPMR RRSASPLNCE
301 GKMFWDQVHP TTVVHAALSE RAATFIANQY EFLAH*
    
```

FIGURA 3

(SEQ ID No. 2)

```

1 ivafGDSlTd geayygdsg ggwgagladr Ltallrlrar prgvdvfnrg isGrtsdGr1
61 ivDalvallF laqslglpnL pPYLsgdflr GANFAsagAt Ilptsgpfli QvqFkdfksq
121 vlelrqalgl lqellrllpv ldakspdlvt imiGtNUlit saffgpkste sdrnsvpef
181 kdnlrqlikr Lrsnngarii vlitlvilnl gplGC1Pkl alalassknv dasgclerln
241 eavadfneal relaiskled qlrkdglpdr kgadvpyvDl ysifqddgi qnpsayvyGF
301 ettkaCCGyG gryNynrvCG naglcnvtak aCnpssylls flfwDgfHaps ekGykavAea
361 1

```

FIGURA 4

(SEQ ID No. 3)

```

1 mkkwfvcllg lvaltvqaad srpafsrivm fgdsldtgk myskmrgylp ssppyyegrif
61 sngpwwleql tnefpgltia neaeggptav aynkiwnpk yqvinnldye vtqflqkdsf
121 kpddlvilw gandylaygw nteqdakrvr daisdaanzm vlngakeill fnlpdlgqnp
181 sarsqkvvea ashvsayhnq lllnlarqla ptgmvlkfei dkqfaemlrd pqnfglsdqr
241 nacyggsyvw kpfasrsast dsqlsafnpq erlaiagnpl laqavaspma arsastlnce
301 gkmfwdqvhp ttvhaalse paatfiesqy eflah

```

FIGURA 5

SEQ ID No. 4

1 mkkwfvcllg lialtvqaad trpafsrivm fgdslsdtgk myskmrgylyp ssppyyegrf
 61 sngpwwleql tkqfpgltia neaeggatav aynkiswnpk ygvynldye vtqflqkdsf
 121 kpddlvilwv gandylaygw nteqdakrvr daisdaanrm vlngakqill fnlpdlgqnp
 181 sarsqkvvea vshvsayhnk lllnlarqla ptgmvkifei dkqfaemlrd pqnfglsdve
 241 npcydgggyvw kpfatrsvst drqlsafspq erlaiagnpl laqavaspma rrsasplnce
 301 gkmfwdqvhv ttvhaalse raatfietqy eflahg

FIGURA 6

SEQ ID No. 5

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
 61 anllclrsta nyphviadtt garltdvtcg aaqtadftra qypgvapqld alggtgdlvt
 121 ltiggndnst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
 181 arapharvaa lgypwitpat adpscflklp laagdvpplr aiqahndav rraaetgat
 241 yvdfsgvsdg hdaceapgtr wiepllfghs lvpvhpnalg errmaehtmd vlgld

FIGURA 7

SEQ ID No. 6

1 mpkpalrrvm tatvaavgtl algltdatah aapaqatptl dyvalgdsys agsgvlpvdp
 61 anllclrsta nyphviadtt garltdvtcg aaqtadftra qypgvapqld alggtgdlvt
 121 ltiggndnst finaitacgt agvlsggkgs pckdrhgtsf ddeieantyp alkeallgvr
 181 arapharvaa lgypwitpat adpscflklp laagdvpplr aiqahndav rraaetgat
 241 yvdfsgvsdg hdaceapgtr wiepllfghs lvpvhpnalg errmaehtmd vlgld

FIGURA 8

SEQ ID No. 7

1 mdyekfllfg dsitefafnt rpiedgkdqy algaalvney trkmdilqrg fkgytsrwal
 61 kilpeilkhe snivmatifl gandacsagp qsvplpefid nirqmvslmk syhirpiig
 121 pglvdrekwe kekseeialg yftrtnenfai ysdalaklan eekvpfvaln kafqqeggda
 181 wqqlitdglh fsgkgykifh dellkvietaf ypqyhpknmq yklkdwravl ddsnims

FIGURA 9

(SEQ ID No. 8)

10	20	30	40	50	60
MNLRQWMGAA	TAALALGLAA	CGGGGTDQSG	NPNVAKVQRM	VVFGDSLSDI	GTYPVAQAV
70	80	90	100	110	120
GGGKFTTNPG	PIWAETVAAQ	LGVTLPVAVM	GYATSVQNCP	KAGCFDYAQG	GSRVTDENGI
130	140	150	160	170	180
GHNGGAGALT	YPVQQQLANF	YAASNNTFNG	NNDVVVFLAG	SNDIFFWTTA	AATSGSGVTF
190	200	210	220	230	240
AIATAQVQQA	ATDLVGYVKD	MIKAGATQVY	VFNLPDSSLT	PDGVASGTTG	QALLHALVGT
250	260	270	280	290	300
FMTTLOSGLA	GTSARIIDFN	AQLTAAIQNG	ASFGFANTSA	RACDATKINA	LVPSAGGSSL
310	320	330	340		
FCSANTLVAS	GADQSYLFAD	GVHPTTAGHR	LIASNVLARI	LADNVAH	

FIGURA 10 (SEQ ID No. 9)

1 migsyvavgd sftegvgdpg pdgafvgwad rlavlladrr pegdftytnl avrgllldqi
 61 vaeqvprvvg lapdlvsfaa ggndiirpqt dpdevaerfe lavaalaaa gtlvlttgfd
 121 trgvpvkhl rgkiatyngv vraiadrygc pvldlwslrs vqdrrawdada rhlhspeght
 181 rvalraggal glrvpadpdq pwpplpprgt ldvrrddvhw areylvpwig rrlrgesagd
 241 hvtakgtlsp daiktriaav a

FIGURA 11

(SEQ ID No. 10)

1 mqtnpaytsl vavgdsfteg msdllpdgsy rgwadllatr maarspgfry anlavrgkli
 61 gqivdeqvdv aaamgadvit lvggindtlr pkcdmarvrd litqaverla phceqlvlmr
 121 spgrqgpvle rfrprmealf aviddlagrh gavvvdlyga qsladprmwv vdrhlhtaeg
 181 hrrvaeavwq slghepedpe whapipatpp pgwvtrrtad vrfarqhlip wigrrltgrs
 241 sgdglpakrp dllpyedpar

FIGURA 12

(SEQ ID No. 11)

1 mtrgrdggag apptkhrall aavtllivai saaiyagasa ddgsrdhalq aggrlprgda
 61 apastgawvg awatapaaae pgtettglag rsvrnvvhts vggtagariti snlygqsplt
 121 vthasialaa gpdtaaaiad tmrrltfggs arviipaggq vmsdalarlai pyganvlvtt
 181 yspipsgpvt yhpqarqtsy ladgdrtadv tavaytptp ywryltaldv lsheadgtvv
 241 afgdsitdga rsgsdanhrw tdvlaarlhe aagdgrdtpv ysvvnegisg nrlitsrpgv
 301 padnpsglr fqrldlertn vkavvvvlv ndvlinspela drdailtglr tlvdrarahg
 361 lrvvgatitp fgggygytea retmrqevne eirsgrvfdt vvdfdkalrd pydprmrsv
 421 ydsgdhlhpg dkgyarngav idlaalkgaa pvka

FIGURA 13 (SEQ ID No. 12)

1 mtsmsrarva rriaagaayg gggiglagaa avglvvaevq larrvvgvgt ptrvpnaqgl
 61 yggltptagd pplrlmmlgd staagggvhr agqtpgalla sglaavaerp vrlgsvaqqg
 121 acsddldrvq alvlaepdrv pdicvimvga ndvthmpat rsvrhlssav rrlrtagaev
 181 vvgtcpdlgt iervrqplrw larrasrqla aaqtigaveq ggtrvslgdl lgpefaqmpv
 241 elfgpdnyhp saegyataam avlpsvcaal glwpadeehp dalrregflp varaaaaeas
 301 eagtevaam ptgprgpwal lkrrrrrrvs eaepsspsgv

FIGURA 14 (SEQ ID No. 13)

1 mgrgtdqtrt ygrrrarval aaltaavlgv gvagcdsvgg dspapsqspv krttrtapawd
 61 tspasvaavg dsitrgfdac avlscdpevs watgssakvd slavrlgka daaehswnya
 121 vtgarmadit aqvtraaqre pelvavmaga ndacrsttsa mtpvadfraq feeamatlrk
 181 klpkavvyvs sipdlkrlws qgrtnplgkq vwkglcplsm lgdadslds atlrntvrd
 241 rvadynevlr evcakdrrcr sddgavhefr fgtdqlshwd wfhpsvdgqa rlaeiayrav
 301 taknp

FIGURA 15 (SEQ ID No. 14)

```

1 mrlsrraata sallltpala lfgasaavsa priqatdyva lgdsyssvgv agsydsssgs
61 ckrstksypa lwaashtgtr fnftacsgar tgdlakqlt pvnsqtdlvs itiggndagf
121 adtmttcnlq gesaclaria karayiqqtl paqldqvyda idsrapaaqv vvlgyprfyk
181 lggscavglc eksraainaa addinavtak raadhgafag dvnttfaghe lcsgapwlhs
241 vtlpvensyh ptangqskgy lpvinsat

```

FIGURA 16 (SEQ ID No. 15)

```

1 MKKWFVCLLG LIALTVQAAD TRPAFSRIVM FGDSLSDTGK MYSKMRGYLP
51 SSPPYYEGRF SNGPVWLEQL TKQFPGLTIA NEAEGGATAV AYNKISWNP
101 YQVINNL DYE VTQFLQKDSF KPDDLWILWV GANDYLAYGW NTEQDAKRVR
151 DAISDAANRM VINGAKQILL FNLPDLGQNP SARSQKVVEA VSHVSAYHNK
201 LLLNLARQLA PTGMVKLFEI DKQFAEMLRD PQNFGLSDVE NPCYDGGYVW
251 KPFATRSVST DRQLSAFSPQ ERLAIAGNPL LAQAVASPMA RRSASPLNCE
301 GKMFWDQVHP TTVVHAALSE RAATFIETQY EFLAHG*

```

FIGURA 17 (SEQ ID No. 19)

```

1 migsyvavgd sftegvgdpg pdgafvgwad rlavlladrr pegdftytnl avrgrlldqi
61 vaeqvprvvg lapdlvsfaa ggndiirpgt dpdevaerfe lavaaltaaa gtlvttgfd
121 trgvpvkhl rgkiatyngv vraiadrygc pvldlwlsls vqdrrawdada rhlspgght
181 rvalraggal glrvpadpdq pwpplprgt ldvrrddvhw areylvpwig rrlrgessgd
241 hvtakgtlsp daiktriaav a

```

FIGURA 18 (SEQ ID No. 25)

1 MFKFKKNFLV GLSAALMSIS LFSATASAAS ADSRPAFSRI VMFGDSLSDT
51 GKMYSKMRGY LPSSPPYYEG RFSNGPVWLE QLTQFPGLT IANEAEKGAT
101 AVAYNKISWN PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVL WVGANDYLAY
151 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLENLPDLGQ NPSARSQKVV
201 EAVSHVSAYH NQLLLNLRQ LAPTMVKLE EIDKQFAEML RDPQNFGLSD
251 VENPCYDGGY VWKPFATRSV STDRQLSAFS PQERLAIAGN PLLAQAVASP
301 MARRSASPLN CEGKMFWDQV HPTTVVHAAL SERAATFIAN QYEFLAH**

FIGURA 19

(SEQ ID NO. 26)

MRLTRSLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN
NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINNQLGALNASTGLVSIITIGNDAGFADAMTT
CVTSSDSTCLNRLATATNYINTLLARLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNFWYC
LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPVWE
SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

Figura 20

SEQ ID No. 27

ZP 00058717

```

1 mlphpagerg evgaffallv gtpqdrirl echetrplrg rcgcgerrvp pltlpgdgv1
61 ctsstrdae tvwrkhlqpr pdggfrphlg'vgcllagqgs pgvlwcgreg crfevcrrdt
121 pglstrngd ssppfragws lppkceisq sarktpavpr ysllrtdrpd gprgrfvgsq
181 praatrrrlf lgipalvlvt altlavlavpt gretlwrwmc eatqdwclgv pvdsrgqpae
241 dgeflllspv qaatwgnyya lgdsyssgdg ardyypgtav kggcwrsana ypelvaeayd
301 faghlsflac sggrgyamld aidevgsqld wnsphtslvt igiggndlgf stvlktcmvr
361 vplldskact dqedairkm akfettfeel isevrtrapd arilvvgypv ifpeeptgay
421 yltitasnqrw lnetiqefnq qlaeavavhd eeiaasggvg svefvdvyha ldgheigsde
481 pwvngvqlrd latgvtvdrs tfhpnaaghr avgervieqi etgpggplya tfavvagatv
541 dtlagevg
    
```

FIGURA 21

(SEQ ID No. 28)

```

1 mgsgpraatr rrlflgipal vlvtaltlvt avptgretlw xmwceatqdw clgvpvdsrg
61 qpaedgefll lspvqaatwg nyyalgdsys sgdgardyyp gtavkggcwr sanaypelva
121 eaydfaghls flacsgrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigiggn dlgfstvlkt
181 cmvrpllds kactdqedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilv gyprifpeep
241 tgayytlitn nqrwlnetiq efnqqlaeav avhdeeaas gvgvsvefvd vyhaldghei
301 gsdepwvngv qlrdlatgvt vdrstfhpna aghravger v ieqietgpgv plyatfavva
361 gatvdtlage vg
    
```

FIGURA 22

(SEQ ID No. 29)

```

1 mrttviaasa llllagcadg areetagapp gessggiree gaeastsitd vyialgdsya
61 amggrdqplr gepfclrsg nypellhaev tdltcggavt gdlleprtlg ertlpaqvda
121 ltedttlvtl siggndlgfg evagcireri agenaddcvd llgetigeql dqlppqldrv
181 heairdragd aqvvtgylp lvsagdcpel gdvseadrrw aveltgqine tvreaaerhd
241 alfvlpddad ehtscappqg rwadiqqqqt dayplhptsa gheamaaavr dalglepvgp
    
```

FIGURA 23

(SEQ ID No. 30)

ZP 00094165

```

1 mgqvklfarr capvllalag lapaatvare aplaegaryv algssfaagp gvgpnapgsp
61 ercgrgtlly phllaealkl dlvdaticsga tthhvlgpwn evppqidsvn gdtrlvtlti
121 ggndvsfvgn ifaaacekma spdprcgkwr eiteewqad eermrsivrq iharaplary
181 vvdyyitvlp psgtcaamai spdrlaqsrz aakrlarita rvareegasl lkfshisrrh
241 hpcsakpwsn glsapaddgi pvhpnrlgha eaaaalvklv klmk //
    
```

FIGURA 24

SEQ ID No. 31

NP 625998.

1 mrrfrlvglf1 sslvlaagaa ltgaataqaa qpaaadgyva lgdsyssgvg agsyissgd
61 ckrstkahpy lwaaahspst fdftacsgar tgdvlsqqlg plssgtglvs isiggndagf
121 adtmttcvlq sessclsria taeayvdstl pgkldgvysa isdkapnahv vvigyprfyk
181 lgttciglse tkrtainkas dhlnvqlaqr aaahgftfgd vrttftghel cagspwlhsv
241 nwnlgesyh ptaagqsggy lpvlnгаа

//

FIGURA 25

SEQ ID No. 32

NP 827753.

1 mrrsritayv tslllavgca ltgaataqas paaaatgyva lgdsyssgvg agsylvssgd
61 ckrsskaypy lwqaahspss fsfmacsgar tgdvlnqlg tlnsstglvs ltiggndagf
121 sdvmttcvlq sdsaclsrin takayvdstl pgqldsvyta istkapsahv avlgyprfyk
181 lggscilagls etkrsainda adylnsaiak raadhgftfg dvkstftghe icssstwlhs
241 ldllnigqsy hptaagqsgg ylpvmnsva

//

FIGURA 26

SEQ ID No. 33

MRLTRLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN
NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINNQLGALNASTGLVSITIGGNDAGFADAMTT
CVTSSDSTCLNRLATATNYINTLLARLDVAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNPWYC
LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPVWE
SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

FIGURA 27

(SEQ ID No. 34)

ADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLPSSPPYYEGRFSNGPVWLEQLTNEFPGLTIANEAEGGPT
 AVAYNKISWNPKYQVINNLDYEVTQFLQKDSFKPDDLVIILWVGANDYLAYGWNTTEQDAKRVRDAISDAAN
 RMVLNGAKEIILFNLPDLGQNP SARSQKVVEAASHVSAYHNQLLLNLARQLAPTGMVKLFEIDKQFAEML
 RDPQNFGLSDQRNACYGGSYVWKPFASRSASTDSQLSAFNPQERLAIAGNPLLAQAVASPMAARSASTLN
 CE
 GKMFWDQVHPTTVVHAALSEPAATFIESQYEFLAH

FIGURA 28

(SEQ ID No. 35)

1	ADTRPAFSRI	VMFGDSLSDT	GKMYSKMRGY	LPSSPPYYEG	RFSNGPVWLE	QLTKQFPGLT
61	IANEAEGGAT	AVAYNKISWN	PKYQVINNLD	YEVTQFLQKD	SFKPDDLVIIL	WVGANDYLAY
121	GWNTTEQDAKR	VRDAISDAAN	RMVLNGAKQI	LLFNLPDLGQ	NPSARSQKVV	EAVSHVSAYH
181	NKLLNLARQ	LAPTGMVKLF	EIDKQFAEML	RDPQNFGLSD	VENPCYDGGY	VWKPFATRSV
241	STDRQLSAFS	PQERLAIAGN	PLLAQAVASP	MARRSASPLN	CEGKMFWDQV	HPTTVVHAAL
301	SERAATFIET	QYEFLAHG				

FIGURA 29

(SEQ ID No. 36)

ACAGGCCGATGCACGGAACCGTACCTTTCCGCAGTGAAGCGCTCTOCCCCATCGTTCCG
 CGGGACTTCATCCGCGATTTTGGCATGAACACTTCCTTCAACGCGCGTAGCTTGCTACAA
 GTGCGGCAGCAGACCCGCTCGTTGGAGGCTCAGTGAGATTGACCCGATCCCTGTGGCCG
 CATCCGTTCATCGTCTTCCGCTGCTGCTCGCGCTGCTGGGCATCAGCCCGGCCAGGCAG
 CCGGCCCGGCTATGTGGCCCTGGGGGATTCTATTCTCGGGCAACGGCGCCGGAAGTT
 ACATCGATTGAGCGGTGACTGTCAACGCAGCAACAACCGGTACCCCGCCCGCTGGGCGG
 CGGCCAACGCACCGTCTCTCTCACCTTCGCGGCCTGCTCGGGAGCGGTGACCACGGATG
 TGATCAACAATCAGCTGGGCGCCCTCAACGCGTCCACCGGCCTGGTGAGCATCACCATCG
 GCGGCAATGACGCGGGCTTCGCGGACGCGATGACCACCTGCGTCACCAGCTGGACAGCA
 CCTGCCTCAACCGGCTGGCCACCGCCACCAACTACATCAACACCACCCTGCTCGCCCGG
 TCGACCGGGTCTACAGCCAGATCAAGGCCCGTGCCCCAACGCCCGGTGGTCTCTCG
 GCTACCCGCGCATGTACCTGGCCTCGAACCCCTGGTACTGCCTGGGCCTGAGCAACACCA
 AGCGCGCGGCCATCAACACCACCGCCGACACCCTCAACTCGGTGATCTCTCCCGGGCCA
 CCGCCACGGATTCCGATTTCGGCGATGTCCGCCCGACCTTCAACAACCACGAACTGTTCT
 TCGGCAACGACTGGCTGCACTCACTCACCTGCGGGTGTGGGAGTGTACCACCCACCA
 GCACGGGCCATCAGAGCGGCTATCTGCCGGTCTCAACGCCAACAGCTCGACCTGATCAA
 CGCACGGCCGTGCCCCCCCCGCGCGTACGCTCGGCGCGGGCGCCGCGAGCGCGTTGATCA
 GCCACAGTGCCGGTGACGGTCCCACCGTCACGGTTCGAGGGTGTACGTACGGTGGCGCC
 GCTCCAGAAGTGGAACGTCAGCAGGACCGTGGAGCCGTCCCTGACCTCGTGAAGAACTC
 CGGGGTCAGCGTGATCACCCCTCCCCGTAGCCGGGGGCGAAGGCGGCGCCGAACTCCTT
 GTAGGACGTCCAGTCGTGCGGCCCGGCTGCCACCGTCCGCGTAGACCGCTTCCATGGT
 CGCCAGCCGGTCCCCGCGGAACTCGGTGGGGATGTCCGTGCCCAAGGTGGTCCCGGTGGT
 GTCCGAGAGCACCGGGGGCTCGTACCGGATGATGTGCAGATCCAAGAATT

FIGURA 30

(SEQ ID NO. 37):

MRLTRSLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN
 NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINNQLGALNASTGLVSITIGGNDAGFADAMTT
 CVTSSDSTCLNRLATATNYINTLLARLDVAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMYLASNFWYC
 LGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPVWE
 SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

FIGURA 31

SEQ ID No. 38

```
1 mlphpagerg evgaffallv gtpqdrirl echetrplrg rcgcgerrvp pltlpgdgv1
61 cttstrdae tvwrkhlqpr pdggfrphlg vgc1lagqgs pgvlwcgreg crfevcrrdt
121 pglstrngd ssppfragws lppkcgeisq sarktpavpr ysllrtdrpd gprgrfvgsq
181 praatrrrlf lgipalvlvt altlavlavpt gretlwmmwc eatqdwclgv pvdsrgqpae
241 dgeflllspv qaatwgnyya lgdsyssgdg ardyypgtav kggcwsana ypelvaeayd
301 faghlsflac sgqrgyamld aidevgsqld wnsphtslvt igiggndlgf stvlktcmvr
361 vplldskact dqedairkrm akfettfeel isevrtrapd arilvgypr ifpeeptgay
421 ylttasnqrw lnetiqefnq qlaeavavhd eeiaasggvg svefvdvyha ldgheigsde
481 pwnvgvqlrd latgvtvdrs tfhpnaaghr avgervieqi etgpgrplya tfavvagatv
541 dtlagevg
```

FIGURA 32

(SEQ ID No. 39)

```

1 ggtggtgaac cagaacaccc ggtcgtcggc gtgggctgcc aggtgcaggt gcaggttctt
61 caactgctcc agcaggatgc cgccgtggcc gtgcacgatg gccttgggca ggcctgtggt
121 ccccgacgag tacagcacc ctagcgatg gtcgaacggc agcggggtga actccagttc
181 cgcgccttcg cccgcggctt cgaactccgc ccaggacagg gtgtcggcga cagggccgca
241 gcccaggtac ggcaggacga cgggtgtgctg caggctgggc atgccgtcgc gcagggcttt
301 gagcacgtca cggcgggtca agtccttacc gccgtagcgg tagccgtcca cggccagcag
361 cactttcggc tcgatctgcg cgaaccggtc gaggacgctg cgcaccccga agtcggggga
421 acaggacgac caggtcgcac cgatcgcggc gcaggcgagg aatgcggccg tcgcctcggc
481 gatgttcggc aggtaggcca cgaccgggtc gccggggccc accccgaggc tgggaggggc
541 cgcagcgatc gcggcgggtc gggtcggcag ttctcccag gtccaactcg tcaacggccg
601 gagttcggac gcgtgcccga tcgccacggc tgatgggtca cggtcgcgga agatgtgctc
661 ggcgtagtgt aggggtggcg cggggaacca gacggcgccg ggcatggcgt cggaggcgag
721 cactgtggtg tacggggtgg cggcgcgcac ccggtagtac tcccagatcg cggaccagaa
781 tccttcgagg tcggttaccg accagcgcga cagtgcctcg tagtccggtg cgtccacacc
841 gcggtgctcc cgcaccacgc ggggtgaacgc ggtgaggttg gcgcttctt tgcgctcctc
901 gtcgggactc cacaggatcg gcggctgctg cttgagtgtc atgaaacgcg accccttctg
961 ggacgggtcg gatgcgggtg gcgtcgggtg cctcccctaa cgtcccggg tgacggagtg
1021 ttgtgcacca catctagcac gcgggacgcg gaaaccgtat ggagaaaaca cctacaacc
1081 cggccggacg gtgggtttcg gccacactta ggggtcgggt gcctgcttgc cgggcagggc
1141 agtcccgggg tgctgtggtg cgggcccggg ggctgtcgtc tcgaggtgtg ccggcgggac
1201 actcccggcc tcagccgtac ccgcaacggg gacagttctc ctcccttccg ggctggatgg
1261 tcccttcccc cgaaatgcgg cgagatctcc cagtcaagcc ggaaaacacc cgctgtgccc
1321 aggtactctt tgcttcgaac agacaggccg gacgggtccac gggggaggtt tgtgggcagc
1381 ggaccacgtg cggcgaccag acgacgggtg ttctcggta tcccgcctc tgtacttgtg
1441 acagcgtca cgtggtctt ggtgtcccg acggggcgcg agacgtgtg gcgcatgtgg
1501 tgtgaggcca cccaggactg gtgcctgggg gtgcccgtcg actcccgcg acagcctgcg
1561 gaggacggcg agtttctgct gcttctcctg gtccaggcag cgacctggg gaactattac
1621 gcgctcgggg attcgtactc ttcgggggac gggcccgcg actactatcc cggcaccgcg
1681 gtgaagggcg gttgctggcg gtcgcgtaac gcctatccgg agctggtcgc cgaagcctac
1741 gacttcgccc gacacttgct gttcctggcc tgcagcggcc agcgcggcta cgcctatgctt
1801 gacgctatcg acgaggtcgg ctgcagctg gactggaact cccctcacac gtcgctggtg
1861 acgatcggga tcggcggcaa cgatctgggg ttctccacgg ttttgaagac ctgcatggtg
1921 cgggtgccgc tgctggacag caaggcgtgc acggaccagg aggacgctat ccgcaagcgg
1981 atggcgaaat tcgagacgac gtttgaagag ctcatcagcg aagtgcgcac ccgcgcgccg
2041 gacgcccgga tccttgtcgt gggctacccc cggattttc cggaggaacc gaccggcgcc
2101 tactacacgc tgaccgcgag caaccagcgg tggctcaacg aaaccattca ggagttaac
2161 cagcagctcg ccgaggtctg cgcggtccac gacgaggaga ttgccgcgtc gggcggggtg
2221 ggcagcgtgg agttcgtgga cgtctaccac gcgttggacg gccacgagat cggctcggac
2281 gagccgtggg tgaacggggt gcagttgccc gacctcgcca ccggggtgac tgtggaccgc
2341 agtaccttcc accccaacgc cgtgggacac cggcgggtcg gtgagcgggt catcgagcag
2401 atcgaaaccg gcccgggccg tccgctctat gccacttctg cgggtggtggc gggggcgaec
2461 gtggacactc tcgcccggca ggtggggtga cccggcttac cgtcccggcc gcaggtctgc
2521 gagcactgcg gcgatctggt ccaactgcca gtgcagttcg tcttcgggtg tgaccagcgg
2581 cggggagagc cggatcgttg agccgtgctg gtctttgacg agcacacccc gctgcaggag
2641 ccgttcgcac agttctcttc cgggtggccag agtcgggtcg acgtcgatcc caycccacag
2701 gccgatgctg cgggcccgca ccacgcccgt gccgaccagt tggctgagag gggcgcagcag
2761 cacgggggcg agggcgcgga catggtcccag gtaagggccg tcgcccagca ggtcaccacg
2821 gcagtgccc agccgcagag cgagggcggt gcccccgaag gtgctgcccgt ctggggcggg
2881 gcggatcacg tcgaagactt ccgcgtcggc taccgcccgc gccacgggca ggtgcccgc
2941 gccacgcgct ttgccgaaca ggtagatata ggcgtcgact ccgctgtggt cgcagggccc

```

FIGURA 33

(SEQ ID No. 40)

```

1  vsgspraatr  rrlflgipal  vltaltlvtl  avptgretlw  zmwceatqdw  clgvpvdsrg
61  qpaedgefll  lspvqaatwg  nyyalgdsys  sgdgardyyp  gtavkggcwr  sanaypelva
121 eaydfaghls  flacsgqrgy  amldaidevg  sqldwnspht  slvtigiggn  dlgfstvlkt
181 cmvrvpllds  kactdqedai  rkrmakfett  feelisevrt  rapdarilvv  gyprifpeep
241 tgayytltas  nqrwlnetiq  efnqqlaeav  avhdeeiaas  ggvgsvefvd  vyhaldghei
301 gsdepwvngv  qlrdlatgvt  vdrstfhpna  aghravgerv  ieqietgpgr  plyatfavva
361 gatvdtlage  vg

```

FIGURA 34

(SEQ ID No. 41)

```

1  mrttviaasa  llllagcadg  areetagapp  gessggiree  gaeastsitd  vyialgdsya
61  amggrdqplr  gepfclrsg  nypellhaev  tdltcggavt  gdlleprtlg  ertlpaqvda
121 ltedttlvtl  siggndlgfg  evagcireri  agenaddcvd  llgetigeql  dqppqldrv
181 heairdragd  aqvvtgylp  lvsagdcpel  gdvseadrrw  aveltgqine  tvreaaerhd
241 alfvlpddad  ehtscappqq  rwadiqqgqt  dayplhptsa  gheamaaavr  dalglepvqp

```

FIGURA 35

(SEQ ID No. 42)

```

1  ttctggggtg ttatggggtt gttatcggct cgtcctgggt ggatcccgcc aggtggggta
61  ttcacggggg acttttgtgt ccaacagccg agaatgagtg ccctgagcgg tgggaatgag
121  gtgggcgggg ctgtgtcgcg atgagggggc ggcgggctct gtggtgcccc gcgacccccg
181  gccccggtga gcggtgaatg aaatccggct gtaatcagca tcccgtgccc accccgctcg
241  ggaggtcagc gcccggagtg tctacgcagt cggatcctct cggactcggc catgctgtcg
301  gcagcatcgc gctcccgggt cttggcgtcc ctcggctggt ctgacctgctg tccctggaag
361  gcgaaatgat caccggggag tgatacaccg gtggtctcat cccggatgcc cacttcggcg
421  ccatccggca attcgggcag ctcccgggtg aagtaggtgg catccgatgc gtcggtgacg
481  ccatagtggg cgaagatctc atcctgctcg agggtgctca ggccactctc cggatcgata
541  tcggggcgct ccttgatggc gtccttgctg aaaccgaggt gcagcttggt ggcttccaat
601  ttcgcaccac ggagcgggac gaggctggaa tgacggccga agagcccgtg gtggacctca
661  acgaaggtgg gtagtcccgt gtcattctg aggaacacgc cctccaccgc acccagcttg
721  tggccggagt tgcctgagc cttggcatcc agaagggaaa cgatctcata tttgtcgggtg
781  tgctcagaca tgatcttctt ttgctgtcgg tgtctggtac taccacggta gggctgaatg
841  caactgttat ttttctgta ttttaggaat tggctccatat cccacaggct ggctgtggtc
901  aaatcgtcac caagtaatcc ctgtcacaca aaatgggtgg tgggagccct ggtcggggtt
961  cgtggggagg cgccgtgccc cgcaggatcg tcggcatcgg cggatctggc cggtaccccg
1021  cggtgaataa aatcattctg taaccttcat cacggttgggt ttaggtatc cgcccctttc
1081  gtcctgaccc cgtccccggc gcgcgggagc ccgcccgggtg cggtagacag gggagacgtg
1141  gacacatga ggacaacggt catcgcagca agcgcattac tccttctcgc cggatgcgcg
1201  gatggggccc gggaggagac cgccggtgca ccgcccgggtg agtcctccgg gggcatccgg
1261  gaggaggggg cggaggcgtc gacaagcatc accgacgtct acatcgccct cggggattcc
1321  tatgcggcga tgggcggcg ggatcagccg ttacggggtg agccgttctg cctgcgctcg
1381  tccggtaatt acccggaaat cctccacgca gaggtcaccg atctcacctg ccagggggcg
1441  gtgaccgggg atctgctcga acccaggagc ctgggggagc gcacggtgcc ggcgacgtg
1501  gatgcgctga cggaggacac caccctggtc accctctcca tcgggggcaa tgaccctgga
1561  ttcggggagg tggcgggatg catccgggaa cggatcgccg gggagaacgc tgatgattgc
1621  gtggacctgc tgggggaaac catcggggag cagctcgatc agcttcccc gcagctggac
1681  cgcgtgcacg aggctatccg ggaccgcgcc ggggacgcgc aggttgggtt caccggttac
1741  ctgcccgtcg tgtctgcccg ggactgcccc gaactggggg atgtctccga ggcggatcgt
1801  cgttgggccc ttgagctgac cgggcagatc aacgagaccg tgcgagaggc ggcgaacga
1861  cagcatgccc tctttgtcct gcccgcgat gccgatgagc acaccagtg tgaccacca
1921  cagcagcgtt gggcggatat ccagggccaa cagaccgatg cctatccgct gcaccgacc
1981  tccgcccggc atgaggggat ggccgcccgc gtcccggagc cgtgggcct ggaaccggtc
2041  cagccgtagc gccgggcgcg cgttgtcga cgaccaacc atgccaggct gcagtacat
2101  ccgcacatag cgcgcgagg cgatggagta cgcacatag aggatgagcc cgtgcccgac
2161  gatgatgagc agcacactgc cgaaggggtg tccccgagg gtgcgcagag ccgagtcag
2221  acctgcggcc tgcctcggat catgggccc aaccggcgat acgatcaaca ccccaggat
2281  cccgaaggcg ataccacggg cgacataacc ggctgttccg gtgatgatga tcgcggtccc
2341  gacctgccct gacccgcac ccgcctccag atcctcccgg aaatcccggg tggccccctt
2401  ccagaggttg tagacacccg cccccagtac caccagccc gcgaccaca ccagaccac
2461  accccagggt tgggatagga cgggtggcggt gacatcgggt gcggtctccc catcggaggt
2521  gctgccgccc cgggcgaagg tggaggtggt caccgcccag gagaagtaga ccatggccat
2581  gaccgcccc ttggccctt ccttgaggtc ctcgcccgc agcagctggc tcaattgcca
2641  gagtcccagg gccgccagg cgatgacggc aaccacagg aggaactgcc caccggagc
2701  ctccgcgatg gtggccagg cacctgaatt cgaggcctca taccggaac cgccgatcc
2761  agtggcgatg cgcaccgca tccaccgat gaggatgtgc agtatgcca ggacaatgaa
2821  accacctctg gccagggtg tcagcgggg gtggtcctcg gcctggtcgg cagcccgtt
2881  gatcgtcctt ttcgcggtc tgggtgcgcc cttatccata gctcccattg aaccgcttg
2941  aggggtgggc ggccactgtc agggcggatt gtgatctgaa ctgtgatgtt ccatcaacc

```

FIGURA 36

(SEQ ID No. 43)

```

1 mrrfrlvglf sslvlaagaa ltgaataqaa qpaaadgyva lgdsyssgvv agsyisssgd
61 ckrstkahpy lwaaahspst fdftacsgar tgdvlsqqlg plssgtglvs isiggn dagf
121 adtmttcvlq sessclsria taeayvdstl pgkldgvysa isdkapnahv vvigyprfyk
181 lgttciglse tkrtainkas dhlntvlaqr aaahgftfgd vrttftghel csgspwlhsv
241 nwnlignesyh ptaagqsggy lpvlnгаа

```

Figura 37

(SEQ ID No. 44)

```

1 cccggcggec cgtgcaggag cagcagccgg cccgcgatgt cctcgggegt cgtcttcate
61 aggccgtcca tcgcgtcggc gaccggcgcc gtgtagttgg cccggacctc gtcccaggtg
121 cccgcggcga tctggcgggt ggtgcgggtgc gggccgcgcc gaggggagac gtaccagaag
181 cccatcgtea cgttctccgg ctgcggttcg ggctcgtccg ccgctccgtc cgtcgcctcg
241 ccgagcacct tctcggcgag gtcggcgctg gtcgccgtca ccgtgacgtc ggcgccccgg
301 ctccagcgcg agatcagcag cgtccagccg tcgccctccg ccagcgtcgc gctgcggtcg
361 tcgtcgcggg cgatccgcag cacgcgcgcg ccgggaggca gcagcgtggc gccggaccgt
421 acgcggtcga tgttcgcgcg gtgcgagtac ggctgctcac ccgtggcgaa acggccgagg
481 aacagcgcgt cgacgacgtc ggacggggag tcgctgtcgt ccagctgag ccggatcggc
541 agggcttcgt gcgggttcac ggacatgtcg ccatgatcgg gcaccggcc gccgcgtgca
601 cccgctttcc cgggcacgca cgacaggggc tttctcgcgg tttcctcgtc gaacttgaac
661 gagtgtcagc catttcttgg catggacact tccagtcaac gcgcgtagct gctaccacgg
721 ttgtggcage aatcctgcta agggaggttc catgagacgt ttccgacttg tcggcttctc
781 gagttcgtc gtctcgcgcg ccggcgccgc cctcaccggg gcagcgaccg cccaggcggc
841 ccaaccggcc gccgcccagc gctatgtggc cctcggcgac tctactcct ccggggctcg
901 agcgggcagc tacatcagct cgagcggcga ctgcaagcgc agcacgaagg cccatcccta
961 cctgtggggc gccgcccact cgcctccac gttcgacttc accgcctgtt ccggcgcccc
1021 tacgggtgat gttctctccg gacagctcgg cccgctcagc tcgggcaccg gcctcgtctc
1081 gatcagcatc ggcggaacg acgcccgtt cgcgacacc atgacgacct gtgtgctcca
1141 gtccgagagc tctgcctgt cgcggatcgc caccgcccag gcgtacgtcg actcgacgtc
1201 gcccggaag ctcgacggcg tctactcggc aatcagcgac aaggcgccga acgcccacgt
1261 cgtcgtcatc ggtaccgcg gttctacaa gctcggcacc acctgcatcg gcctgtccga
1321 gaccaagcgg acggcgatca acaaggcctc cgaccacctc aacaccgtcc tcgcccagcg
1381 cgccgcgcgc cacggcttca ccttcggcga cgtacgcacc acctcaccg gccacgagct
1441 gtgctccggc agcccctggc tgacacagct caactggctg aacatcggcg agtcgtacca
1501 cccaccgcg gcgcccagt ccggtggcta cctgccggtc ctcaacggcg ccgctgacc
1561 tcaggcggaa ggagaagaag aaggagcggg gggagacgag gaggggagg ccccgcccga
1621 cggggtcccc gtccccgtct ccgtctccgt cccggtcccc caagtcaccg agaacgccac
1681 cgcgtcggac tggcccgcg ccgactccg cacctccag cgcacggcac tctcgaacgc
1741 gccggtgtcg tcgtcgtcgt tcaccaccac gccgtcctgg ccgagcgct cgccgcccga
1801 cgggaaggac agcgtccgcc accccggatc ggagaccgac ccgtccgcgg tccccaccg
1861 gtagccgacc tccgcgggca gccgcccgac cgtgaacgtc gccgtgaacg cgggtgcccg
1921 gtcgtcggc gccggacagg cccccagta gtgggtgcgc gagcccacca cggtcacctc
1981 caccgactgc gctgcggggc

```

FIGURA 38

(SEQ ID No. 45)

```

1 mrrsritayv tslllavgca ltgaataqas paaaatgyva lgdsyssgvw agsylsssgd
61 ckrsskaypy lwqaahspss fsfmacsgar tgdvlanqlg tlnsstglvs ltiggndagf
121 sdvmttcvlq sdsaclsrin takayvdstl pgqldsvyta istkapsahv avlgyprfyk
181 lggsclagls etkrainda adylnsaiak raadhgftfg dvkstftghe icsstwlhs
241 ldlinigqsy hptaagqsgg ylpvmmsva

```

FIGURA 39

SEQ ID No. 46

```

1 ccaccgccgg gtcggcggcg agtctcctgg cctcggtcgc ggagagggtg gccgtgtagc
61 cgttcagcgc ggcgccgaac gtcttcttca cctgcccgcc gtactcgttg atcaggccct
121 tgcccttgct cgacgcggcc ttgaagccgg tgcccttctt gacgctgacg atgtagctgc
181 ccttgatcgc ggtgggggag ccggcggcga gcaccgtgcc ctccggccgg gtggcctggg
241 cgggcagtgc ggtgaatccg cccacgaggg cgccggtcgc cacggcggtt atcgcggcga
301 tccggatctt cttgctacgc agctgtgcca tacgagggag tcctcctctg ggcagcggcg
361 cgccctgggtg gggcgccacg ctgtgggggg tgcgcgcgtc atcacgcaca cggccctgga
421 gcgtcgtgtt ccgccctggg ttgagtaaag cctcggccat ctacgggggt ggctcaaggg
481 agttgagacc ctgtcatgag tctgacatga gcacgcaatc aacggggccg tgagcacc
541 ggggcgaccc cgaaaagtgc cgagaagtct tggcatggac acttctgtc aacacgcgta
601 gctggtacga cggttacggc agagatcctg ctaaagggag gttccatgag acgttcccga
661 attacggcat acgtgacctc actcctcctc gccgtcggct ggcacctcac cggggcagcg
721 acggcgcagg cgtccccagc cgccgcggcc acgggctatg tggccctcgg cgactcgtac
781 tcgtccggtg tcggcgcggc cagctacctc agctccagcg gcgactgcaa gcgcagttcg
841 aaggcctatc cgtacctctg gcagggcggc cattcaccct cgtcgttcag tttcatggct
901 tgctcgggcg ctgctacggg tgatgtcctg gccaatcagc tcggcaccct gaactcgtcc
961 accggcctgg tctccctcac catcggaggg aacgacgcgg gcttctccga cgtcatgacg
1021 acctgtgtgc tccagtccga cagcgcctgc ctctcccgca tcaacacggc gaaggcgtac
1081 gtcgactcca ccctgcccgg ccaactcgac agcgtgtaca cggcgatcag cacgaaggcc
1141 ccgtcggccc atgtggcctg gctgggctac ccccgcttct acaaactggg cggctcctgc
1201 ctccggggcc tctcggagac caagcggctc gccatcaacg acgcggccga ctatctgaac
1261 agcggccatc ccaagcgcgc cgccgaccac ggcttcacct tcggcgacgt caagagcacc
1321 ttcaccggcc atgagatctg ctccagcagc acctggctgc acagtctcga cctgctgaac
1381 atcggccagt cctaccacce gaccgcggcc ggccagtccg gggctatct gccggtcatg
1441 aacagcgtgg cctgagctcc cacggcctga atttttaagg cctgaattt taaggcgaag
1501 gtgaaccgga agcggaggcc ccgtccgtcg gggctctcct cgcacaggtc accgagaacg
1561 gcacggagtt ggacgtcgtg cgcaaccggg cgcgcacctc gacggcgatc tcgttcgaga
1621 tcgttcctgt cgtgtcgtac gtggtgacga acacctgctt ctgctgggtc tttcccgccg
1681 tcgcccggaa ggacagcgtc ttccagcccg gatccgggac ctccgccctc ttggtcacc
1741 accgggtact cacctcgacc ggcacccggc ccacctgaa ggtcgcctg aacgtggcg
1801 cctggcggtt gggcggcggg caggcaccgg agtagtcggt gtgcacgcg gtgaccgtca
1861 ccttcacgga ctgggcccgg ggggtcgtcg taccgcggcc gccaccgcg cctcccgagg
1921 tggagcccga gctgtggtcg ccccgccctg cggcgttctc gtcctcgggg gtttccgaac

```

FIGURA 40

SEQ ID No. 47

```

1  mgsqpraatr rrlflgipal vltaltlvtl avptgretlw rrwceatqdw clgvpvdsrg
61  gpaedgefl1 lspvqaatwg nyyalgdsys sgdgardyyp gtavkggcwr sanaypelva
121 eaydfaghl5 flacsggrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigiggn dlgfstvlkt
181 cmrvrvplld5 kactdqedai rkrnakfett feelisevrt rapdarilvv gyprifpeep
241 tgayytltas nqrwlnetiq efnqqlaeav avhdeeiaas ggvgsvefvd vyhaldghei
301 gsdepwvngv qlrdlatgvt vdrstfhpna aghravgerv ieqietgpgr plyatfavva
361 gatvdtlage vg

```

FIGURA 41

SEQ ID No. 48

```

1      ctgcagacac cgcggccgcc ttctcccgga tcgtcatggt cggcgactcc ctcagcgaca
61     ccggcaagat gtactccaag atgcgcggct acctgccgtc ctccccgccg tactacgagg
121    gccgcttctc gaacggcccg gtctggctgg agcagctgac gaagcagttc cccggcctga
181    cgatcgccaa cgaggccgag gggggcgcgga ccgcagtcgc ctacaacaag atctcctgga
241    acccgaagta ccaggtcatt aacaacctcg actacgaggt caccagttc ttgcagaagg
301    actcgttcaa gcccgacgac ctggatcatc tgtgggtggg cgccaacgac tacctggcct
361    acggttgtaa cacggagcag gacgccaagc gggtagcgga cgccatctcg gacgcgga
421    accgcatggt cctgaacggc gcgaagcaga tcctgctggt caacctgccc gacctgggcc
481    agaaccgctc cgcccgtccc cagaaggtcg tcgaggccgt ctgcacgtg tccgcctacc
541    acaacaagct gtcctcaac ctgcccggc agctcgcccc gacgggcatg gtcaagctgt
601    tcgagatcga caagcagttc gcggagatgc tgcgcgacct ccagaacttc ggcctgagcg
661    acgtggagaa cccgtgctac gacggcggct acgtgtggaa gccgttcgcc acccggctcg
721    tctcgaccga ccggcagctg tcggccttct cgccccagga gcgcctggcg atcgctggca
781    acccgtctct ggcacaggcg gtagcttcgc cgatggcccc ccgctcgccc tcgcccctca
841    actgcgaggg caagatgttc tgggaccagg tccacccac caccgtggtc cagccgccc
901    tctcggagcg cgccgccacc ttcacgaga cccagtacga gttcctcgcc cactagtcta
961    gaggatcc

```

Figura 42

1. L131
2. *S. avermitilis*
3. *T. fusca*
4. Consenso

```

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

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

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

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

201
1 (133) NRLATATNYINTTLA-----RLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMY 250
2 (137) SRINTAKAYVDSTLPG-----QLDSVYTAISTKAPSAHVAVLGYPRFY
3 (191) KACTDQEDAIRKRMKE-----ETTFEELISEVRTRAPDARILVVGYPRIY
4 (201) RIA AK YI TLPA RLDSVYSI TRAP ARVVVLGYPRIY

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

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

351
1 (248) PTSTGHQSGYLPVLNANSST----- 395
2 (252) PTAAGQSGGYLPVMNSVA-----
3 (328) PNAAGHRAVGERVIEQIETGPGRPLYATFAVVAGATVDTLAGEVG
4 (351) PTA CHAAGYI.PVI.NST T
    
```

FIGURA 43

SEQ ID No 17 que es la secuencia de aminoácidos de una lipido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;

```

MRYFAIAFLL INTISAFVLA PPKPSQDDFY TPPQGYEAQP LGSILKTRNV PNPLTNVFTP VKVQNAWQLL
VRSEDTFGNP NAIVTITIQP FNAKKDKLVS YQTFEDSGKL DCAPSYAIQY GSDISTLTQ GEMYYISALL
DQGYVVPD YEGPKSTFTV GLQSGRATLN SLRATLKSGN LTGVSSDAET LLWGYSGGSL ASGWAAAIQK
EYAPELSKNL LGAALGGFVT NITATAEAVD SGPFAGIISN ALAGIGNEYF DFKNYLLKKV SPLLSITYRL
GNTHCLLDGG IAYFGKSFFS
RIIRYFPDGW DLVNQEPIKT ILQDNGLVYQ PKDLTPQIPL FIYHGTLDAI VPIVNSRRTF QQWCDWGLKS
GEYNEDLTNG HITESIVGAP AALTWIINRF NGQPPVDGCQ HNVRSANLEY PGTPQSIKNY FEALHAILG
FDLGPDKRD KVTLGGLLKL ERFAP

```

FIGURA 44

SEQ ID No 18 que es la secuencia de aminoácidos de una lipido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;

```

MRYFAIAFLL INTISAFVLA PPKPSQDDFY TPPQGYEAQP LGSILKTRNV PNPLTNVFTP VKVQNAWQLL
VRSEDTFGNP NAIVTITIQP FNAKKDKLVS YQTFEDSGKL DCAPSYAIQY GSDISTLTQ GEMYYISALL
DQGYVVPD YEGPKSTFTV GLQSGRATLN SLRATLKSGN LTGVSSDAET LLWGYSGGSL ASGWAAAIQK
EYAPELSKNL LGAALGGFVT NITATAEAVD SGPFAGIISN ALAGIGNEYF DFKNYLLKKV SPLLSITYRL
GNTHCLLDGG IAYFGKSFFS RIIRYFPDGW DLVNQEPIKT ILQDNGLVYQ PKDLTPQIPL FIYHGTLDAI
VPIVNSRRTF QQWCDWGLKS GEYNEDLTNG HITESIVGAP AALTWIINRF NGQPPVDGCQ HNVRSANLEY
PGTPQSIKNY FEALHAILG FDLGPDKRD KVTLGGLLKL ERFAPHHHHH H

```

FIG. 45



FIG. 46

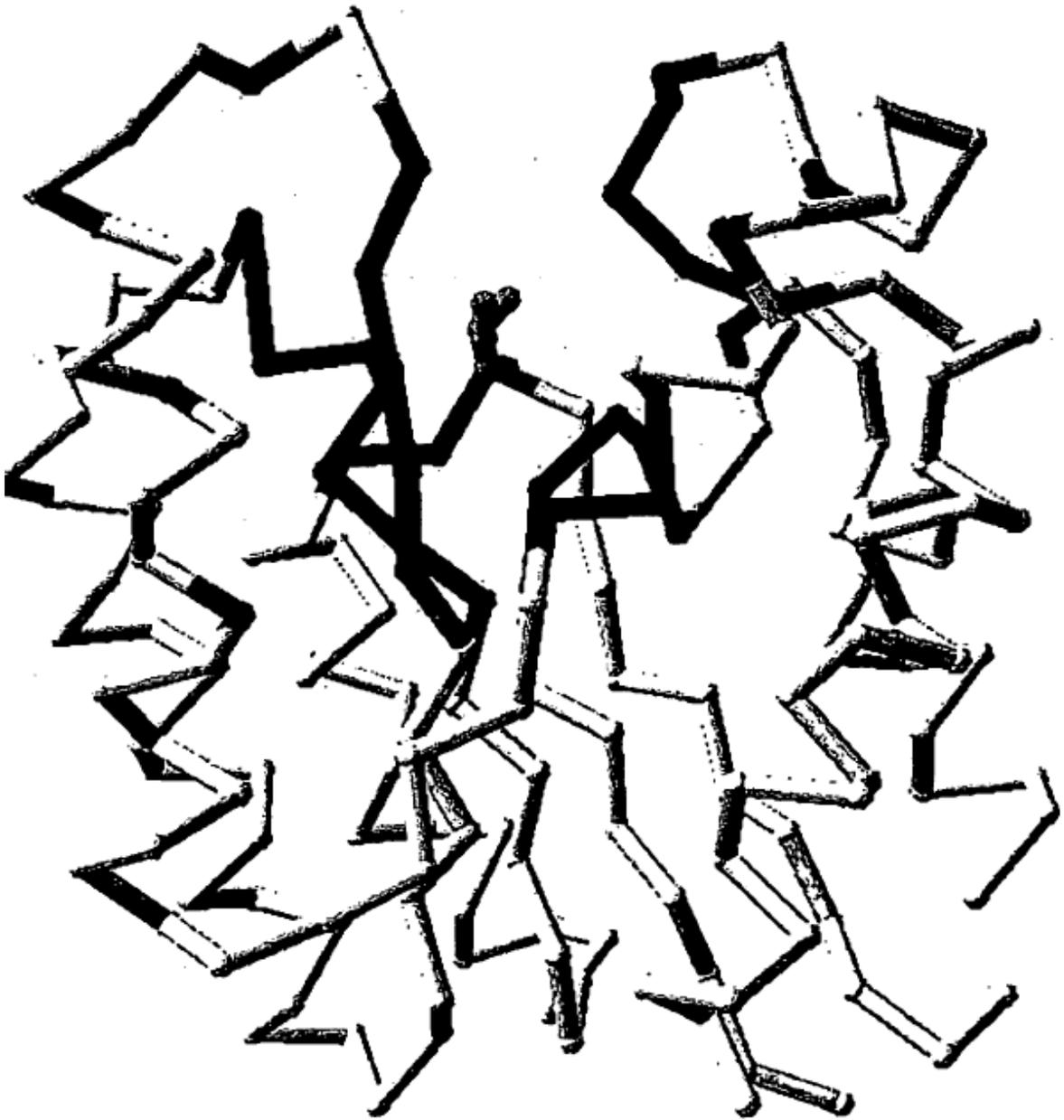
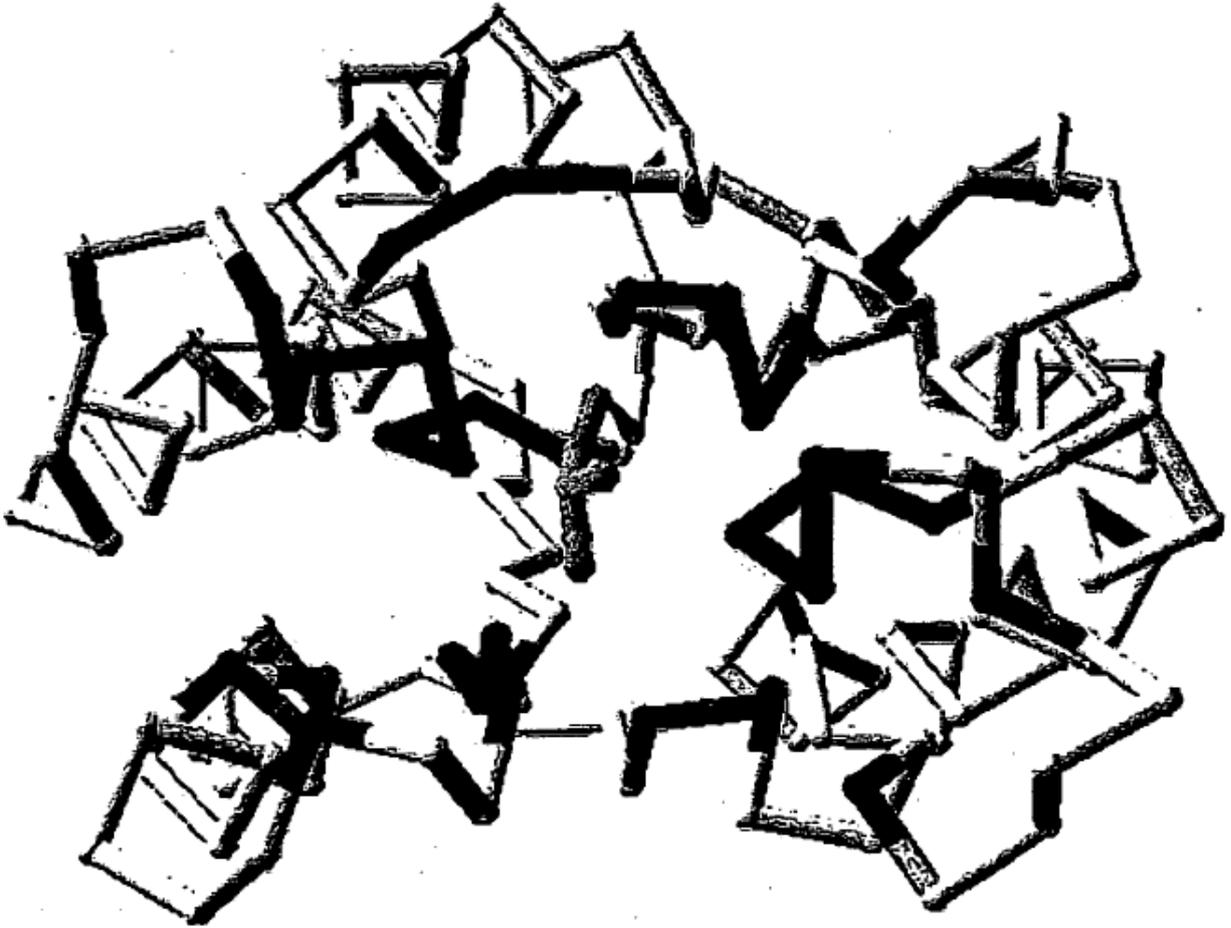


FIG. 47




```

11VNm Q Q T E Q T L R Q I L Q D V K a A N A E P l l m q i R L P A N Y G R - - - - - R Y N E A
h4h4h4h4h4 h4 h4h4h4h4h4h4h4h4h4h4  s5s5s5 s5 s5 s5 s57s57s57s57  h5h5h5h5h5h5
P10480m K R V R D A I S D A A N R M V L N G A K E I L L F N L P d l 9 q n P S A R S Q K V V E A A S H V S A

1DEO F V E Y A E L A A E V A - - - - - G V E Y V D H W S Y V D S I Y E T L G N A t v n
h5h5h5h5h5 h5 h5h5h5h5h5h5h5  s6 s6 s6s6?h6h6h6h6h6h6h6h6h6h6  h h h h
11Vn N E A F S A I Y P K L A k e - - - - - f D V P L L P F F M E E V Y L K P Q W - - - - -
h5h5h5h5h5 h5 h5h5h5h5h5h5h5  h5 s6 s6 s6s6? h6h6h6h6h6  s
P10480 S A Y H N Q L L L N L A I q l a p t g m v k l f e i D K Q F A E M L R D P Q N F G L S D Q R N a c y

1DEOm F V E Y A E L A A E V A - - - - - G V E Y V D H W S Y V D S I Y E T L G N A t v n - - -
h5h5h5h5 h5 h5h5h5h5h5h5h5  s6 s6 s6 s6 s6 s6 s6?h6h6h6h6h6h6h6h6  h h h h
11VNm F S A I Y P K L A k e - - - - - f D V P L L P F F M E E V Y L K P Q W - - - - -
h5h5h5h5h5 h5 h5h5h5h5h5h5h5  h5 s6 s6 s6 s6? h6 h6 h6 h6h6  s
P10480m Y H N Q L L L N L A I q l a p t g m v k l f e i D K Q F A E M L R D P Q N F G L S D Q R N a c y g g

1DEO - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
11Vn - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
P10480 g g s y v w k p f a s i s a s t d s q l s a f n p q e r l a i a g n p l l a q a v a s p m a a r s a
1DEOm - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
11VNm - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
P10480m s y v w k p f a s i s a s t d s q l s a f n p q e r l a i a g n p l l a q a v a s p m a a r s a s t

1DEO - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
11Vn - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
P10480 s t l n c e g k m f w d q v h e p t t v v h a a l s e p a a t f i e s q y e f l a h -
1DEOm - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
11VNm - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - - -
P10480m l n c e g k m f w d q v h e p t t v v h a a l s e p a a t f i e s q y e f l a h -

```

FIGURA 51

```

10      20      30      40      50
60
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
LIVN_A      4 LLILGDSL SAG-----YRMSASA AWPALLNDKWqsk---
----- 34
P10480      28
IVMFGDSLSDTgkmysk mrgylpssppyyeGRFSNGP VWLEQLTNEFPGLTianeae ggp 87

70      80      90      100     110
120
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
LIVN_A      35 -tsvVNASISGDT-----
SQQGLARLPALLKQHQRW 65
P10480      88 tavaYNKISWNPkyq-----
vINNL DYEVTQFLQKDSFKPDDL 125

130     140     150     160     170
180
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
LIVN_A      66 VLVELGGNDG-----
LRGFQPQQTEQT 87
P10480      126 VILWVGANDY-----LA--
YGWNT EQDAKRVRDA 152

190     200     210     220     230
240
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
LIVN_A      88 LRQILQDVKaANAEPllmqiRLPANYGR-----
----- 115
P10480      153 ISDAANRMV-LNGAK-----EILLFNLPdlg-----
----qnP 180

250     260     270     280     290
300
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
LIVN_A      116 -----RYNEAFSAIYPKLAke-----
fdVPLLPFFME 142
P10480      181 SARSQKVVEAASHVSAYHNQLLLNLArqlaptg-----
mvklfeidKQFAEMLRD 230

310     320     330     340     350
360
.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|.....*.....|
LIVN_A      143 EVYLKPQW-----
----- 150
P10480      231
PQNFGLS DQRNacyggsyv wkpfasrsastdsq lsafnpqerlaiagnp llaqavaspma 290

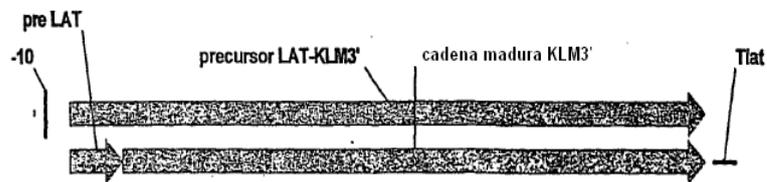
370     380     390     400
LIVN_A      151 -----MQDDGI-----HPNRDAQPFIADWM 170
P10480      291 arsastlnc egkMFWDQV-----HPTTVVHAALSEPA 322

```

FIGURA 52

		1		50
P10480	(1)	MKKWFVCLLGLVALTVQAADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP		
A. sal	(1)	-----ADTRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP		
A. hyd	(1)	-----ADSRPAFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP		
Consenso	(1)	AD*RPFSRIVMFGDSLSDTGKMYSKMRGYLP		
		51		100
P10480	(51)	SSPPYYEGRFSNGPVWLEQLTNEFPGLTIANEAEAGGPTAVAYNKISWNEK		
A. sal	(33)	SSPPYYEGRFSNGPVWLEQLTKQFPGLTIANEAEAGGATAVAYNKISWNEK		
A. hyd	(33)	SSPPYYEGRFSNGPVWLEQLTKQFPGLTIANEAEAGGATAVAYNKISWNEK		
Consenso	(51)	SSPPYYEGRFSNGPVWLEQLT**FPGLTIANEAEAGG*TAAYNKISWNEK		
		101		150
P10480	(101)	YQVINNLDEYVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLYAGWNTQQDAKRVR		
A. sal	(83)	YQVINNLDEYVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLYAGWNTQQDAKRVR		
A. hyd	(83)	YQVINNLDEYVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLYAGWNTQQDAKRVR		
Consenso	(101)	YQVINNLDEYVTQFLQKDSFKPDDLVLWVGANDYLYAGWNTQQDAKRVR		
		151		200
P10480	(151)	DAISDAANRMVINGAKEILLFNLPDLGQNPFSARSQKVVEAVSHVSAYHNQ		
A. sal	(133)	DAISDAANRMVINGAKQILLFNLPDLGQNPFSARSQKVVEAVSHVSAYHNQ		
A. hyd	(133)	DAISDAANRMVINGAKQILLFNLPDLGQNPFSARSQKVVEAVSHVSAYHNQ		
Consenso	(151)	DAISDAANRMVINGAK*ILLFNLPDLGQNPFSARSQKVVEA*SHVSAYHN*		
		201		250
P10480	(201)	LLLNLARQLAFTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDQRNACYGGSYVW		
A. sal	(183)	LLLNLARQLAFTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDVENPCYDGGYVW		
A. hyd	(183)	LLLNLARQLAFTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSDVENPCYDGGYVW		
Consenso	(201)	LLLNLARQLAFTGMVKLFEIDKQFAEMLRDPQNFGLSD**N*CY*G*YVW		
		251		300
P10480	(251)	KPFASRSASTDQLSAFNPQERLAIAGNPILAQAVASPMARRSASTINCE		
A. sal	(233)	KPFATRSVSTDRQLSAFNPQERLAIAGNPILAQAVASPMARRSASPINCE		
A. hyd	(233)	KPFATRSVSTDRQLSAFNPQERLAIAGNPILAQAVASPMARRSASPINCE		
Consenso	(251)	KPFA*RS*STD*QLSAF*PQERLAIAGNPILAQAVASPMA*RSAS*INCE		
		301		336
P10480	(301)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSEPAATFIESQYEFIAH-		
A. sal	(283)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSERAAATFIETQYEFIAH		
A. hyd	(283)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSERAAATFLANQYEFIAH-		
Consenso	(301)	GKMFWDQVHPTTVVHAALSE*AATFI**QYEFIAH*		

FIGURA 53



Construcción génica para la expresión de KLM3'

1.182 pb

FIGURA 54

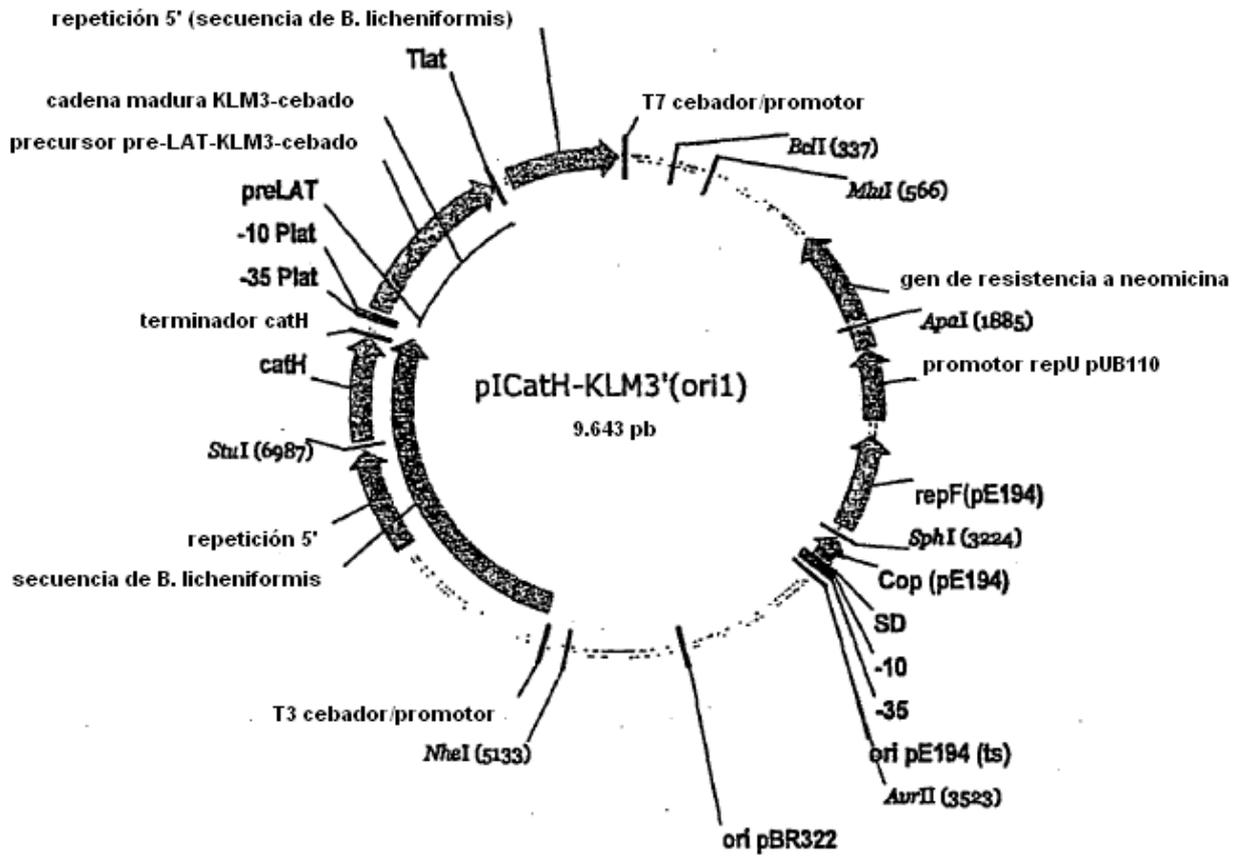


FIGURA 55

-35

1 GCTTTTCTTT TGGAAACAAA TATAGGGAAA ATGGTACTTG TTAAAAATTC GGAATATTTA
CGAAAAGAAA ACCTTCTTTT ATATCCCTTT TACCATGAAC AATTTTTAAG CCTTATAAAT
-10 M K Q Q K R L .
61 TACAAATCA TATGTTTCAC ATTGAAAGGG GAGGAGAATC ATGAAACAC AABAACGGCT
ATGTTATAGT ATACAAAGTG TAACTTTCCC CTCCTTTAG TACTTTGTG TTTTTCGCGA
* Y A R L L T L L F A L I F L L P H S A A .
121 TTACGCCCGA TTGCTGACGC TGTATTTCG GCTCATCTTC TTGCTGCCTC ATTCTGCAGC
AATGCGGGCT AACGACTGCG ACAATAAACG CGAGTAGAAG AACGACGGAG TAAGACGTCG
* S A A D T R P A F S R I V M F G D S L S .
181 TTCAGCAGCA GATACAAGAC CGGCGTTTAC CCGGATCGTC ATGTTTGGAG ATAGCCTGAG
AAGTCGTCGT CTATGTTCTG GCCGCAAATC GGCCTAGCAG TACAACCTC FATCGGACTC
* D T G K M Y S K M R G Y L P S S P P Y Y .
241 CGATACGGGC AAAATGTATA GCAAAATGAG AGGCTATCTT CCGTCAAGCC CGCCGTATTA
GCTATGCCCG TTTTACATAT CGTTTACTC TCCGATAGAA GGCAGTTCGG GCGGCATAAT
* E G R F S N G P V W L E Q L T K Q F P G .
301 TGAAGGCCGC TTTAGCAATG GACCGGTCTG GCTGGAACAA CTGACGAAAC AATTTCCGGG
ACTTCCGGCG AAATCGTTAC CTGGCCAGAC CGACCTTGTG GACTGCTTTG TTAARAGGCC
* L T I A N E A E G G A T A V A Y N K I S .
361 ACTGACGATC GCTAATGAAG CAGAAGGAGG AGCAACAGCG GTCGCCTATA ACAAATCAG
TGACTGCTAG CGATFACITC GTCTTCCCTC TCGTTGTGCG CAGCGGATAT TGTTTTATG
* W D P K Y Q V I N N L D Y E V T Q F L Q .
421 CTGGGACCCG AAATATCAGG TCATCAACAA CCTGGACTAT GAAGTCACAC AGTTTCTTCA
GACCCCTGGC TTTATAGTCC AGTAGTTGTT GGACCTGATA CTTTCAAGTGG TCAAAGAAGT
* K D S F K P D D L V I L W V G A N D Y L .
481 GAAAGACAGC TTTAAACCGG ATGATCTGGT CATCCTTTGG GTCGGCGCCA ATGATTATCT
CTTCTGTGCG AAATTTGGCC TACTAGACCA GTAGGAARCC CAGCCGCGGT TACTAATAGA
* A Y G W N T E Q D A K R V R D A I S D A .
541 GGCCTATGGC TGGACACAG AACAGATGC CAAAAGAGTC AGAGATGCCA TCAGCAGTGC
CCGCATACCG ACCTTGTGTC TTGTTCTACG GTTTTCTCAG TCTCTACGGT AGTCGCTACG
* A N R M V L N G A K Q I L L F N L P D L .
601 CGCTAATAGA ATGGTCTGTA ACGGCGCCAA ACAARTCCTG CTGTTTAACC TGCCGGATCT
GCGATTATCT TACCAGGACT TGCCGCGGTT TGTTTAGGAC GACAAATTGG ACGGCCTAGA
* G Q N P S A R S Q K V V E A V S H V S A .
661 GGGACAAAAT CCGAGCGCCA GAAGCCAAA AGTCGTCGAA GCAGTCAGCC ATGTCAGCGC
CCCTGTTTTA GGCTCGCGGT CTTGCGTTTT TCAGCAGCTT CGTCAGTCCG TACAGTCGCG
* Y H N K L L L N L A R Q L A P T G G M V K .
721 CTATCATAAC AAACCTGCTG TGAACCTGGC AAGACAATTG GCACCGACGG GAATGGTTAA
GATAGTATTG TTTGACGAGC ACTTGGACCG TTCGTTTAAC CGTGGCTGCC CTTACCAATT
* L F E I D K Q F A E M L R D P Q N F G L .
781 ATGTTTGA AATTGACAAAC AGTTTGCCGA AATGCTGAGA GATCCGCAA ATTTTGGCCT
TACAAAACCT TAACTGTTG TCAAACGGCT TTACGACTCT CTAGGCGTTT TAAAACCGGA
* S D V E N P C Y D G G Y V W K P F A T R .
841 GAGCGATGTC GAAAACCCGT GCTATGATGG CGGATATGTC TGGAAACCGT TTGCCACAAG
CTCGCTACAG CTTTGGGCA CGATACTACC GCCTATACAG ACCTTTGGCA AACGGTGTTC
* S V S T D R Q L S A F S P Q E R L A I A .
901 AAGCGTCAGC ACGGATAGAC AACTGTCAGC GTTAGCCCG CAAGAAAGAC TGGCAATCGC
TTCGAGTCCG TGCCTATCTG TTGACAGTCC CAAATCGGGC GTTCTTCTG ACCGTTAGCG
* G N P L L A Q A V A S P M A R R S A S P .
961 CGGAAATCCG CTTTGGCAC AAGCAGTTGC TTCACCGATG GCAAGAGAT CAGCAAGCCC
GCCTTTAGGC GAAAACCGTG TTCGTCAACG AAGTGGCTAC CGTTCTCTA GTCGTTCCGG
* L N C E G K M F W D Q V H P T V V H A .
1021 GCTGAATGTC GAAGGCAAAA TGTTTGGGA TCAGGTCCAT CCGACAACAG TTGTCATGC
CGACTTAACG CTTCCGTTTT ACAAAACCTT AGTCCAGGTA GGCTGTGTC AACAGGTACG
* A L S E R A A T F I E T Q Y E F L A H G .
1081 TGCCCTTCA GAAAGAGCGG CGACGTTTAT CGAAACACAG TATGAATTT TGGCCATGG
ACGGGAAAGT CTTTCTCGCC GCTGCAAATA GCTTTGTGTC ATACTTAAAG ACCGGGTACC
*stop
1141 CTGAGTTAAC AGAGGACCGA TTTCTGAAG GAAATCCGTT TTTTTATTTT AAGCTTGGAG
GACTCAATTG TCTCCTGCCT AAAGGACTTC CTTTAGGCAA AAAAAAATAA TTCGAACCTC
1201 ACAAGGTAAA GGATAAACC TCGAG
TGTTCCATT CCTATTTTGG AGCTC

FIG. 56

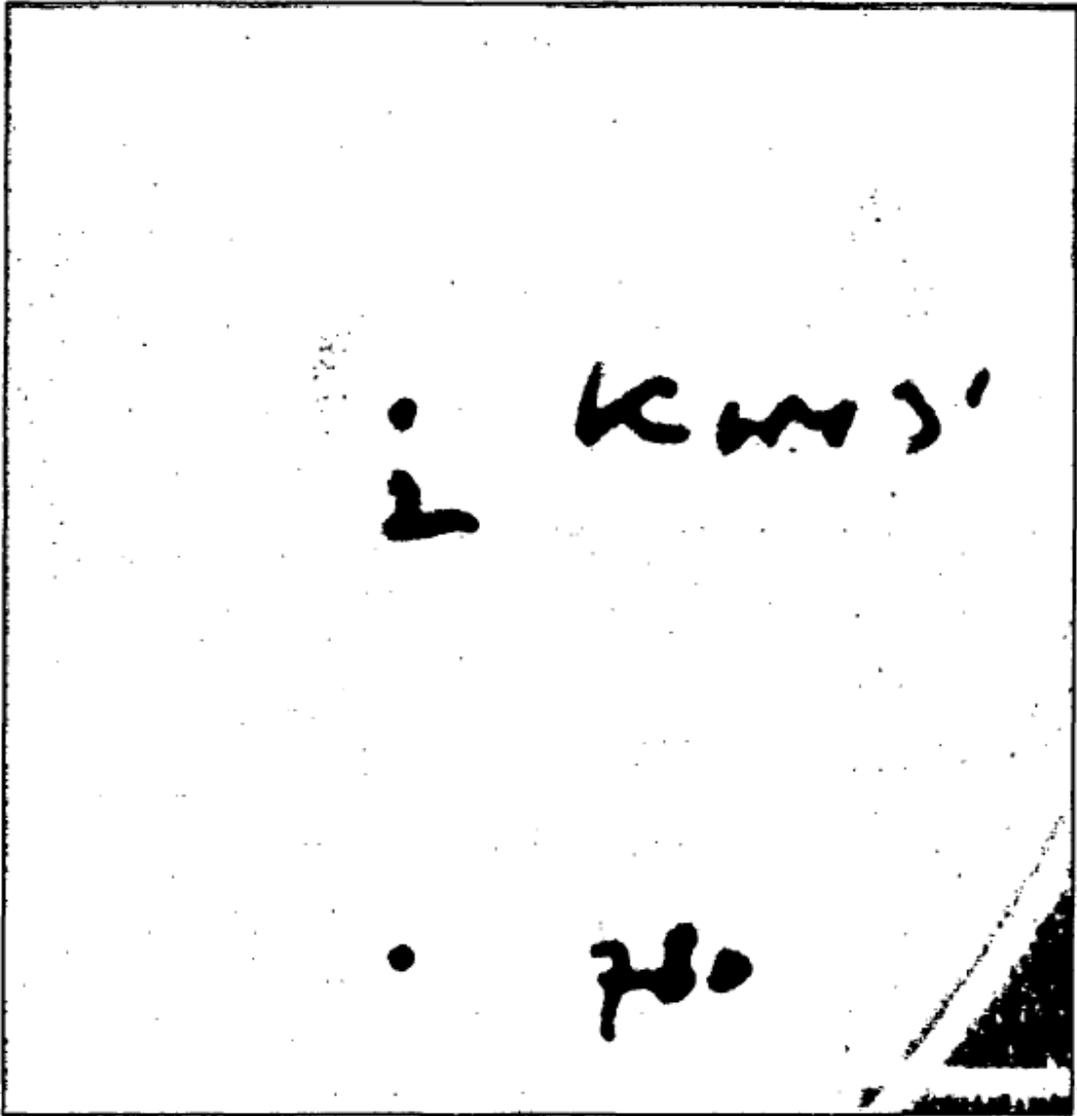


FIGURA 57 (SEQ ID No 49)

```

1   ATGAAACAAC AAAAACGGCT TTACGCCCGA TTGCTGACGC TGTATTTTGC
    TACTTTGTTG TTTTGGCCGA AATGCGGGCT AACGACTGCG ACAATAARCG

51  GCTCATCTTC TTGCTGCCTC ATTCTGCAGC TTCAGCAGCA GATACAAGAC
    CGAGTAGAAG AACGACGGAG TAAGACGTCG AAGTCGTCGT CTATGTCTCG

101 CGGCGTTTAG CCGGATCGTC ATGTTTGGAG ATAGCCTGAG CGATACGGGC
    GCCGCAAATC GGCCTAGCAG TACAAACCTC TATCGGACTC GCTATGCCCG

151 AAAATGTATA GCAAATGAG AGGCTATCTT CCGTCAAGCC CGCCGTATTA
    TTTTACATAT CGTTTTACTC TCCGATAGAA GGCAGTTCGG GCGGCATAAT

201 TGAAGGCCCG TTTAGCAATG GACCGTCTG GCTGGAACAA CTGACGAAAC
    ACTTCCGGCG AAATCGTTAC CTGGCCAGAC CGACCTTGTT GACTGCTTTG

251 AATTTCCGGG ACTGACGATC GCTAATGAAG CAGAAGGAGG AGCAACAGCG
    TTAAGGCCCG TGACTGCTAG CGATTACTTC GTCCTCCTCC TCGTTGTCGC

301 GTCGCCATA ACAAATCAG CTGGGACCCG AAATATCAGG TCATCAACAA
    CAGCGGATAT TGTTTTAGTC GACCCTGGGC TTTATAGTCC AGTAGTTGTT

351 CCTGGACTAT GAAGTCACAC AGTTTCTTCA GAAAGACAGC TTTAARCCGG
    GGACCTGATA CTTCAGTGTG TCAAGAAGT CTTCTGTGCG AAATTTGGCC

401 ATGATCTGGT CATCCTTTGG GTCGGCGCCA ATGATTATCT GCGGTATGGC
    TACTAGACCA GTAGGAARCC CAGCCGCGGT TACTAATAGA CCGCATACCG

451 TGGAACACAG AACAGATGC CAAAGAGTC AGAGATGCCA TCAGCGATGC
    ACCTTGTCG TGTTCTACG GTTTTCTCAG TCTCTACGGT AGTCGCTACG

501 CGCTAATAGA ATGGTCTGA ACGGCGCCA ACAAATCCTG CTGTTTAACC
    GCGATTATCT TACCAGGACT TGCCGCGST TGTTTAGGAC GACAAATTGG

551 TGCCGATCT GGGACAAAAT CCGAGCGCCA GAAGCCAAA AGTCGTCGAA
    ACGGCCTAGA CCCTGTTTTA GGCTCGGGT CTTGCGTTTT TCAGCAGCTT

601 GCAGTCAGCC ATGTCAGCGC CTATCATAC AAATGCTGC TGAACCTGGC
    CGTCACTCGG TACAGTCGCG GATAGTATTG TTTGACGRCG ACTTGGACCG

651 AAGACAATTG GCACCGACGG GAATGGTTAA ATTGTTTGA ATTGACAAAC
    TTCTGTTAAC CGTGGCTGCC CTTACCAATT TAACAACCTT TAAGTGTTTG

701 AGTTTGCCGA AATGCTGAGA GATCCGCAA ATTTGGCCT GAGCGATGTC
    TCRAACGGCT TTACGACTCT CTAGGCGTTT TAAARCCGGA CTCGCTACAG

751 GAAAACCCGT GCTATGATGG CGGATATGTC TGGAAACCGT TTGCCACAAG
    CTTTTGGGCA CGATACTACC GCCTATACAG AÇTTTGGCA AACGGTGTTC

801 AAGCGTCAGC ACGGATAGAC AACTGTCAGC GTTTAGCCCG CAAGAAGAC
    TTCGAGTCG TGCCATCTG TTGACAGTCG CAATCGGGC GTTCTTTCTG

851 TGCAATCGC CGGAAATCCG CTTTGGCAC AAGCAGTTC TTCACGATG
    ACCGTTAGCG GCCTTTAGGC GAAAACCGTG TTCGTACAG AAGTGGCTAC

901 GCAAGAAGAT CAGCAAGCCC GCTGAATTGC GAAGCAAAA TGTTTTGGGA
    CGTCTTCTA GTCGTTCCGG CGACTAACG CTTCCGTTTT ACAAAACCTT

951 TCAGGTCCAT CCGACAACAG TTGTCCATGC TGCCCTTCA GAAGAGCGG
    AGTCCAGSTA GGCTGTGTG AACAGGTACG ACCGGAAAGT CTTTCTCGCC

1001 CGACGTTTAT CGAAACACAG TATGAATTC TGGCCCATGG CTGA
    GCTGCAATA GCTTTGTGTC ATACTTAAAG ACCGGGTACC GACT

```

FIGURA 58 (SEQ ID No. 50)

```

1  ATGAAAAAAT GGTGTGTGTG TTTATTGGGA TTGGTGGCGC 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 GCGCCAAACG ACTATCTGGC CTATGGCTGG
421 AACACAGAGC AGGATGCCAA GCGGGTGGCG GACGCCATCA GCGATGCGGC CAACCCGATG
481 GTGCTGAACG GCGCCAGGA GATACTGCTG TTCAACCTGC CCGATCTGGG CCAGAACCCC
541 TCGGCCCGCA GCCAGAAGGT GGTGAGGGCG GCCAGCCATG TCCTCCGCTA CCACAACCAG
601 CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCT CCCACCGGCA TGGTGAAGCT GTTCGAGATC
661 GACAAGCAGT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT TCGCCCTGAG CGACCAGAGG
721 AACGCCCTGCT ACGGTGGCAG CTATGTATGG AAGCGGTTTG CCTCCCGCAG CGCCAGCACC
781 GACAGCCAGC TCTCCGCCTT CAACCCGCAG GAGCGCCTCG CCATCGCCGG CAACCCGCTG
841 CTGGCCAGG CCGTGGGATG CCCCATGGCT GCCCGCAGCG CCAGCACCCCT CCACTGTGAG
901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTCCACCCC ACCACTGTGC TGCACGCCGC CCTGAGCGAG
961 CCCGCCGCA CCTTCATCGA GAGCCAGTAC GAGTTCCTCG CCCAC

```

FIGURA 59 (SEQ ID No. 51)

```

1  ATGAAAAAAT GGTGTGTGTG TTTATTGGGG TTGATCGCGC TGACAGTTCA GGCAGCCGAC
61  ACTCGCCCCG CCTTCTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA GCCTCTCCGA TACCGGCAAA
121 ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC TCCAGCCCCG CCTACTATGA GGGCCGCTTC
181 TCCAACGGGC CCGTCTGGCT GGAGCAGCTG ACCAAGCAGT TCCCGGGTCT GACCATAGCC
241 AACGAAGCGG AAGGCGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
301 TATCAGGTCT ACAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCCTGCAAAA AGACAGCTTC
361 AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG ACTATCTGGC ATATGGCTGG
421 AATACGGAGC AGGATGCCAA GCGAGTTCGC GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCCGATG
481 GTACTGAACG GTGCCAAGCA GATACTGCTG TTCAACCTGC CCGATCTGGG CCAGAACCCG
541 TCAGCCCGCA GTCAGAAGGT GGTGAGGGCG GTCAGCCATG TCCTCCGCTA TCACAACAAG
601 CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCC CCCACCGGCA TGGTAAAGCT GTTCGAGATC
661 GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTGAT CCGCAGAACT TCGCCCTGAG CGACGTCGAG
721 AACCCCTGCT ACGACGGCGG CTATGTGTGG AAGCGGTTTG CCACCCGCGC CGTGAGCACC
781 GACCGCCAGC TCTCCGCCTT CAGTCCGCAG GAACGCTCG CCATCGCCGG CAACCCGCTG
841 CTGGCACAGG CCGTTGCCAG TCCTATGGCC CGCCGCGAGG CCAGCCCCCT CCACTGTGAG
901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTGC TGCACGCCGC CCTGAGCGAG
961 CGCGCCGCA CCTTCATCGA GACCCAGTAC GAGTTCCTCG CCCACGGATG A

```

FIGURA 60 (SEQ ID No. 52)

```

1  ATGCCGAAGC CTGCCCTTCG CCGTGTCTAT ACCGCGACAG TCGCCGCCGT CGGCACGCTC
61  GCCCTCGGCC TCACCGACGC CACCGCCAC GCCCGGCCG CCCAGGCCAC TCCGACCCCTG
121 GACTACGTGC CCTCGGGCA CAGCTACAGC GCCGGCTCCG GCGTCTGCC CGTCGACCCG
181 GCCAACCTGC TCTGTCTGCG CTCGACGGCC AACTACCCCC ACGTCATCGC GGACACGACG
241 GCGGCCCGCC TCACGGACGT CACCTGCCGC GCGCGCAGA CCGCCGACTT CACGCGGGCC
301 CAGTACCCGG GCGTGCACC CCAGTTGGAC GCGCTCGGCA CCGGCACGGA CTGCGTCCAG
361 CTCACCATCG GCGCAACGA CACAGCACC TTCATCAACG CCATCACGGC CTGCGGCACG
421 GCGGGTGTCC TCAGCGCGCG CAAGGGCAGC CCCTGCAAGG ACAGGCACGG CACCTCCTTC
481 GACGACGAGA TCGAGGCCAA CACGTACCCC GCGCTCAAGG AGGCGCTGCT CCGGCTCCGC
541 GCCAGGGCTC CCCACGCCAG GGTGGCGGCT CTCGGCTACC CGTGGATCAC CCCGGCCACC
601 CGCGACCCGT CCTGCTTCTT GAAGCTCCCC CTCGCGCCG GTGACGTGCC CTACCTGCGG
661 GCCATCCAGG CACACCTCAA CGACGCGGTG CCGCGGGCCG CCGAGGAGAC CCGAGCCACC
721 TACGTGGACT TCTCCGGGTT GTCCGACGGC CACGACGCTT GCGAGGCCCC CGGCACCCGC
781 TGGATCGAAC CGTGTCTCTT CGGGCACAGC CTCGTTCCCG TCCACCCCAA CGCCCTGGGG
841 GAGCGCGCA TGGCCAGCA CACGATGGAC GTCTCGGCC TGGACTGA

```

FIGURA 61 (SEQ ID No. 53)

```

1   TCACTCCAGG CCGAGGACGT CCATCGTGTG CTCGGCCATG CGCCGCTCGC CCAGGGCGTT
61  GGGGTGGACG GGAACGAGGC TGTGCCCGAA GAGCAGCGGT TCGATCCAGC GGGTGCCTGG
121 GGCCTCGGCG GCGTCTGTGG CGTCCGACAC CCCGGAGAAG FCCACGTAGG TGGCTCCGGT
181 CTCCTCGGCG GCCCGCCGGA CCGCGTCGTT GAGGTGTGCC TGGATGGCCC GCAGGTAGGG
241 CACGTCACCG GCGGCGAGGG GGAGCTTCAG GAAGCAGGAC GGGTCGGCGG TGGCCGGGGT
301 GATCCACGGG TAGCCGAGAG CCGCCACCCT GCGGTGGGGA GCCCTGGGCG GGACGCCGAG
361 CAGCGCCTCC TTGAGCGCGG GGTACGTGTT GCCTCGATC TCGTCGTCGA AGGAGGTGCC
421 GTGCTGTCC TTGCAGGGGC TGCCCTTGCC GCGCTGAGG ACACCCGCGG TGCCGAGGC
481 CGTGATGGCG TTGATGAAGG TGCTGTTGTC GTTGCCGCGG ATGGTGAGCG TGACAGGTC
541 CGTGCCGGTG CCGAGCGCGT CCAACTGGGG TCGCAGCGCC GGGTACTGGG CCCGCGTGA
601 GTCGCGCGTC TCGCGCGCGC CGCAGGTGAC GTCGCTGAGG CGGGCGCCCG TCGTGTCCGC
661 GATGACGTGG GGGTAGTGGG CCGTCGAGCG CAGACAGAGC AGGTGGCGG GGTGACGGG
721 CAGGACGCGG GAGCCGGCGC TGTAGCTGTC GCCGAGGGCG ACGTAGTCCA GGGTCGGAGT
781 GGCCTGGGCG GCGCGCGCGT GGGCGGTGGC GTCGGTGAGG CCGAGGGCGA GCGTGCAGC
841 GCGGCGGACT GTCGCGGTCA TGACACGGCG AAGGGCAGGC TTCGGCAT
    
```

FIGURA 62 (SEQ ID No. 54)

```

1   ATGGATTACG AGAAGTTTCT GTTATTGGG GATTCATTA CTGAATTGC TTTTAATACT
61  AGGCCCATTG AAGATGGCAA AGATCAGTAT GCTCTGGAG CCGCATAGT CAACGAATAT
121 ACCAGAAAAA TGGATATTCT TCAAAGAGGG TTCAAAGGGT ACACTTCTAG ATGGGCGTTG
181 AAAATACTTC CTGAGATTTT AAAGCATGAA TCCAAATATG TCATGGCCAC AATATTTTGG
241 GGTGCCAACG ATGCATGCTC AGCAGGTCCC CAAAGTGTC CCCTCCCCGA ATTTATCGAT
301 AATATTCGTC AAATGGTATC TTTGATGAAG TCTTACCATA TCCGTCTAT TATAATAGGA
361 CCGGGGCTAG TAGATAGAGA GAAGTGGGAA AAAGAAAAAT CTGAAGAAAT AGCTCTCGGA
421 TACTTCCGTA CCAACGAGAA CTTTGCCATT TATCCGATG CCTTAGCAA ACTAGCCRAAT
481 GAGGAAAAAG TTCCCTTCGT GGCTTGAAT AAGGCGTTT AACAGGAAGG TGGTATGCT
541 TGGCAACAAC TGCTAACAGA TGGACTGCAC TTTTCCGGAA AAGGGTACAA AATTTTTCAT
601 GACGAATTAT TGAAGGTCA TGAACATTC TACCCCAAT ATCATCCCA AAACATGCAG
661 TACAACTGA AAGATTGGAG AGATGTGCTA GATGATGGAT CTAACATAAT GTCTTGA
    
```

FIGURA 63 (SEQ ID No. 55)

```

atgaacctgc gtcaatggat gggcgccgcc acggtgccc ttgcctggg cttggccgcg      60
tgcgggggcy gtgggaccya ccagagcggc aatcccaatg tcgccaaggt gcagcgcaty      120
gtggtgttcg gcgacagcct gagcgatc   ggcacctaca cccccgtcgc gcagcggtg      180
ggcgcgccga agttcaccac caaccgggc ccgatctggg ccgagaccgt ggccgcgcaa      240
ctgggcgtga cgctcacgcc ggcggtgat ggetacgcca cctccgtgca gaattgcccc      300
aaggccggct gcttcgacta tgcgcagggc ggetcgcgcy tgaccgatcc gaacggcatc      360
ggccacaacg gcggcgcggg ggcgctgacc taccggttc agcagcagct cgccaacttc      420
tacgcggcca gcaacaacac attcaacggc aataacgatg tcgtcttcgt gctggccggc      480
agcaacgaca ttttctctg gaccactgcy gcgccacca gcggtccgg cgtgacgccc      540
gccattgcca cggcccaggt gcagcaggcc gcgacggacc tggtcggcta tgtcaaggac      600
atgatcgcca aggtgcyac gcaggtctac gtgtcaacc tgcccagacg cagcctgacg      660
ccggacggcy tggcaagcgg cacgaccggc caggcgtcgc tgcacgcgct ggtgggacg      720
ttcaaacgca cgctgcaaag cgggctggcc ggcacctcgg cgcgcatcat cgaettcaac      780
gcacaactga ccgcgcgcat ccagaatggc gcctcgttcg gcttcgcca caccagcgcc      840
cgggctcgcg acgccaccaa gatcaatgcc ctggtgccga gcgcccggcg cagctcgtg      900
ttctgctcgg ccaacacgct ggtggcttcc ggtcggacc agagctacct gttcggcgac      960
ggcgtgcacc cgaccacggc cggccatcgc ctgatcgcca gcaacgtgct ggcgcgctg      1020
ctggcggata acgtcgcgca ctga
    
```

FIGURA 64 (SEQ ID No. 56)

```

1  gtgatcgggt  cgtacgtggc  ggtgggggac  agcttcaccg  agggcgtcgg  cgacccccggc
61  cccgacgggg  cgttcgtcgg  ctgggcccgc  cggctcggcg  tactgctcgc  ggaccggcgc
121  cccgagggcg  acttcacgta  cacgaacctc  gccgtgcgcg  gcaggctcct  cgaccagatc
181  gtggcggaac  aggtccccgc  ggtcgtcggg  ctgcgcccgc  acctcgtctc  gttcggggcg
241  ggcggcaacg  acatcatccg  gcccgccacc  gatcccgcag  aggtcgccga  gcggttcgag
301  ctggcgggtg  ccgcgctgac  cgccgcggcc  ggaaccgtcc  tggtgaccac  cgggttcgac
361  acccgggggg  tgcccgtcct  caagcacctg  cgcggaaga  tcgccacgta  caacgggcac
421  gtcggcgcca  tcggcgaccg  ctacggctgc  ccggtgctcg  acctgtggtc  gctcgggagc
481  gtcagggacc  gcaggggctg  ggacgcccgc  cggctgcacc  tgcgcccgga  ggggcacacc
541  cgggtggcgc  tgcgcggggg  gcaggccctg  ggctgcgcg  tcccggccga  cctgaccag
601  cctgcccgc  cctgcccgc  gcgcgccacg  ctgcacgtcc  ggcgcgacga  cgtgactggg
661  gcgcgcgagt  acctgggtcc  gtggatcggg  cgccggtcgc  ggggcgagtc  gtcgggcgac
721  cacgtgacgg  ccaaggggac  gctgtcggcg  gacgccatca  agacgaggat  cgccgcggtg
781  gcctga
    
```

FIGURA 65 (SEQ ID No. 57)

```

1  atgcagacga  accccgcgta  caccagtctc  gtcgcccgtc  gcgactcctt  caccgagggc
61  atgtcggacc  tgetgcccga  cggctcctac  cgtggctggg  ccgacctcct  cgccaccggg
121  atggcggccc  gctcccccg  cttccggtac  gccaacctgg  cggtgccggg  gaagtgatc
181  ggacagatcg  tcgacgagca  ggtggacgtg  gccgcccga  tgggagccga  cgtgatcacg
241  ctggtcggcg  ggtcaacga  cacgctgcgg  cccaagtgcg  acatggcccg  ggtcggggac
301  ctgctgaccc  aggccgtgga  acggctcggc  ccgcaactcg  agcagctggt  gctgatcgcg
361  agtcccggtc  gccagggtcc  ggtgctggag  cgcttcggc  ccgcgatgga  ggcctgttc
421  gccgtgatcg  acgacctggc  cggcgggcac  ggcccgctgg  tcgtcgacct  gtaccggggc
481  cagtccgtgg  ccgacctcgc  gatgtgggac  gtggaccggc  tcacactgac  cgccgagggc
541  caccgcccgg  tcgcgagggc  ggtgtggcag  tcgctcggcc  acgagcccga  ggaccccag
601  tggcacgcgc  cgatcccggc  gacgcccgcg  ccgggggtgg  tgacgcgag  gaccgcgac
661  gtcgggttcg  cccggcagca  cctgctgccc  tggataggcc  gcaggctgac  cggcgctcgc
721  tccggggacg  gcctgcccgc  caagcggccc  gacctgctgc  cctacgagga  ccccgcacgg
781  tga
    
```

FIGURA 66 (SEQ ID No. 58)

```

1  atgacccggg  gtcgtgacgg  ggtgcccggg  gcgcccccca  ccaagcaccg  tgcctgtctc
61  gcggcgatcg  tcacctgat  agtggcgatc  tccgcggeca  tatacgccgg  agcgtccgcg
121  gacgacggca  gcagggacca  cgcgctgcag  gccggaggcc  gtctcccacg  aggagaccgc
181  gcccccgcgt  ccaccgggtc  ctgggtgggc  gcctgggcca  ccgcaccggc  cgcggccgag
241  ccgggcaccg  agacgaccgg  cctggcgggc  cgctccgtgc  gcaacgtcgt  gcacacctcg
301  gtcggcggca  ccggcgcgcg  gatcaccctc  tcgaacctgt  acgggcagtc  gccgtgacc
361  gtcacacacg  cctcgatcgc  cctggcccgc  gggcccgaca  ccgcccggc  gatcggcgc
421  acctgcccgc  ggtcaccctt  cggcggcagc  gccgggtgga  tcaccccggc  gggcgggca
481  gtgatgagcg  acaccgccc  cctcggcacc  ccctacgggg  cgaacgtcct  ggtcaccacg
541  tactccccca  tcccgtccgg  gccggtgacc  taccatccgc  aggcccgga  gaccagctac
601  ctggccgacg  gcgaccgcac  ggcggacgtc  accgcccgtc  cgtacaccac  ccccacgccc
661  tactggcgct  acctgaccgc  cctcgacgtg  ctgagccacg  aggccgacgg  cacggtcgtg
721  gcgttcggcg  actccatcac  cgacggcgcc  cgctcgaga  gcgacgcaa  ccaccgtgg
781  accgacgtcc  tcgcccacg  cctgcacgag  gcggcggggc  acggcggga  cacgccccgc
841  tacagcgtcg  tcaacgagg  cateagcggc  aaccggctcc  tgaccagcag  gccggggcgg
901  ccggccgaca  acccgagcgg  actgagccgg  ttccagcggg  acgtgctgga  acgaccaaac
961  gtaaggccg  tcgtcgtcgt  cctcggcgtc  aacgacgtcc  tgaacagccc  ggaactcggc
1021  gaccgcgacg  ccatacctgac  cggcctgcgc  accctcgtcg  accgggcgca  cgcccgggga
1081  ctgcccgtcg  tcggcgccac  gatcacgccc  ttccggcggt  acggcggcta  caccgaggcc
1141  cgcgagacga  tcgggacgga  ggtcaacgag  gagatccgct  ccggccgggt  cctcgacacg
1201  gtcgtcgaet  tcgacaagg  cctgcgcgac  ccgtacgacc  cgcgcgggat  cgctccgac
1261  tacgacagcg  gcgaccacct  gcaccccggc  gacaaggggt  acgcgcgat  gggcggggtc
1321  atcgacctga  ccgcgctgaa  gggcgcggcg  ccggtcaagg  cgtag
    
```

FIGURA 67 (SEQ ID No. 59)

```

1 atgacgagca tgtcaggggc gagggtggcg cggcggatcg cggccggcgc ggcgtacggc
61 ggcggcggca tcggcctggc gggagcggcg gcggtcggtc tgggtggggc cgagggtcag
121 ctggccagac gcagggtggg ggtgggcacg ccgaccggg tgccgaacgc gcagggactg
181 tacggcggca ccctgcccac ggccggcggc ccgcccgtgc ggctgatgat gctggggcagc
241 tccacggccg ccgggcaggg cgtgcaccgg gccgggcaga cggccggcgc gctgctggcg
301 tccgggctcg cggcgggtgg ggagcggccg gtgcggctgg ggtcggctgc ccagccgggg
361 gcgtgctcgg acgacctgga ccggcagggtg gcgctggtgc tcgccgagcc ggaccgggtg
421 cccgacatct gcgtgatcat ggtcggcggc aacgacgtca cccaccggat gccggcgacc
481 cgtcgggtgc ggcacctgtc ctccggcgta cggcggctgc gcacggccgg tcgggaggtg
541 gtggtcggca cctgtccgga cctgggcacg atcgagcggg tgcggcagcc gctgcgctgg
601 ctggcccggc gggcctcacg gcagctcggc gcggcacaga ccatcggggc cgtcgagcag
661 ggcgggcgca cgggtgctcct gggcaccctg ctgggtccgg agttcggcga gaaccocgg
721 gagctcttcg gcccgcgaaa ctaccacccc tccgcccagg ggtacggcac ggcggcagtg
781 gcgggtactgc cctcgggtg gcggcgctc ggcctgtggc cggccgacga ggaaccocgg
841 gacgcgctgc gccgcgagg ctctcctgcc gtggcggcgg cggcggcggg ggcggcgtcc
901 gaggcgggta cggaggtcgc cggcccatg cctaccgggg ctccgggggc ctggggcgtg
961 ctgaagcgcc ggagacggcg tcgggtgctg gaggcggaac cgtccagccc gtcggcgctt
1021 tga

```

FIGURA 68 (SEQ ID No. 60)

```

1 atgggtcgag ggacggacca gggacggcg tacggccgtc gccgggcggc tgtcgcgctc
61 gccgccctga ccgcccggct cctgggctgg ggcgtggggc gctgcgactc cgtggggcgc
121 gactcaccgg ctocctccgg cagcccgtcg aagcggacga ggacggcggc cgctggggac
181 accagcccgg cgtccgtcgc cgcctggggc gactccatca cgcggcggct cgagcctgt
241 gcggtgctgt cggactgccc ggaaggtgctg tggcgagccg gcagcagcgc gaaggtcgac
301 tcgctggcgg tacggctgct ggggaaggcg gacggcggcg agcacagctg gaactacgg
361 gtcaccgggg cccggatggc ggacctgacc gctcaggtga cgcgggcggc gcagcgcag
421 ccggagctgg tggcggctgat ggcggggcgg aacgacggct gccggctccac gacctcggcg
481 atgacggcgg tggcggactt ccgggcggcag ttcgaggagg cgatggccac cctgcgcaag
541 aagctcccc aggcgcaggt gtacgtgctg agcatcccgg acctcaagcg gctctggtcc
601 cagggccgca ccaaccgctt gggcaagcag gtgtggaagc tcggcctgtg cccgtcgtatg
661 ctggggcagc cggactccct ggactcggcg gcgaccctgc ggcgcaaac ggtgcgagc
721 cgggtggcgg actacaacga ggtgctgcgg gaggctcgcg cgaaggaccg cgggtgccc
781 agcagcagc gcgcggtgca cgagttccgg ttcggcacgg accagttgag ccactgggac
841 tggttccacc cgagtgtaga cggccaggcc cggctggcgg agatcgcta ccgcccggtc
901 accgcaaga atccctga

```

FIGURA 69 (SEQ ID No. 61)

```

1 ttcatcaca cgatgtcaca acaccggcca tccgggtcat. ccctgatcgt gggaaatgggt
61 gacaagcctt cccgtgacga aagggtcctg ctacatcaga aatgacagaa atcctgctca
121 gggaggttcc atgagactgt cccgacgcgc gggccagggc tcgcgctcc tcctcaccoc
181 ggcgctcgcg ctcttcggcg ctagcgcgcg cgtgtcccg cgcgcaatcc aggccaccga
241 ctacgtggcc ctccggact cctactctc gggggtcggc gggggcagct acgacagcag
301 cagtggctcc tgaagcgca gcaccaagt ctaccggcc ctgtggggcg cctcgcacac
361 cggtagcggc ttcaacttca ccgctgttc gggcgcccgc acaggagagc tgcggccaa
421 gcagctgacc ccggtcaact ccggcaccga cctggtcagc attaccatcg gcggcaacga
481 cgcgggcttc gccgacacca tgaccacctg caacctccag ggcgagagcg cgtgctggc
541 gcggatcgcc aaggcgcggc cctacatcca gcagacgtg cccgccagc tggaccaggt
601 ctacgacgcc atcgacagcc gggcccccgc agcccaggte gtcgtcctgg gctaccocgg
661 ctcttacaag ctgggcggca gctgcgccgt cggctctctg gagaagtccc gcgcccgat
721 caacggccc gccgacgaca tcaacgcctg caccgccaag cgcgcggccg accaccgctt
781 cgccttcggg gacgtcaaca cgacctcgc gggcagcag ctgtgctccg gcgcccttg
841 gctgcacagc gtcacccttc ccgtggagaa ctccatccac cccacggcca acggacagtc
901 caagggttac ctgcccgtcc tgaactccgc cacctgatct cgcggctact ccgccctga
961 cgaagtccc cccccggcg gggcttcgcc gtagggtgdc gtaccggcct cgcccgtcgc
1021 gccggtggcc ccgcccgaag tgcggccgcc cccggacggc gtcggttc

```

FIGURA 70 (SEQ ID No. 62)

```

1  ATGAAAAAAT GGTTCGTGTG TTTATTGGGA TTGGTCGGCG TGACAGTCA
   TACTTTTTTA CCAAACACAC AAATAACCCT AACCAGCGCG ACTGTCRAGT

51  GGCAGCCGAC AGTCGCCCCG CCTTTTCCCG GATCGTGATG TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG TCAGCGGGGC GAAAAGGGC CTAGCACTAC AAGCCGCTGT

101 GCCTCTCCGA TACCGGCAA ATGTACAGCA AGATGCGCGG TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT ATGGCCGTTT TACATGTCGT TCTACGCGCC AATGGAGGGG

151 TCCAGCCCGC CCTACTATGA GGGCCGTTTC TCCAACGGAC CCGTCTGGCT
   AGGTGCGGCG GGATGATACT CCCGGCAAAG AGGTTGCCCTG GGCAGACCGA

201 GGAGCAGCTG ACCAAACAGT TCCCGGGTCT GACCATCGCC AACGAAGCGG
   CCTCGTCGAC TGGTTGTCA AGGGCCAGA CTGGTAGCGG TTGCTTCGCC

251 AAGGCGGTGC CACTGCCGTG GCTTACAACA AGATCTCCTG GAATCCCAAG
   TTCCGCCACG GTGACGGCAC CGAATGTTGT TCTAGAGGAC CTTAGGGTTC

301 FATCAGGTCA TCAACAACCT GGACTACGAG GTCACCCAGT TCTGTCAGAA
   ATAGTCCAGT AGTTGTTGGA CCTGATGCTC CAGTGGGTCA AGAARCTCTT

351 AGACAGCTTC AAGCCGGACG ATCTGGTGAT CCTCTGGGTC GGTGCCAATG
   TCTGTCGAAG TTCGGCCTGC TAGACCACTA GGAGACCCAG CCACGGTTAC

401 ACTATCTGGC CTATGGCTGG AACACGGAGC AGGATGCCRA GCGGGTTCGC
   TGATAGACCG GATACCGACC TTGTCCCTCG TCCTACGGTT CGCCCAAGCG

451 GATGCCATCA GCGATGCGGC CAACCGCATG GFACTGAACG GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT CGCTACGCGG GTTGGCGTAC CATGACTTGC CACGGTTCGT

501 GATACTGCTG TTCAACCTGC CGGATCTGGG OCAGAACCAG TCAGTCTGCA
   CTATGACGAC AAGTTGGACG GCCTAGACCC GGTCTTGGGC AGTCGAGCGT

551 GTCAGAAGGT GGTGAGGCGG GTCAGCCATG TCTCCGCTA TCACAACCAG
   CAGTCTTCCA CCAGCTCCGC CAGTCGGTAC AGAGGCGGAT AGTGTGGTTC

601 CTGCTGCTGA ACCTGGCAGC CCAGCTGGCC CCCACCGGCA TGGTAAAGCT
   GACGACGACT TGGACCGTGC GGTGACCCGG GGGTGGCCGT ACCATTTCGA

651 GTTCGAGATC GACAAGCAAT TTGCCGAGAT GCTGCGTAT CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG CTGTTCTGTTA AACGGCTCTA CGACGCACTA GCGTCTTGA

701 TCGGCCTGAG CGACGTCGAG AACCCCTGCT ACGACGGCGG CTATGTGTGG
   AGCCGGACTC GCTGCAGCTC TTGGGGACGA TGCTGCCGCC GATACACACC

751 AAGCCGTTG CCACCCGACG CGTCAGCACC GACCGCCAGC TCTCCGCCTT
   TTCGGCAAAC GGTGGGCGTC GCAGTCGTGG CTGGCGGTCG AGAGGCGGAA

801 CAGTCCGACG GAACGCTCGC CCATCGCCGG CAACCGCTG CTGGCAGG
   GTCAGGCGTC CTTGCGGAGC GGTAGCGGCC GTTGGGCGAC GAOCGTGTCC

851 CCGTTGCCAG TCCTATGGCC CGCCGACGCG CCAGCCCCCT CACTGTGAG
   GGCAACGGTC AGGATACCGG GCGGCGTCGC GGTGCGGGGA GTTGACACTC

901 GGCAAGATGT TCTGGGATCA GGTACACCCG ACCACTGTG TGCACGCAGC
   CCGTTCTACA AGACCCTAGT CCATGTGGGC TGGTGACAGC ACCTGCGTGC

951 CCTGAGCGAG CGCGCCGCCA CCTTCATCGC GAACCACTAC GAGTTCCTCG
   GGACTCGCTC GCAGCGCGGT GGAAGTAGCG CTTGGTCATG CTCAGGAGC

1001 CCCAC TGA
      GGGTG ACT

```

FIGURA 71 (SEQ ID No. 63)

```

1  ATGAAAAAAT  GGTTCGTTTG  TTTATTGGGG  TTGATCGCGC  TGACAGTTCA
   TACTTTTTTA  CCAACAACAC  AAATAACCCC  AACTAGCGCG  ACTGTCAAGT

51  GGCAGCCGAC  ACTCGCCCCG  CCTTCTCCCG  GATCGTGATG  TTCGGCGACA
   CCGTCGGCTG  TGAGCGGGGC  GGAAGAGGGC  CTAGCACTAC  AAGCCGCTGT

101  GCCTCTCCGA  TACCGGCAA  ATGTACAGCA  AGATGCGCGG  TTACCTCCCC
   CGGAGAGGCT  ATGCCGTTT  TACATGTCGT  TCTACGCGCC  AATGGAGGGG

151  TCCAGCCCGC  CCTACTATGA  GGGCCGTTTC  FCCAACGGAC  CCGTCTGGCT
   AGGTCCGGCG  GGATGATACT  CCCGGCAAAG  AGGTGCGCTG  GGCAGACCGA

201  GGAGCAGCTG  ACCAAGCAGT  TCCCGGGTCT  GACCATCGCC  AACGAAGCGG
   CCTCGTCGAC  TGGTTCGTCA  AGGGCCAGA  CTGGTAGCGG  TTGCTTCGCC

251  AAGGCGGTGC  CACTGCCGTG  GCTTACAACA  AGATCTCCTG  GAATCCCAAG
   TTCGCCACG  GTGACGGCAC  CGAATGTTGT  TCTAGAGGAC  CTTAGGGTTC

301  TATCAGGTCA  TCAACAACCT  GACTACGAG  GTCACCCAGT  TCTTGCGAGAA
   ATAGTCCAGT  AGTTGTTGGA  CCTGATGCTC  CAGTGGGTCA  AGAACGTCTT

351  AGACAGCTTC  AAGCCGGACG  ATCTGGTGAT  CCTCTGGGTC  GGTGCCAATG
   TCTGTGGAAG  TTCGGCCTGC  TAGACCACTA  GGAGACCCAG  CCACGGTTAC

401  ACTATCTGGC  ATATGGCTGG  AATACGGAGC  AGGATGCCAA  GCGAGTTCCG
   TGATAGACCG  TATACCGACC  TTATGCCTCG  TCCTACGGTT  CGCTCAAGCG

451  GATGCCATCA  GCGATGCGGC  CAACCGCATG  GTACTGACCG  GTGCCAAGCA
   CTACGGTAGT  CGCTACGCCG  GTTGGCGTAC  CATGACTTGC  CACGGTTCGT

501  GATACTGCTG  TTCAACCTGC  CGGATCTGGG  CCAGAACCCG  TCAGCCCGCA
   CTATGACGAC  AAGTTGGACG  GCCTAGACCC  GGTCTTGGGC  AGTCGGGCGT

551  GTCAGAAGGT  GGTTCGAGCG  GTCAGCCATG  TCTCCGCTTA  TCACAACAAG
   CAGTCTTCCA  CCAGCTCCGC  CAGTCGGTAC  AGAGGCGGAT  AGTGTGTTC

601  CTGCTGCTGA  ACCTGGCAGC  CCAGCTGGCC  CCCACCGGCA  TGGTAAAGCT
   GACGACGACT  TGGACCGTGC  GGTGACCCGG  GGGTGGCCGT  ACCATTTCGA

651  GTTCGAGATC  GACAAGCAAT  TTGCCGAGAT  GCTGCGTGAT  CCGCAGAACT
   CAAGCTCTAG  CTGTTCGTTA  AACGGCTCTA  CGACGCACTA  GGCCTCTTGA

701  TCGGCCTGAG  CGACGTCGAG  AACCCCTGCT  ACGACGGCGG  CTATGTGTGG
   AGCCGGACTC  GCTGCAGCTC  TTGGGGACGA  TGCTGCCGCC  GATACACACC

751  AAGCCGTTTG  CCACCCGACG  CGTCAGCACC  GACCGCCAGC  TCTCCGCCTT
   TTCGGCAAC  GGTGGGCGTC  GCAGTCGTGG  CTGGCGGTGC  .AGAGGCGGAA

801  CAGTCCGCAG  GAACGCCTCG  CCATCGCCGG  CAACCCGCTG  CTGGCACAGG
   GTCAGGCGTC  CTTGCCGAGC  GGTAGCCGGC  GTTGGGCGAC  GACCGTGTCC

851  CCGTTGCCAG  TCCTATGGCC  CGCCGACGCG  CCAGCCCCCT  CAACTGTGAG
   GGCACCGTTC  AGGATACCGG  GCGGCGTCGC  GGTCCGGGGA  GTTGACACTC

901  GGCAAGATGT  TCTGGGATCA  GGTACACCCG  ACCACTGTGC  TGCACGACGC
   CCGTTCTACA  AGACCTAGT  CCATGTGGGC  TGGTGCACGC  ACGTGCCTCG

951  CCTGAGCGAG  CGCCCGCCA  CCTTCATCGA  GACCCAGTAC  GAGTTCCTCG
   GGACTCGCTC  GCGGCGCGGT  GGAAGTAGCT  CTGGGTGATG  CTCAGGAGGC

1001  CCCACGGATG  A
      GGGTGCCTAC  T

```

FIGURA 72 (SEQ ID No. 24)

```

1  ATGTTTAAGT  FTAAAAAGAA  TTTCTTAGTT  GGATTATCGG  CAGCTTTAAT
   TACAAATCA  AATTTTTCTT  AAAGAATCAA  CCTAATAGCC  GTCGAARATTA

51  GAGTATTAGC  TTGTTTTTCGG  CAACCGCCTC  TGCAGCTAGC  GCCGACAGCC
   CTCATAATCG  AACAAAAGCC  GTTGGCGGAG  ACGTCGATCG  CGGCTGTCCG

101  GTCCCGCCTT  TTCCCGGATC  GTGATGTTCG  GCGACAGCCT  CTCCGATACC
   CAGGGCGGAA  AAGGGCCTAG  CACTACAAGC  CGCTGTCCGA  GAGGCTATGG

151  GGCAAAATGT  ACAGCAAGAT  GCGCGGTTAC  CTCCCTCCA  GCCCGCCCTA
   CCGTTTTACA  TGTCGTCTTA  CGCGCCAATG  GAGGGGAGGT  CGGGCGGGAT

201  CTATGAGGGC  CGTTTCTCCA  ACGGACCCGT  CTGGCTGGAG  CAGCTGACCA
   GATACTCCCG  GCAAAGAGGT  TGCTGGGCA  GACCGACCTC  GTCGACTGGT

251  AACAGTTCCC  GGGTCTGACC  ATCGCCAACG  AAGCGGAAGG  CGGTGCCACT
   TTGTCAAGGG  CCCAGACTGG  TAGCGGTTGC  TTCGCCTTCC  GCCACGGTGA

301  GCGGTGGCTT  ACAACAAGAT  CTCTTGAAT  CCAAGTATC  AGGTCAATCA
   CGGCACCGAA  TGTGTCTTA  GAGGACCTTA  GGGTTCATAG  TCCAGTAGTT

351  CAACCTGGAC  TACGAGGTCA  CCCAGTTCTT  GCAGAAAGAC  AGCTTCAAGC
   GTTGGACCTG  ATGCTCCAGT  GGGTCAAGAA  CGTCTTTCTG  TCGAAGTTCC

401  CGGACGATCT  GGTGATCCTC  TGGGTCGGTG  CCAATGACTA  TCTGGCCTAT
   GCCTGCTAGA  CCACTAGGAG  ACCCAGCCAC  GGTTACTGAT  AGACCGGATA

451  GGCTGGAACA  CGGAGCAGGA  TGCCAAGCGG  GTTCGGGATG  CCATCAGCGA
   CCGACCTTGT  GCCTCGTCTT  ACGGTTCCGC  CAAGCGCTAC  GGTAGTCCGT

501  TGGCGCCAAC  CGCATGGTAC  TGAACGGTGC  CAAGCAGATA  CTGCTGTTCA
   ACGCCGGTTG  GCGTACCATG  ACTTGCCACG  GTTCGTCTAT  GACGACAAGT

551  ACCTGCCCGA  TCTGGCCAG  AACCCGTCAG  CTCGCAGTCA  GAAGGTGGTC
   TGGACGGCCT  AGACCCGGTC  TTGGGCAGTC  GAGCGTCAGT  CTTCCACCAG

601  GAGGCGGTCA  GCCATGTCTC  CGCCTATCAC  AACCAGCTGC  TGCTGAACCT
   CTCGCCAGT  CCGTACAGAG  GCGGATAGTG  TTGGTCGACG  ACGACTTGGA

651  GGCACGCCAG  CTGGCCCCCA  CCGGCATGGT  AAAGCTGTTT  GAGATCGACA
   CCGTGCGGTC  GACCGGGGGT  GGCCGTACCA  TTTCGACRAG  CTCTAGCTGT

701  AGCAATTTGC  CGAGATGCTG  CGTGATCCGC  AGRACCTCCG  CCTGAGCCGAC
   TCGTTAARCG  GCTCTACGAC  GCACTAGGCG  TCTTGAAGCC  GGACTCCGCTG

751  GTCGAGAACC  CCTGCTACGA  CGGCGGCTAT  GTGTGGAAGC  CGTTTGCCAC
   CAGCTCTTGG  GGACGATGCT  GCCGCCGATA  CACACCTTCG  GCAAACGGTG

801  CCGCAGCGTC  AGCACCGACC  GCCAGCTCTC  CGCCTTCAGT  CCGCAGGAAC
   GGCCTCCGAG  TCGTGGCTGG  CCGTCGAGAG  GCGGAAGTCA  GGCCTCCTTG

851  GCCTCGCCAT  CGCCGGCAAC  CCGCTGCTGG  CACAGGCCGT  TGCCAGTCTT
   CCGAGCGGTA  GCGGCCGTTG  GGCAGCAGAC  GTGTCCGGCA  ACGGTCAGGA

901  ATGCCCCGCC  GCAGCGCCAG  CCCCTCAAC  TGTGAGGGCA  AGATGTTCTG
   TACCGGGCGG  CGTCGCGGTC  GGGGGAGTTG  AACTTCCCGT  TCTACAAGAC

951  GGATCAGGTA  CACCCGACCA  CTGTCTGCA  CGCAGCCCTG  AGCGAGCGCG
   CCTAGTCCAT  GTGGCTGGT  GACAGCACGT  GCGTCGGGAC  TCGCTCCGCG

1001  CCGCCACCTT  CATCGCGAAC  CAGTACGAGT  TCCTCGCCCA  CTGATGA
   GCGGTTGGAA  GTAGCGCTTG  GTCATGCTCA  AGGAGCGGGT  GACTACT

```

FIGURA 73

SEQ ID No. 68

1 ADTRPAFSRI VMFGDSLSDT GRMYSKMRGY LPSSPPYEG RFSNGPVWLE QLTRQFPGLT
61 IANEAEGGAT AVAYNKISWD PKYQVINNLD YEVTQFLQKD SFKPDDLVL WVGANDYLAY
121 GWNTEQDAKR VRDAISDAAN RMVLNGAKQI LLFNLPDLGQ NPSARSQKVV EAVSHVSAYH
181 NKLLLNLARQ LAPTMVKLF EIDKQFAEML RDPQNFGLSD VENPCYDGGY VWKPF

236 RSASPLNCEG KMFWDQVHPT TVVHAALSER AATFIETQYE FLAHG

FIGURA 74a

PROCESO CONVENCIONAL (sólo para comparación)

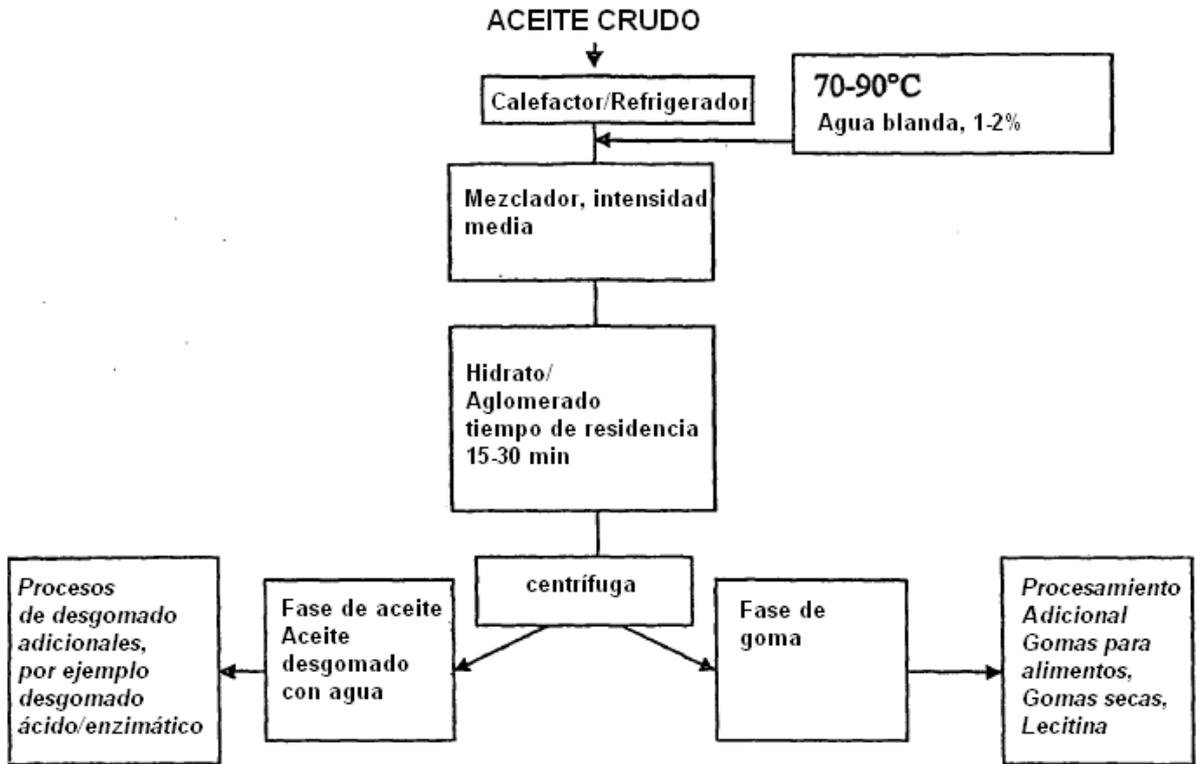


FIGURA 74b

PROCESO DE LA PRESENTE INVENCION

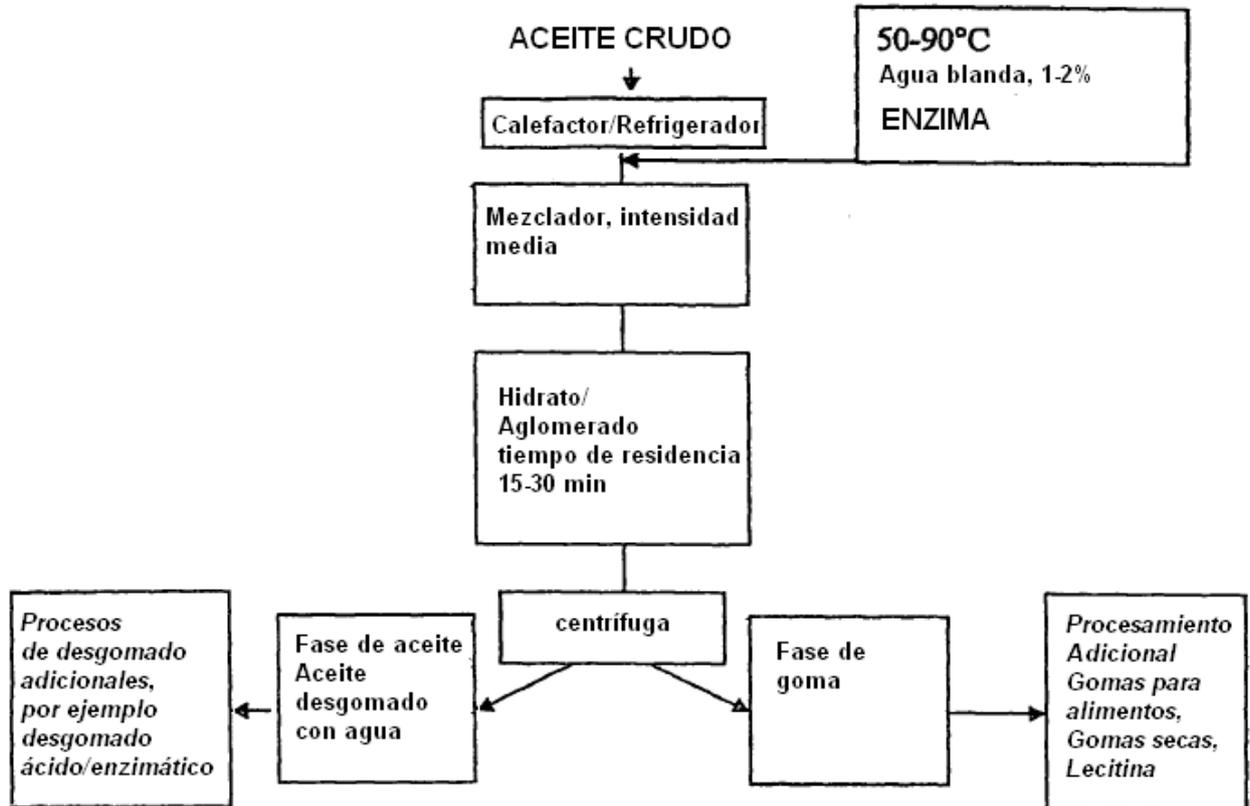


FIGURA 75

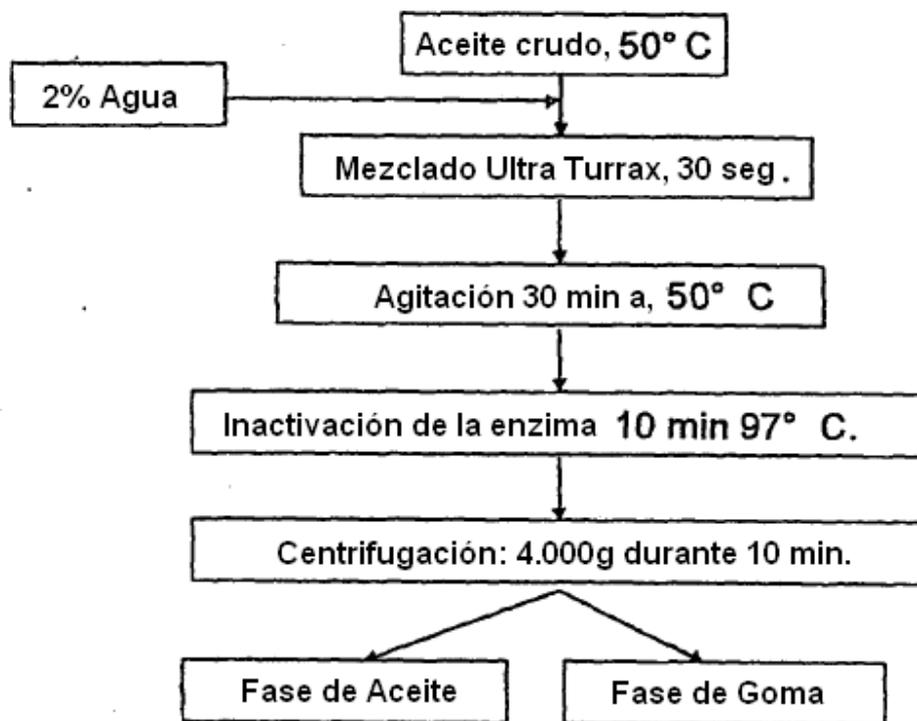


FIGURA 76

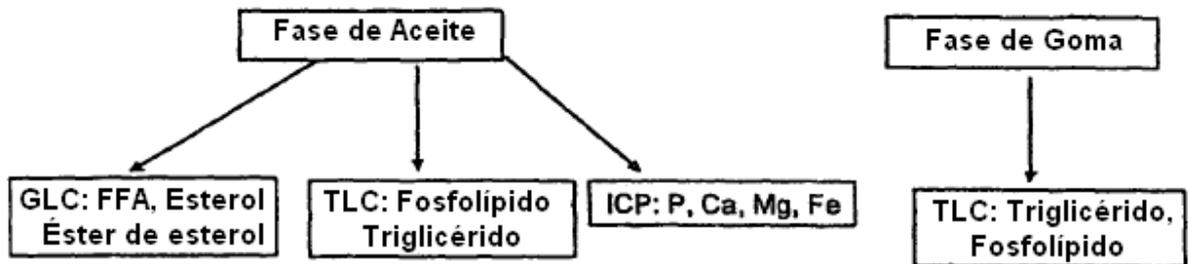


FIGURA 77

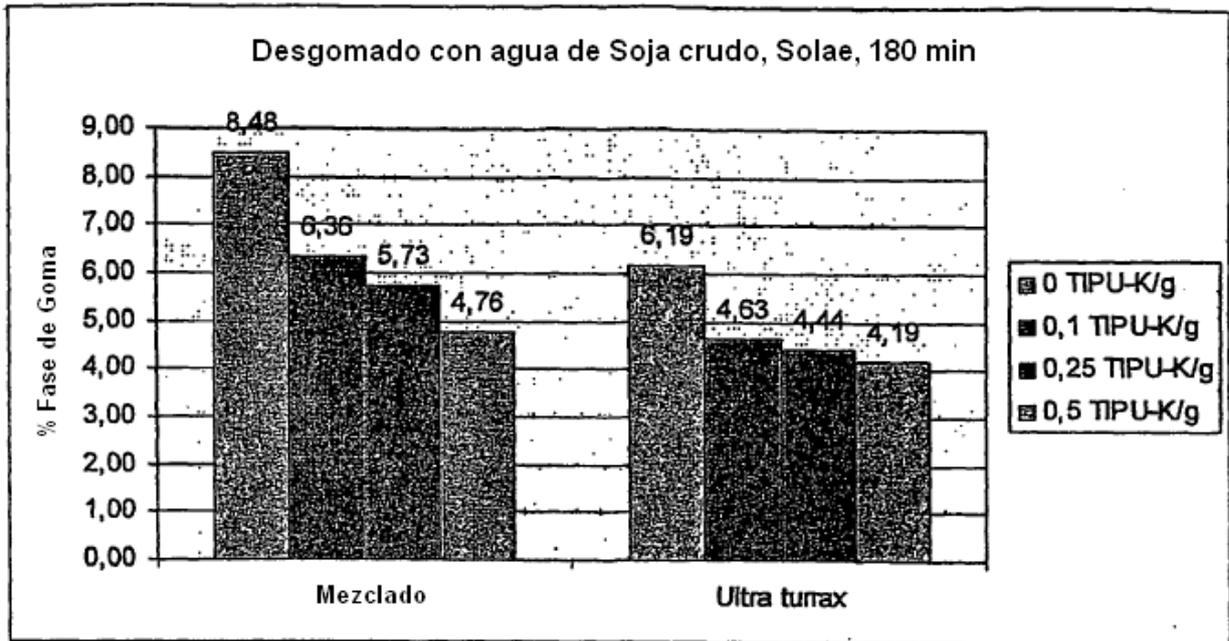


FIGURA 78

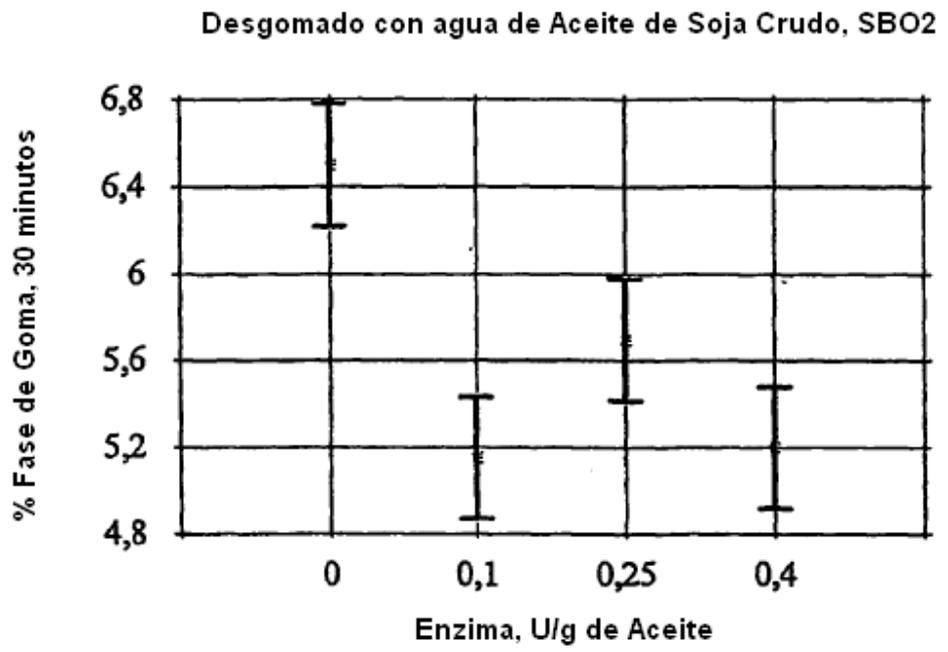


FIGURA 79

Desgomado con agua de Aceite de Soja Crudo, SBO2 con 1,5, 2,0 ó 2,5% de agua

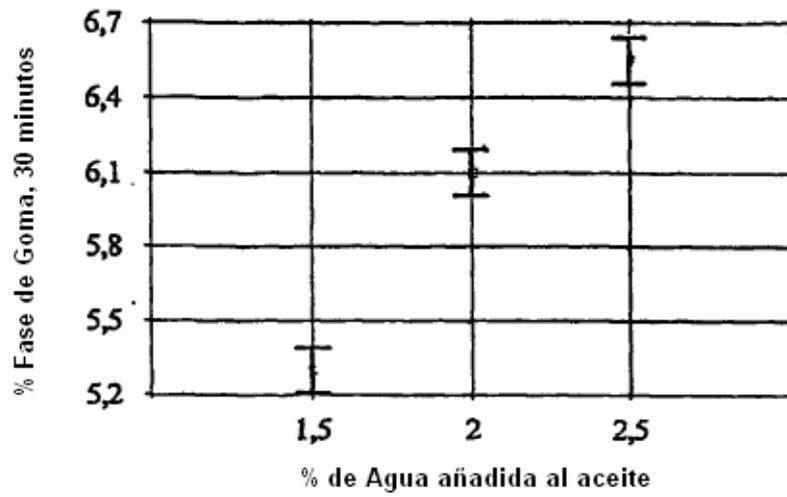


FIGURA 80

Desgomado con agua de Aceite de Soja Crudo, SBO2 con 1,5, 2,0 ó 2,5% de agua

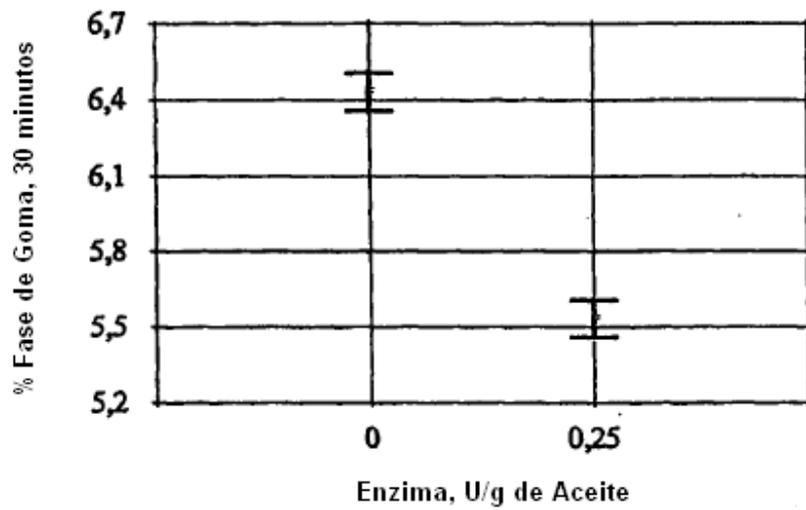


FIGURA 81

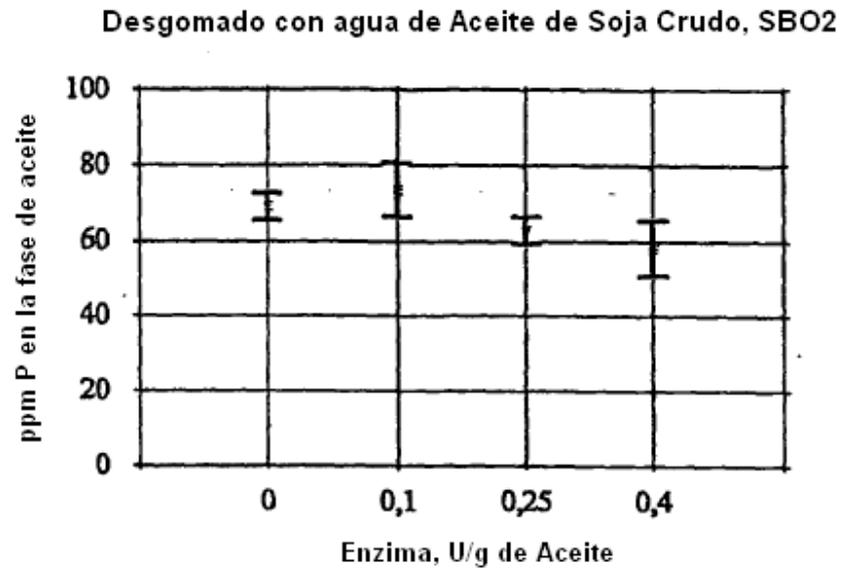


FIGURA 82

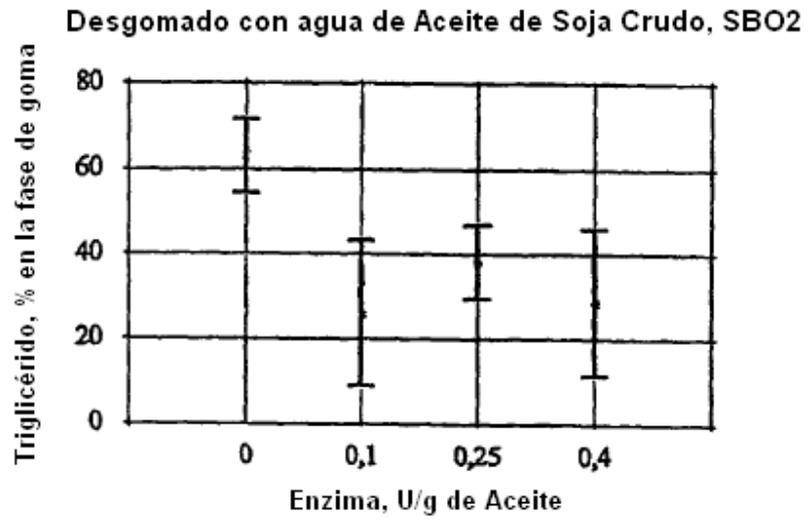


FIGURA 83

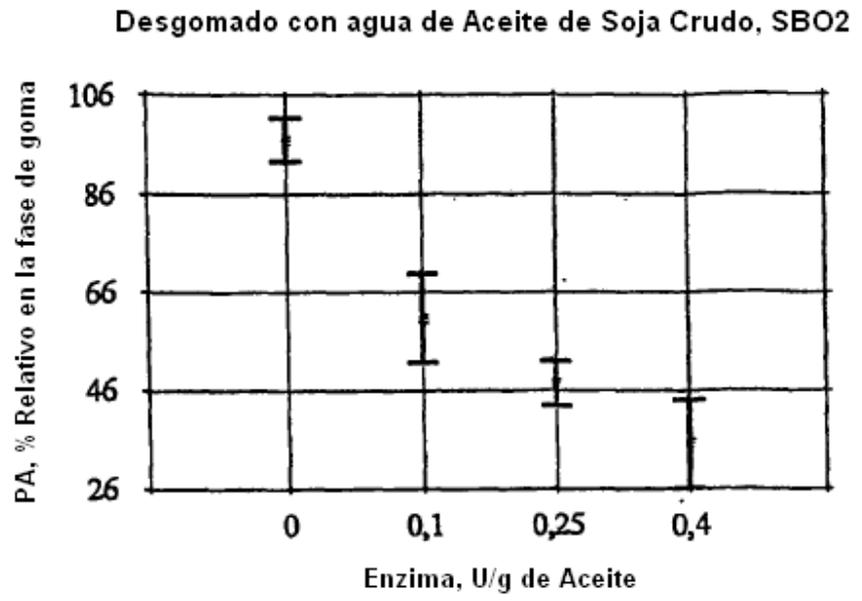


FIGURA 84

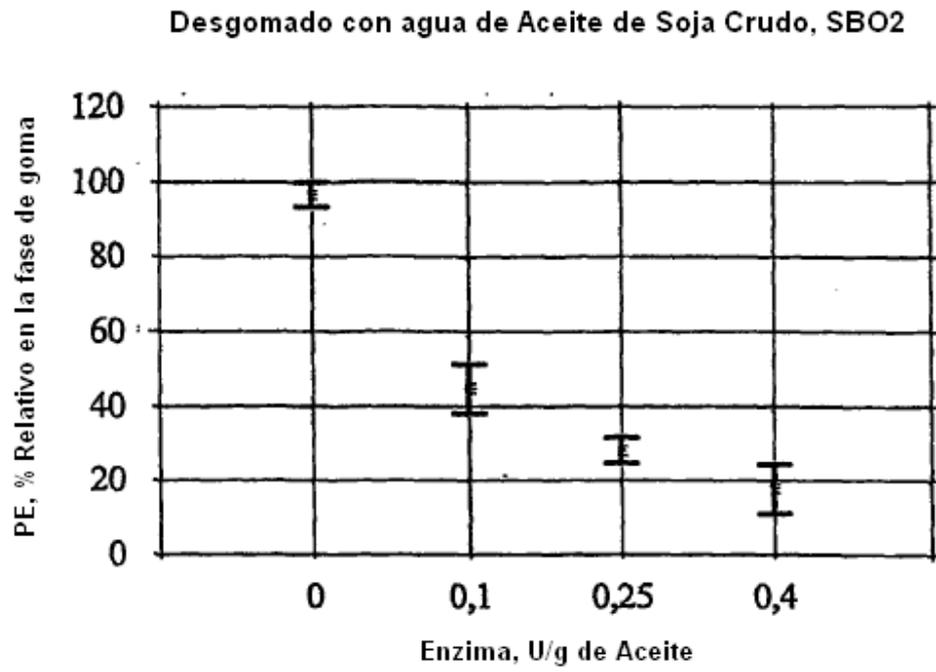


FIGURA 85

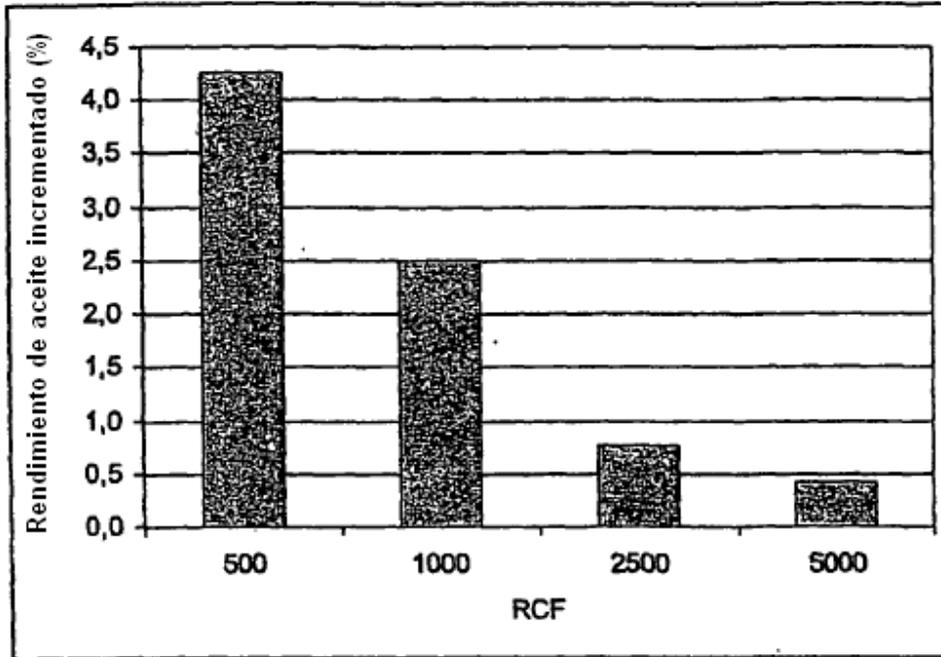


FIGURA 86

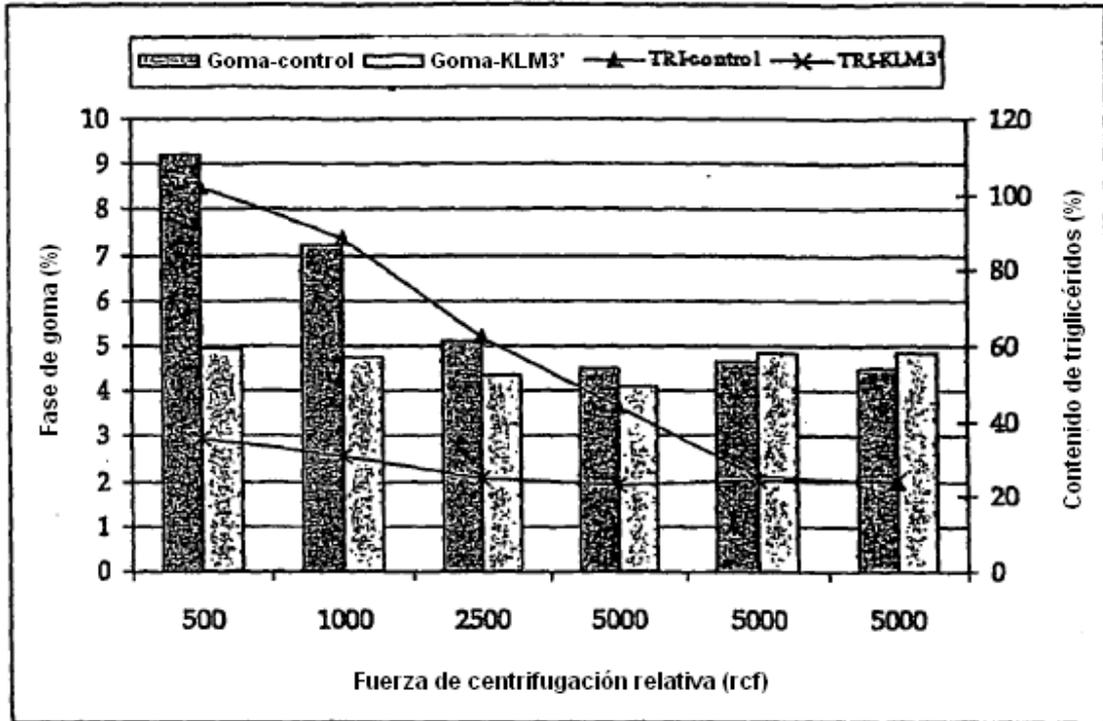


FIGURA 87

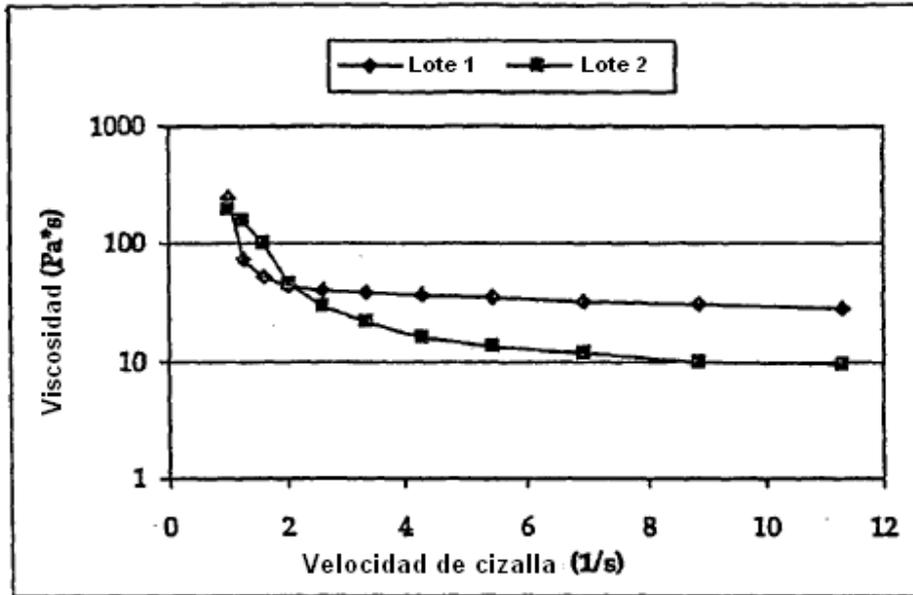


FIGURA 88

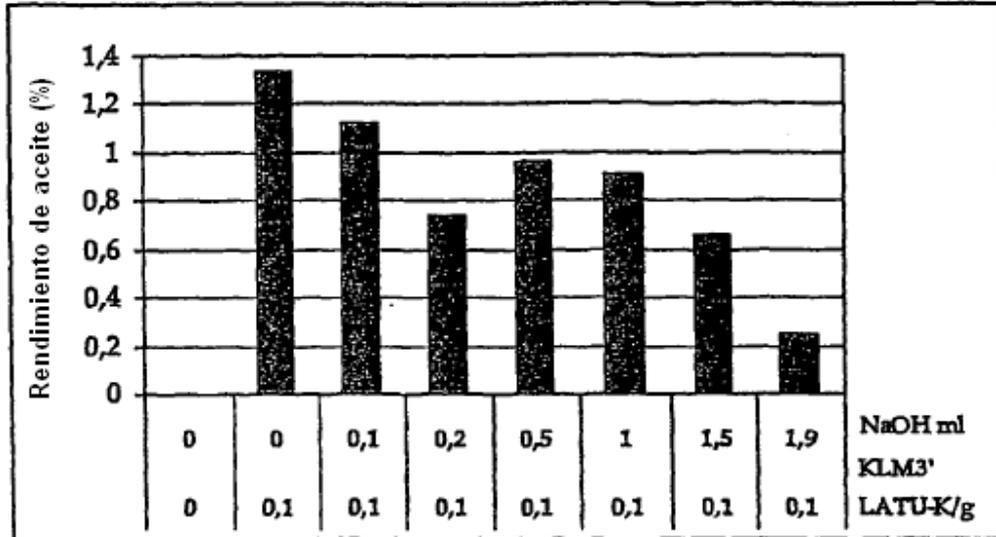


FIGURA 89

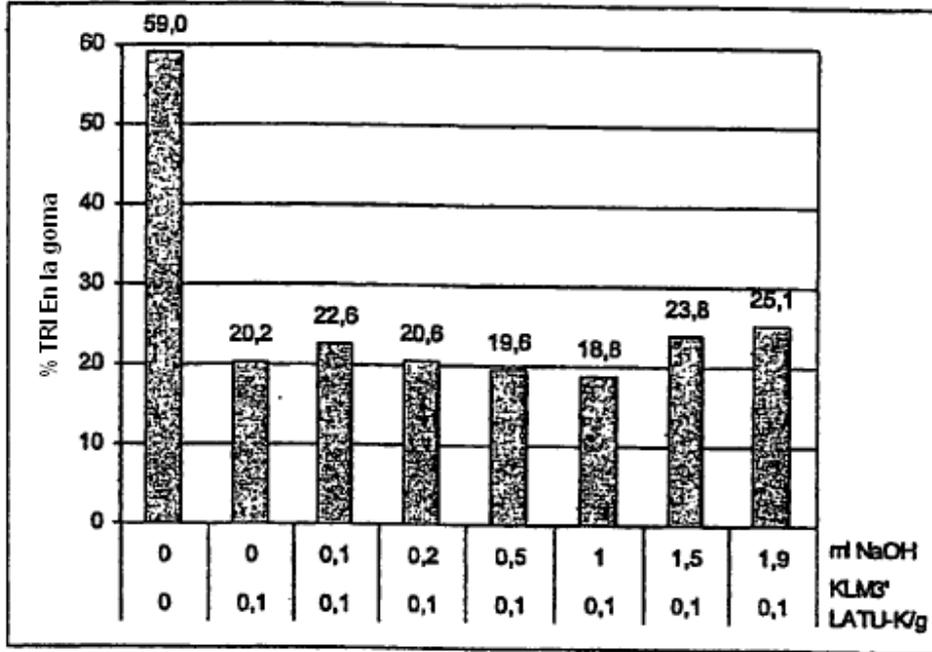


FIGURA 90

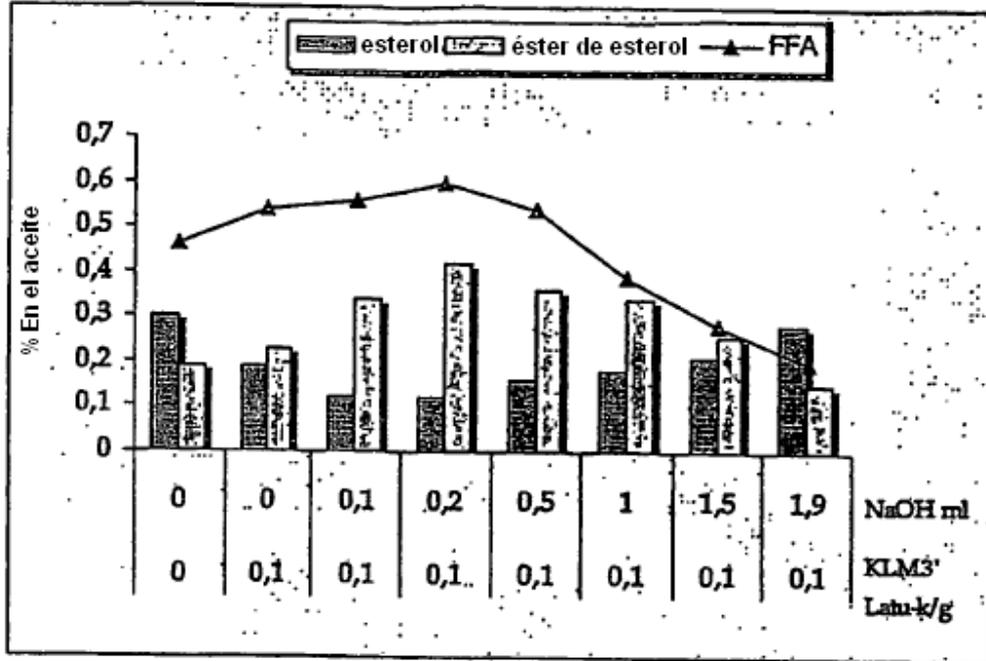


FIGURA 91

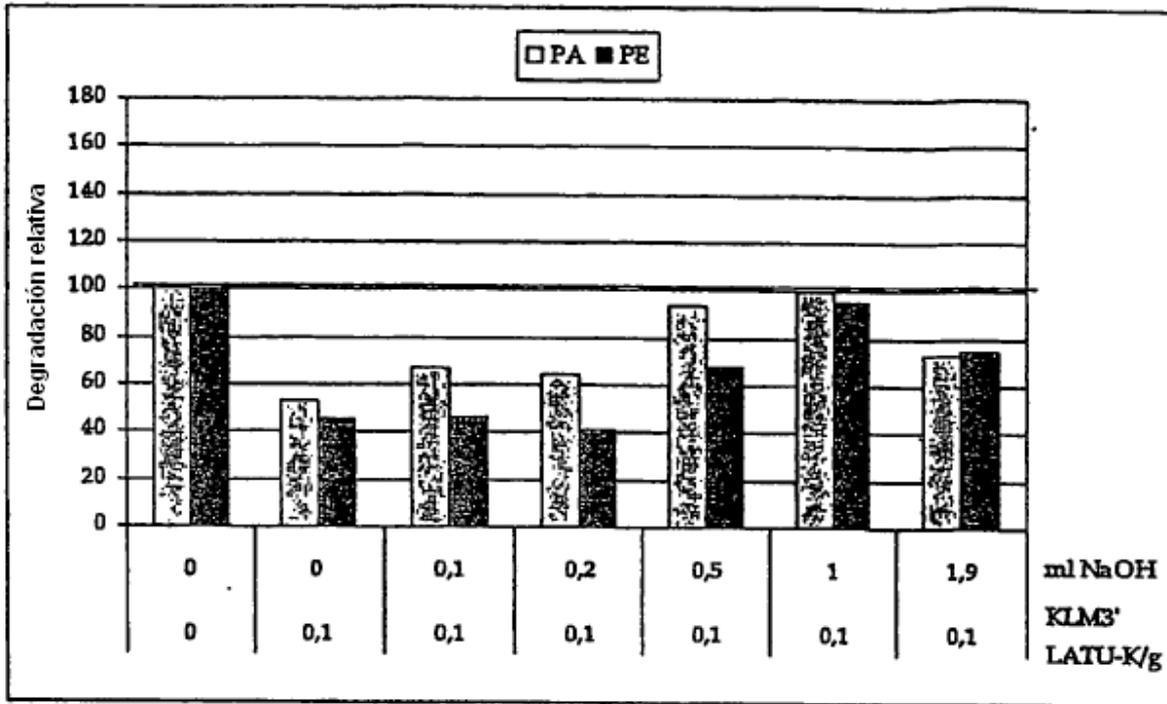
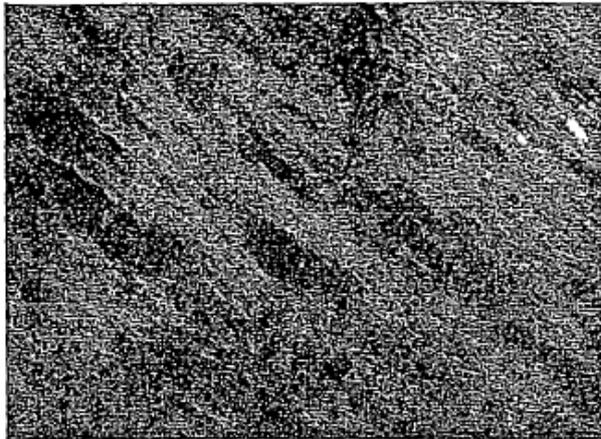
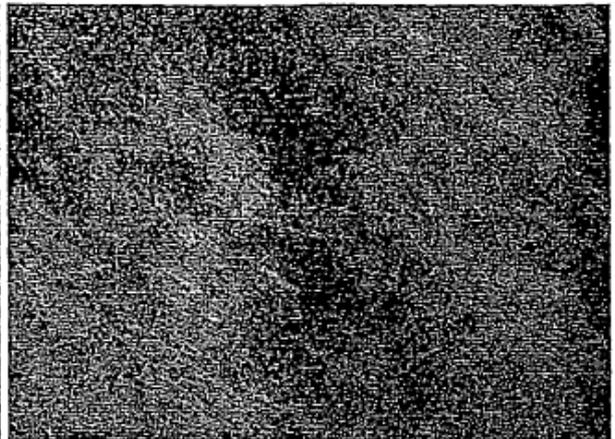


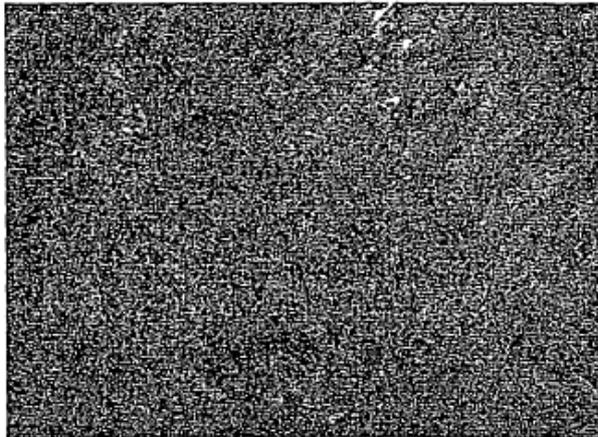
FIGURA 92



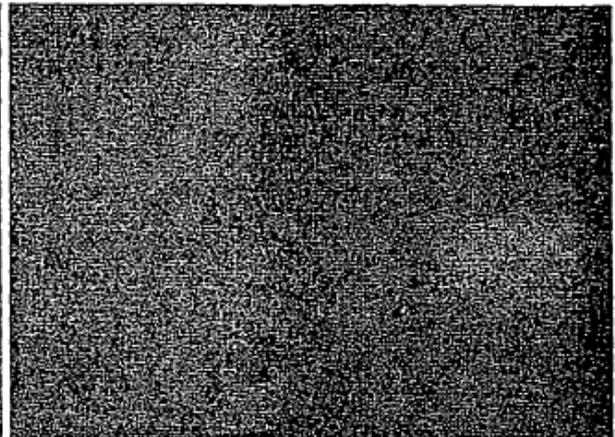
Sin enzima x200
2460-183 ax20a 25°C



Sin enzima x400
2460-183 ax40a 25°C



Con enzima x200
2460-183 bx20a 25°C



Con enzima x400
2460-183 bx40a 25°C

FIG. 93

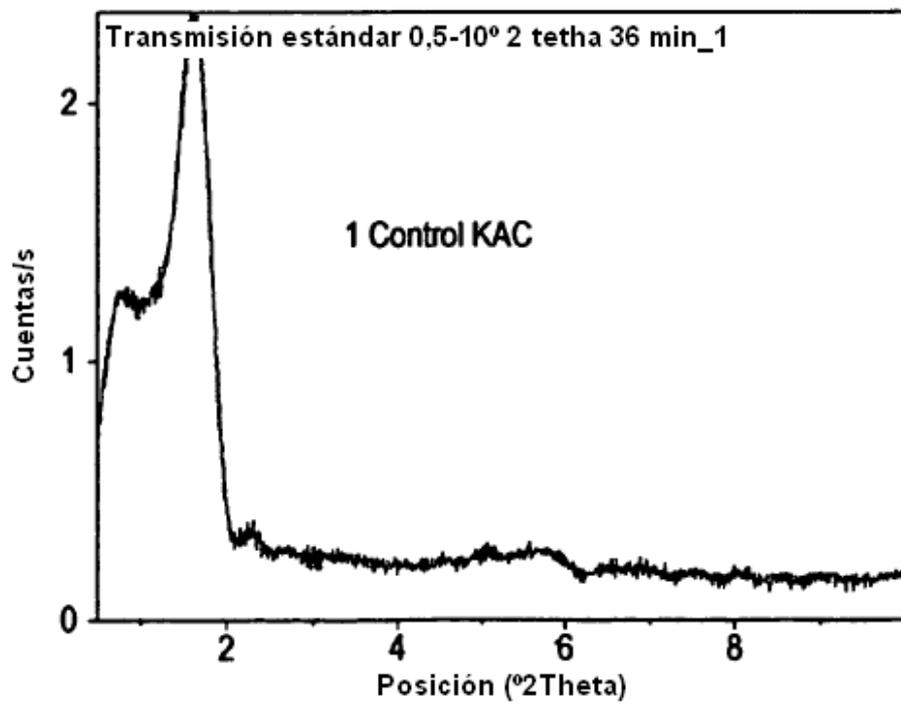
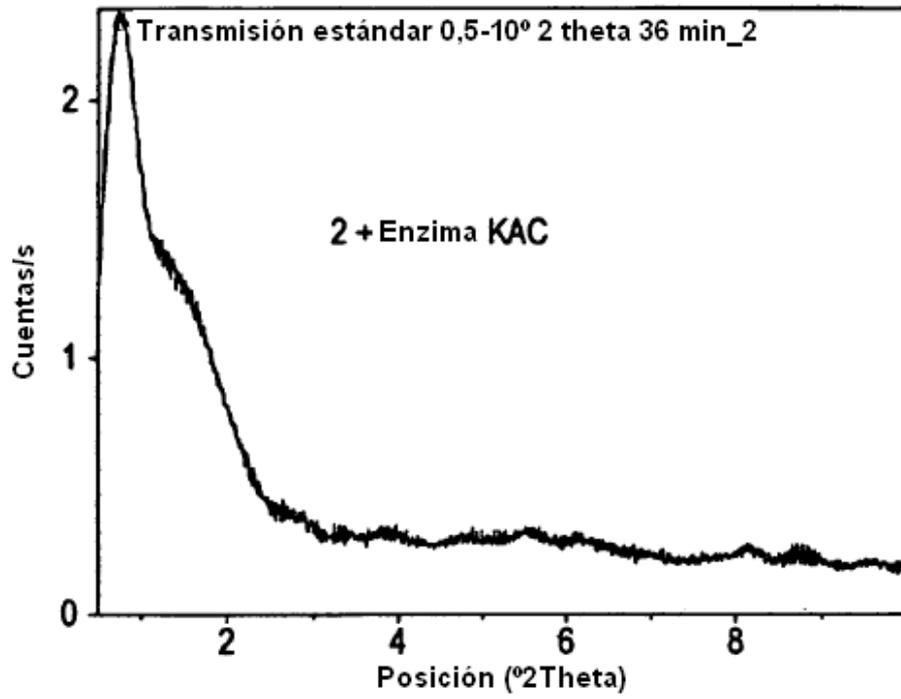
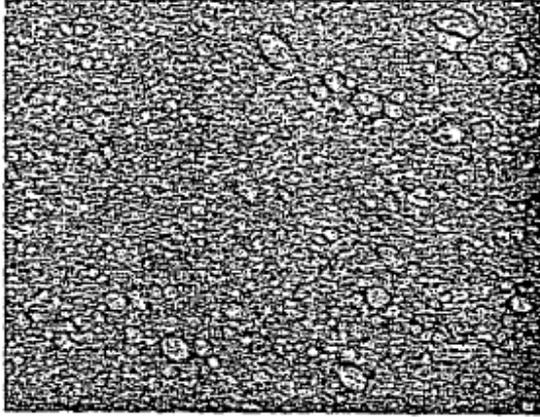


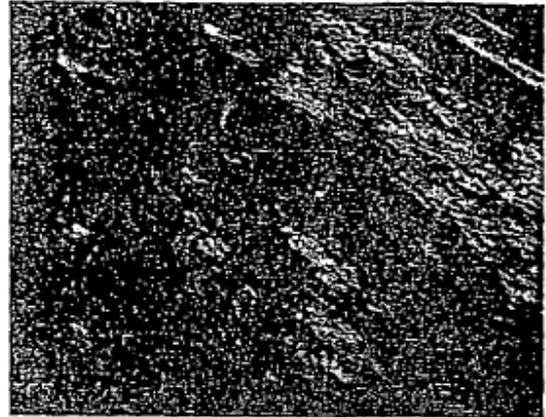
FIG. 94



FIGURA 95



Con enzima



Sin enzima

FIGURA 96

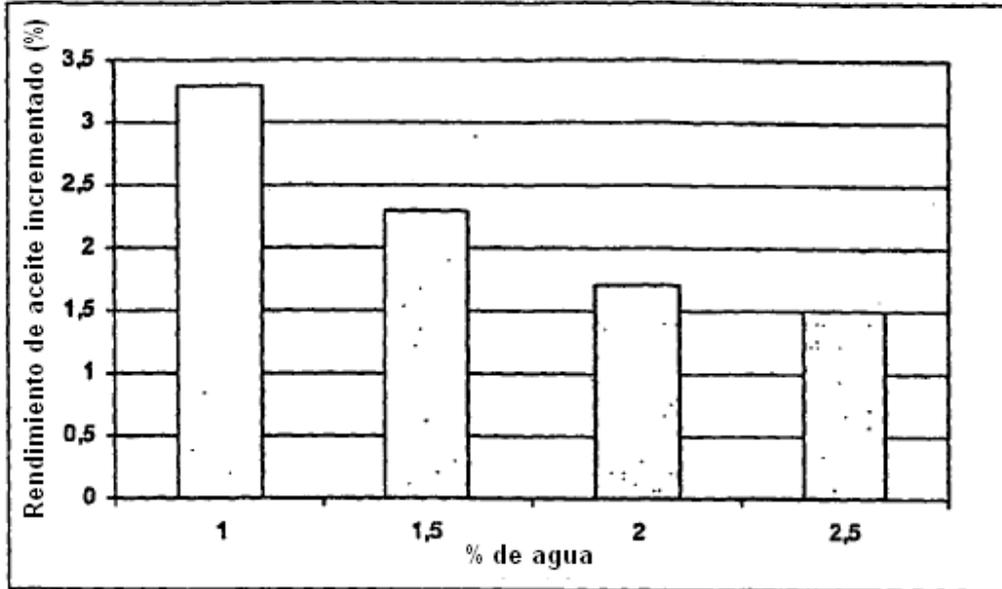


FIGURA 97

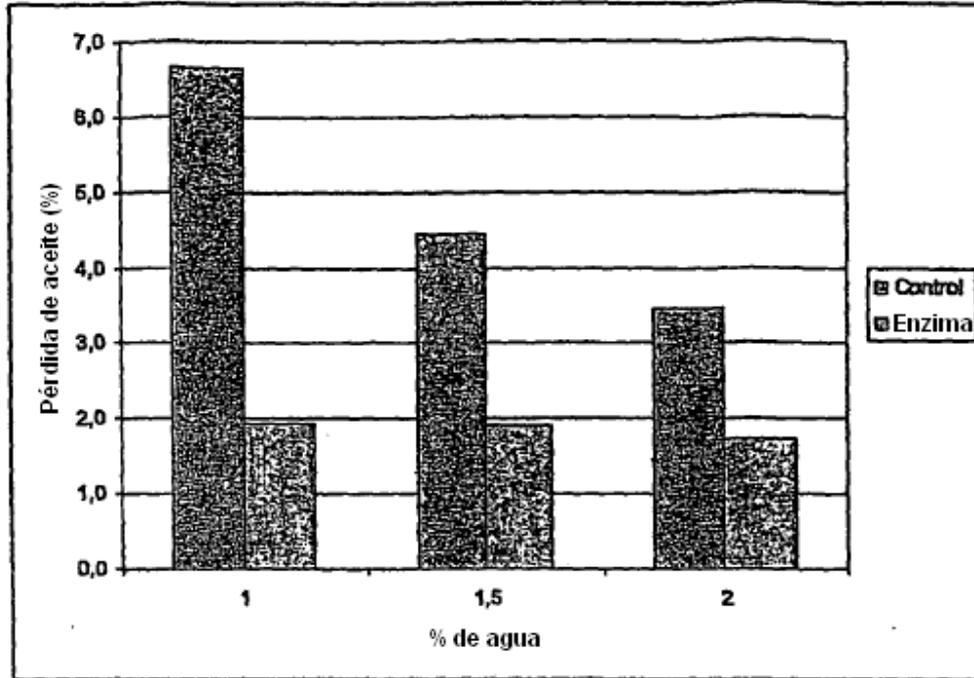


FIGURA 98

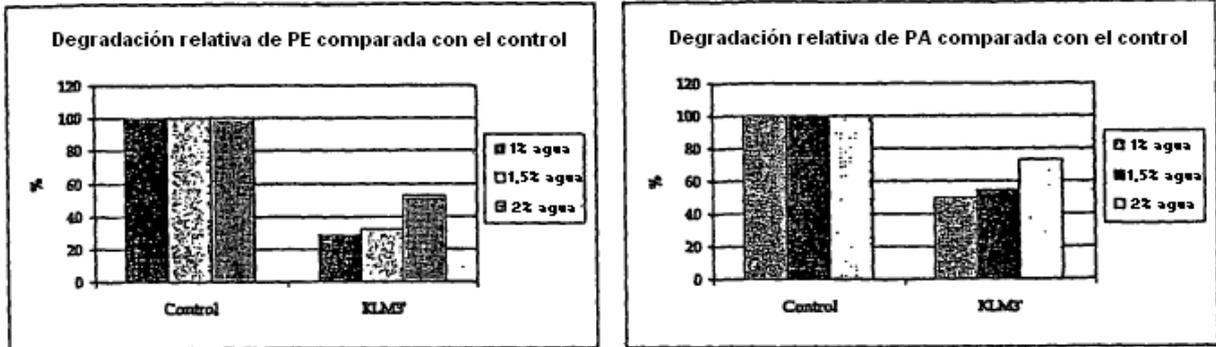


FIGURA 99

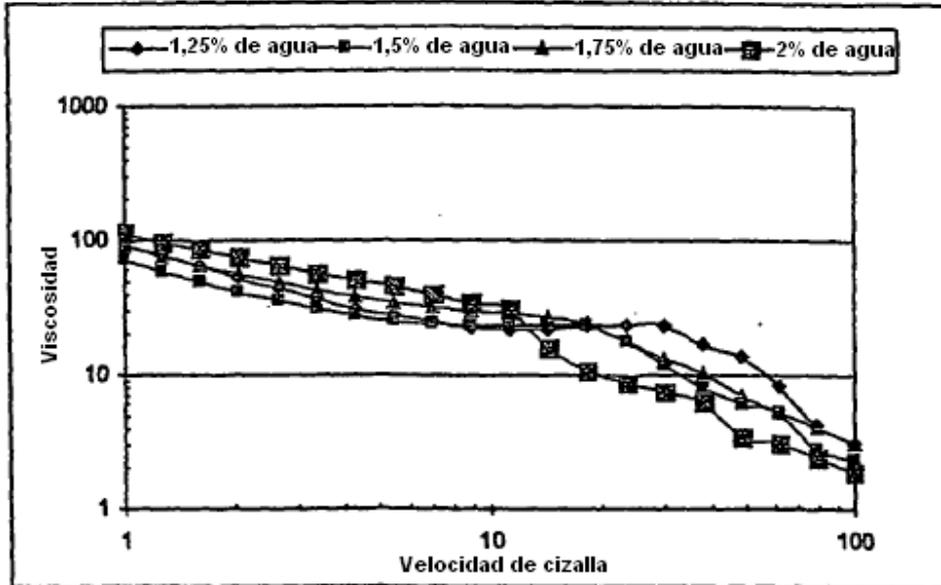


FIGURA 100

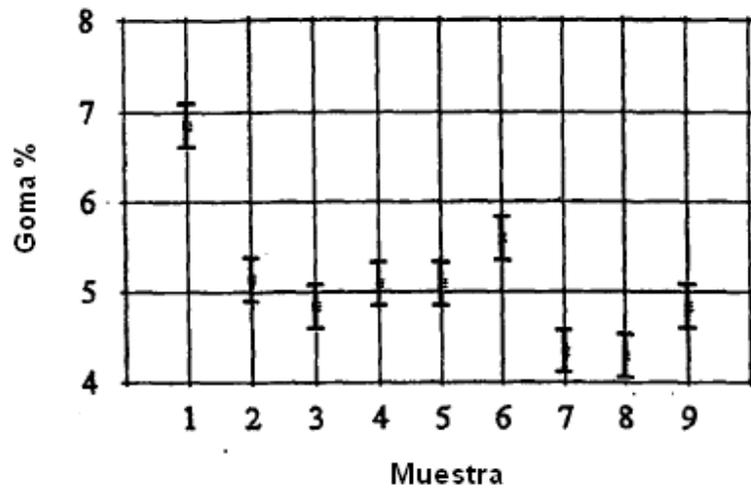


FIGURA 101

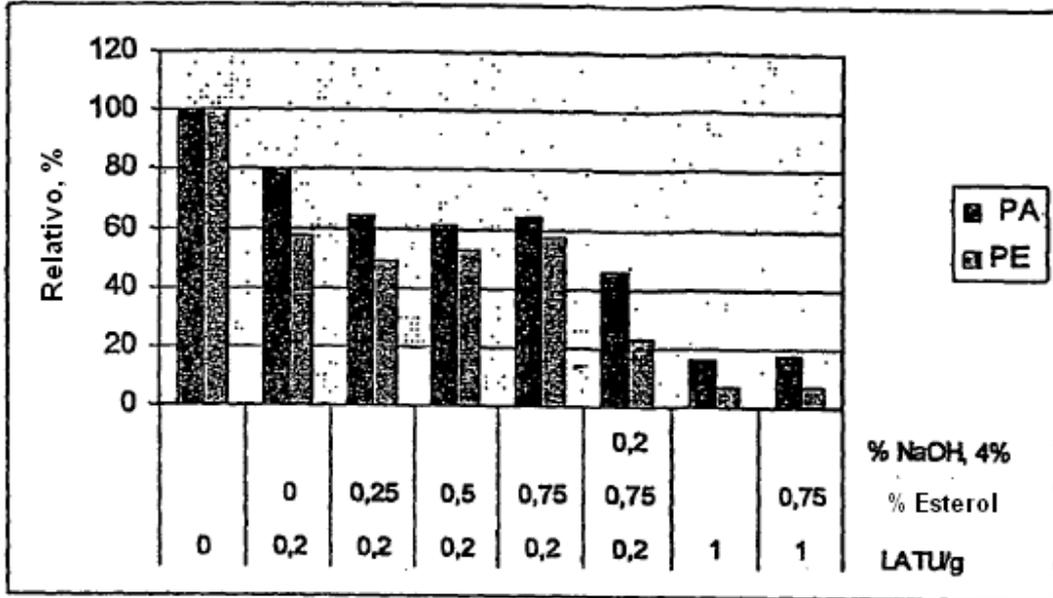


FIGURA 102

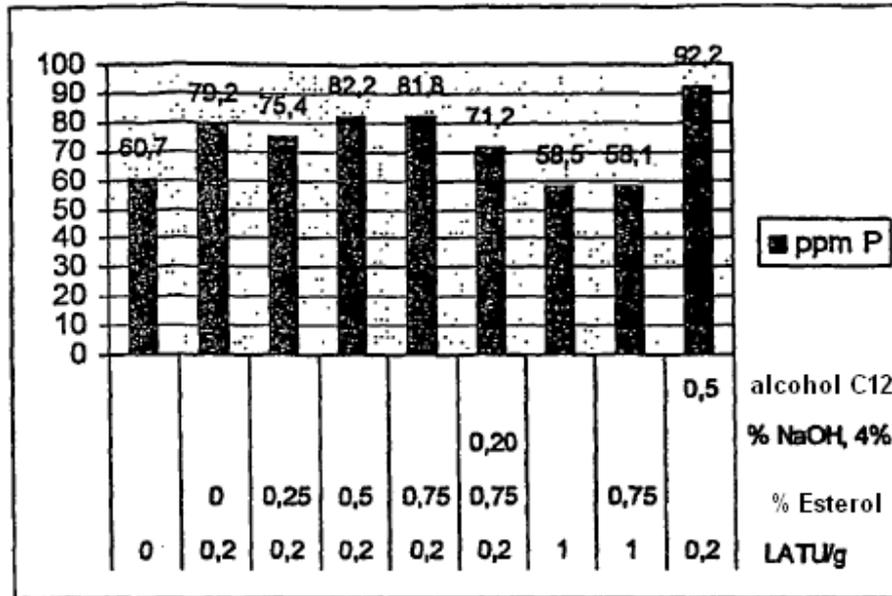


FIGURA 103

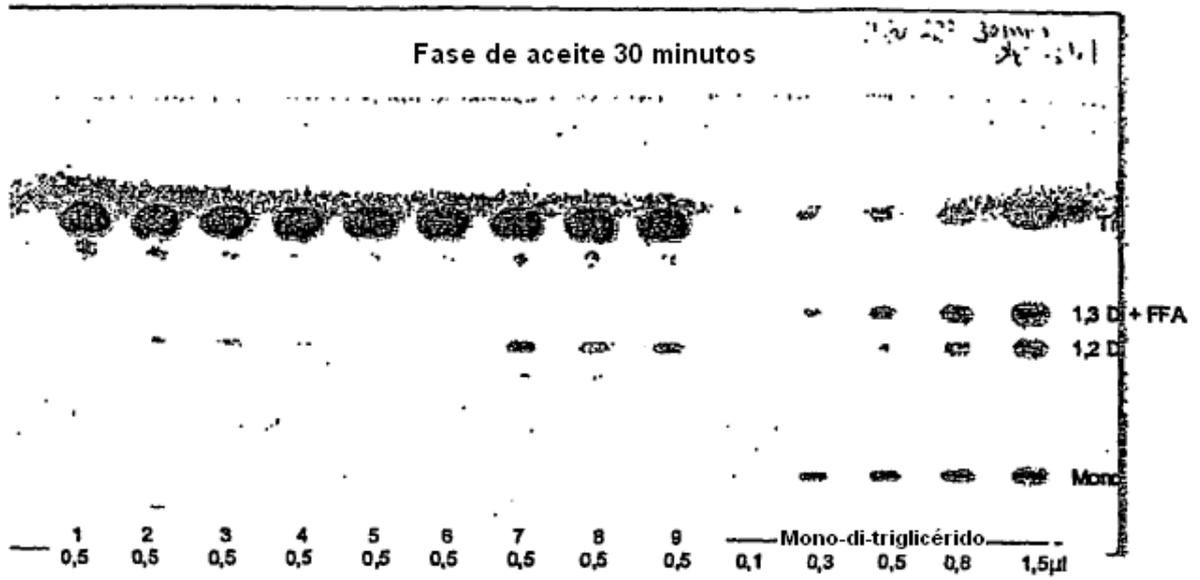


FIGURA 104

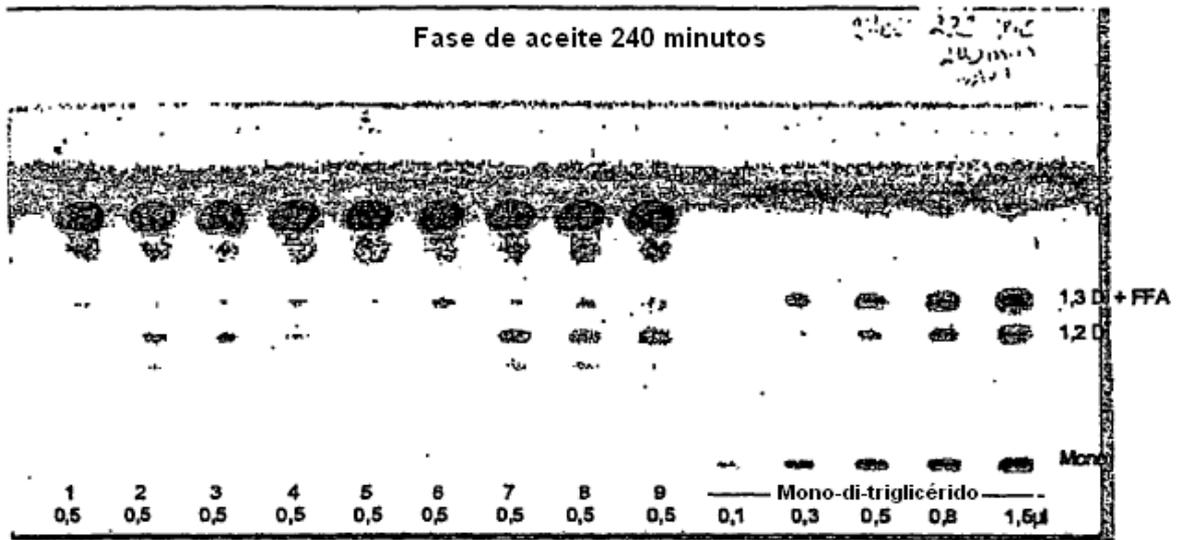


FIGURA 105

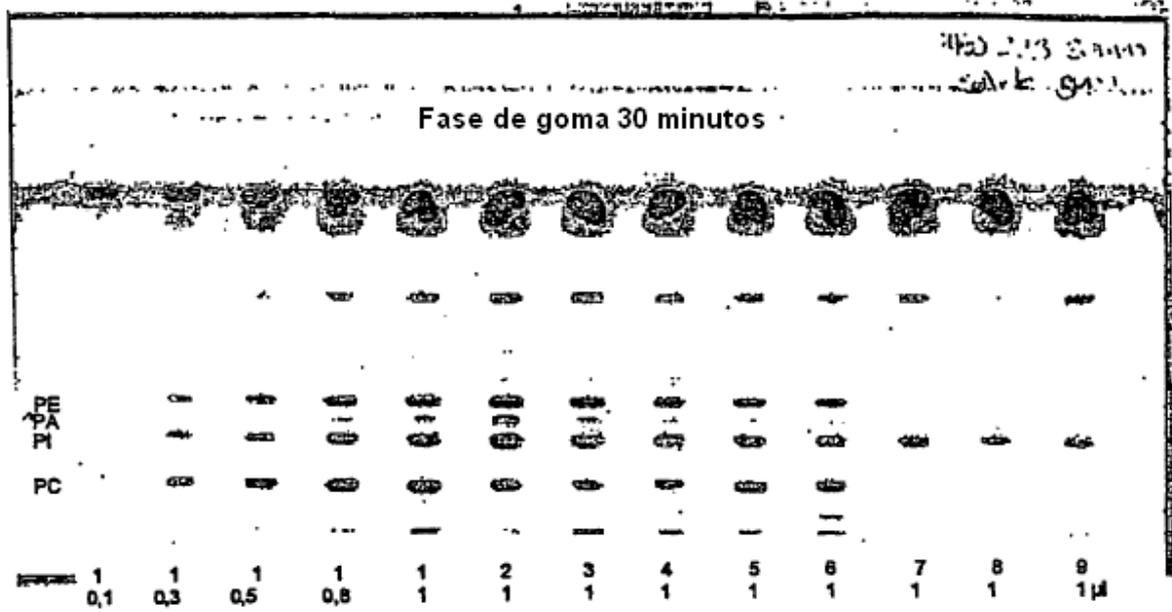


FIGURA 106

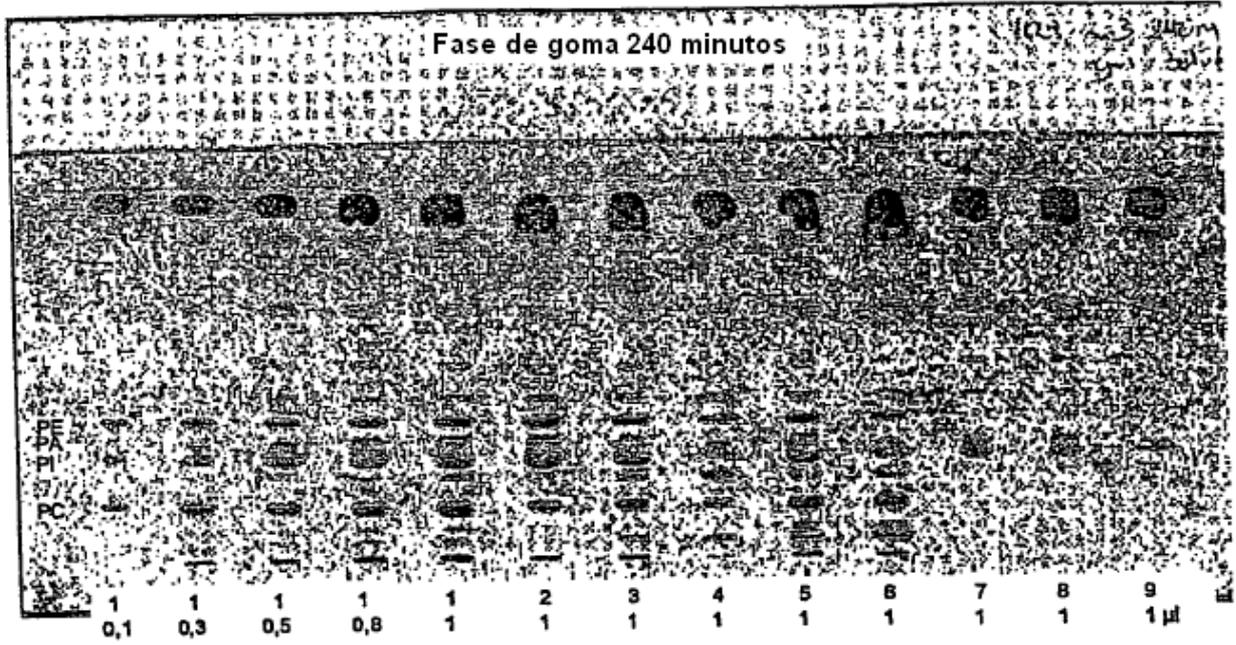


FIGURA 107

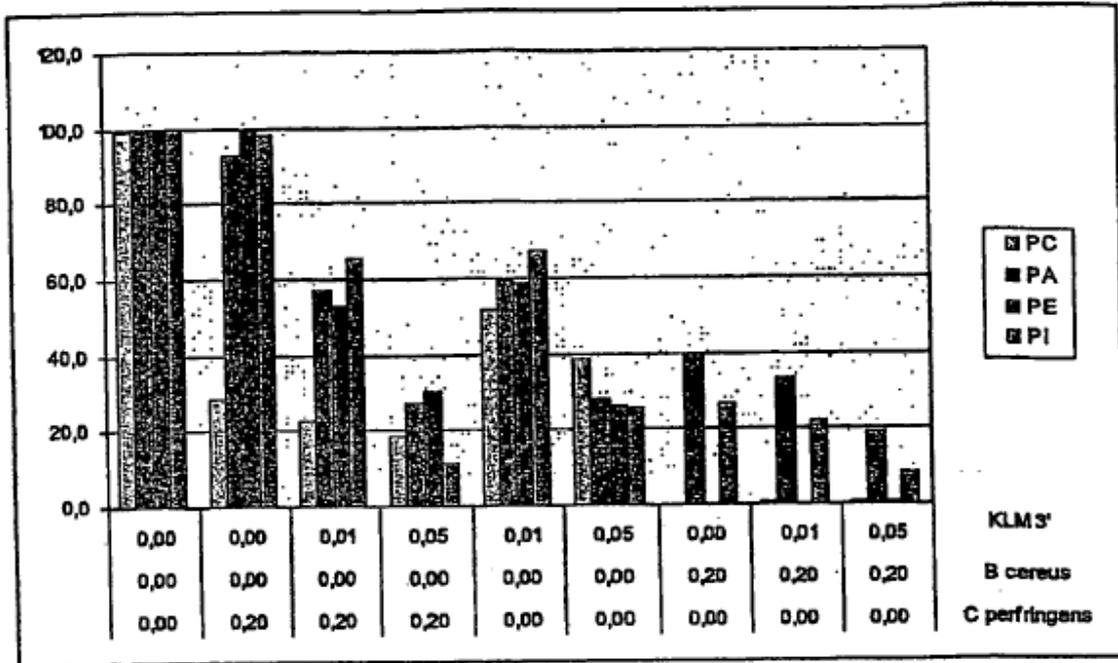


FIGURA 108

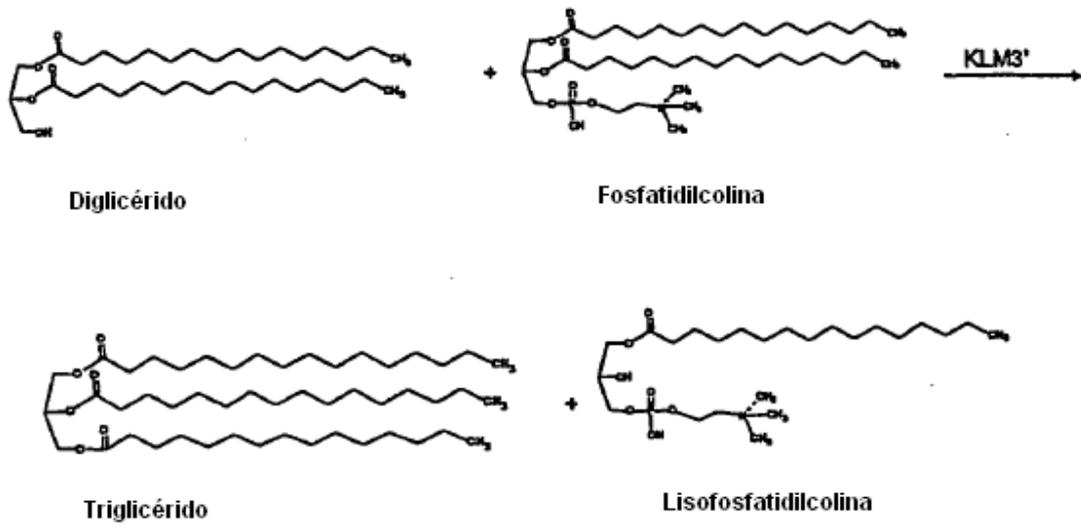


FIGURA 109

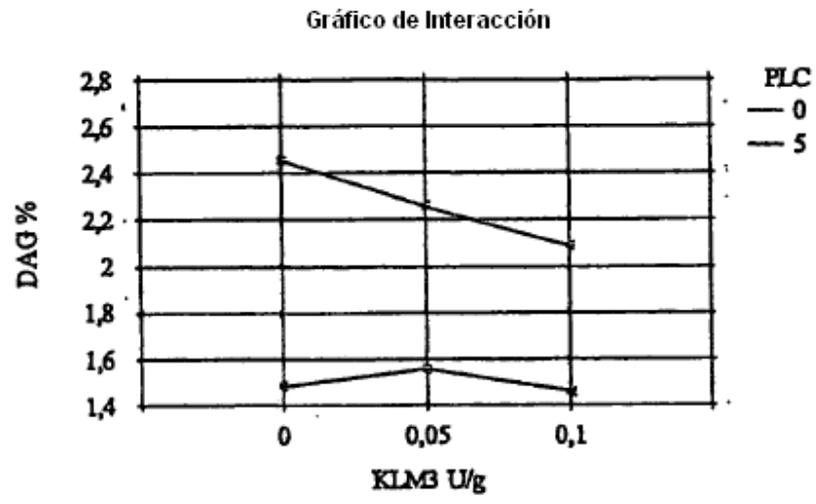


FIGURA 110

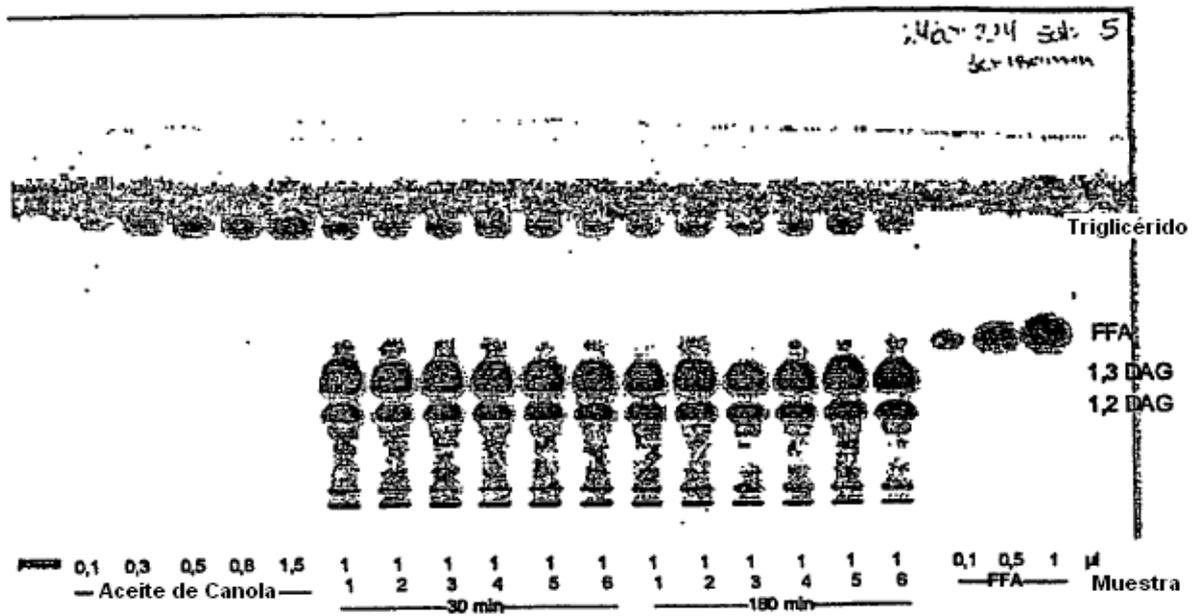


FIGURA 111

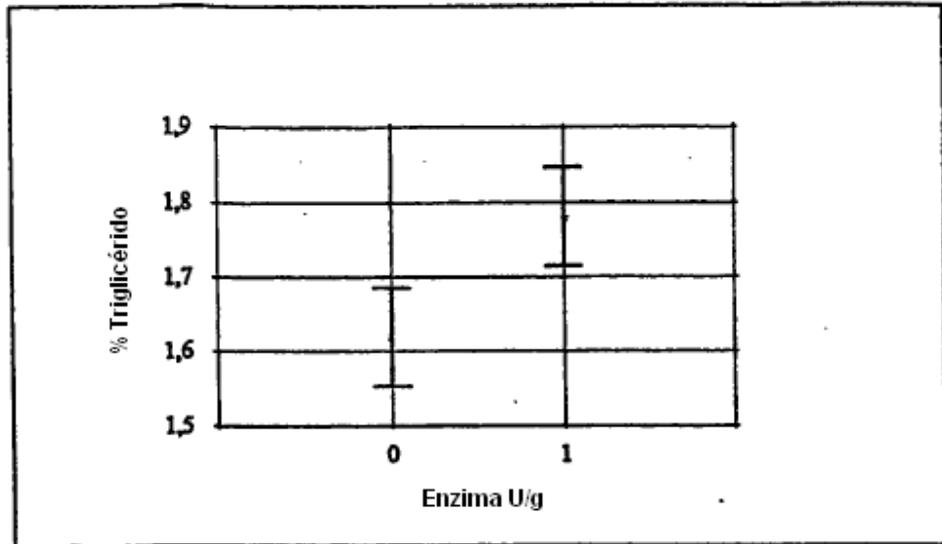


FIGURA 112

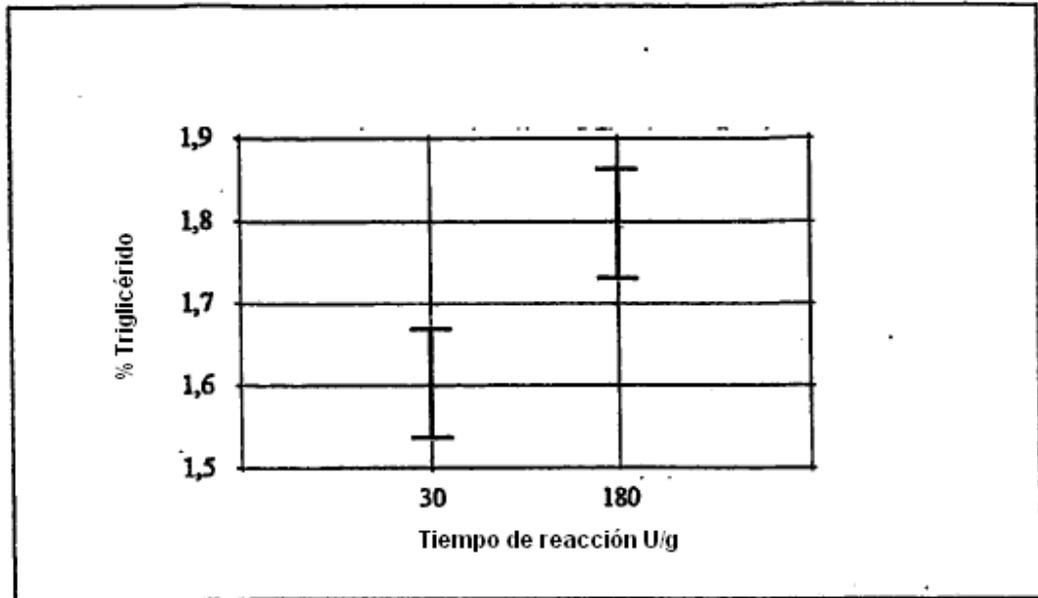


FIGURA 113

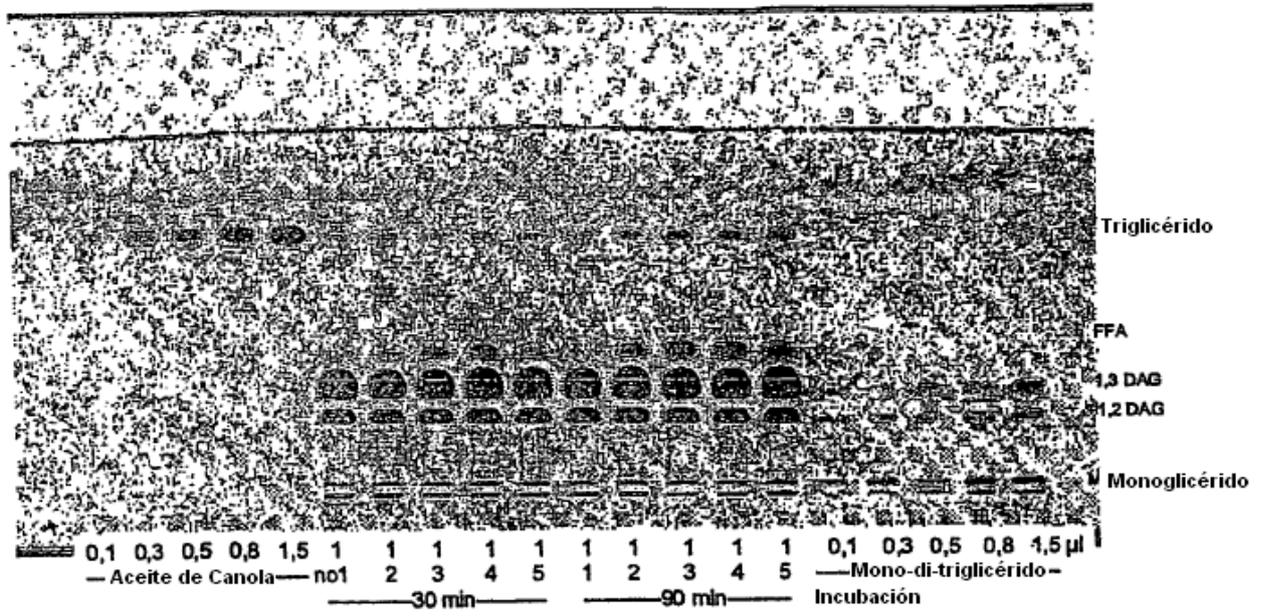


FIGURA 114

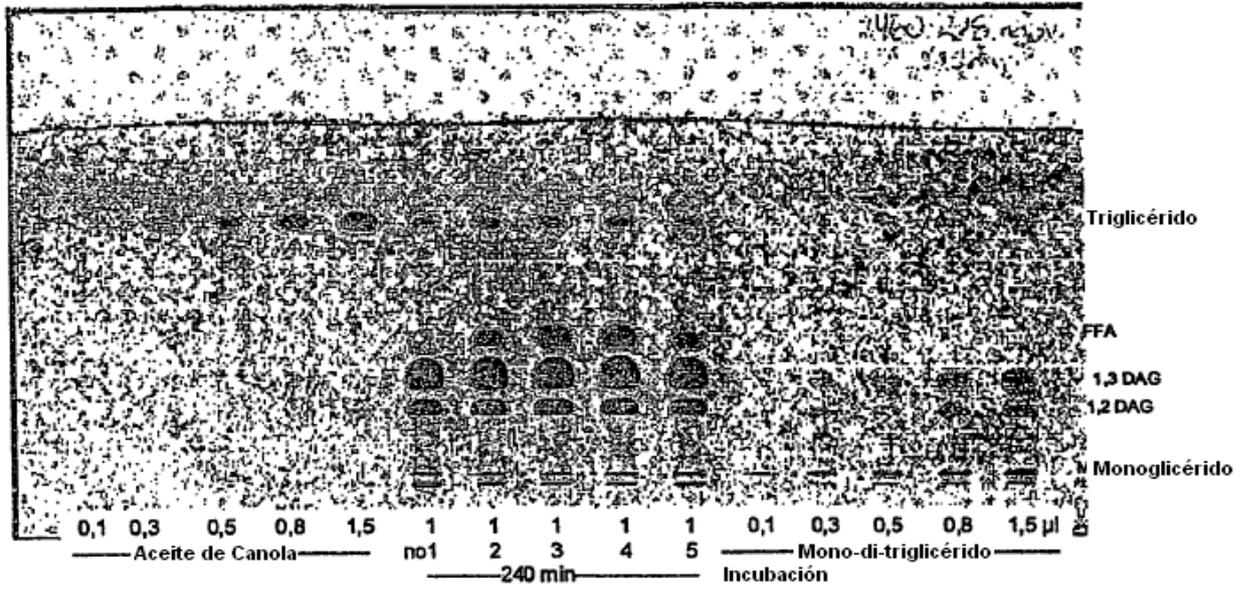


FIGURA 115

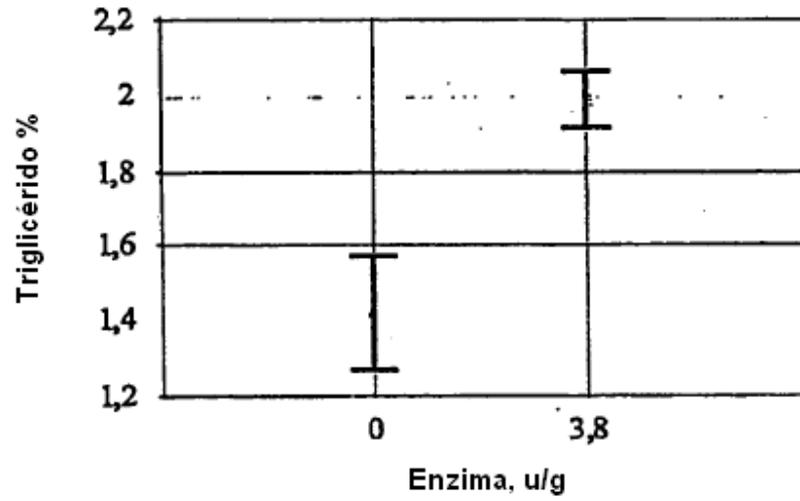


FIGURA 116

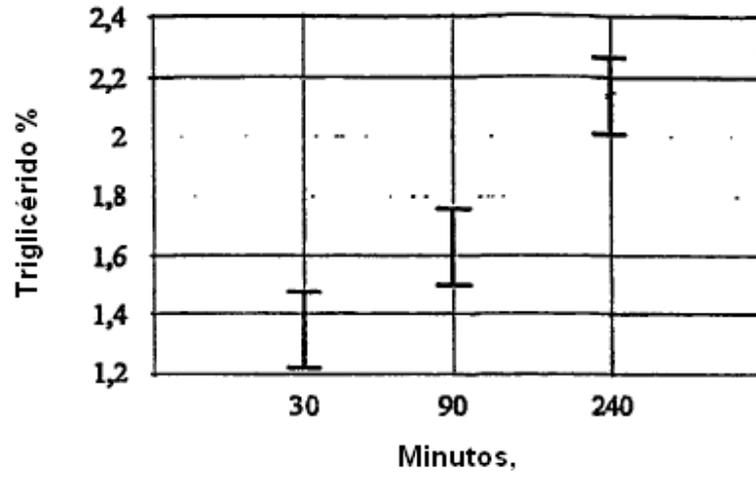


FIGURA 117

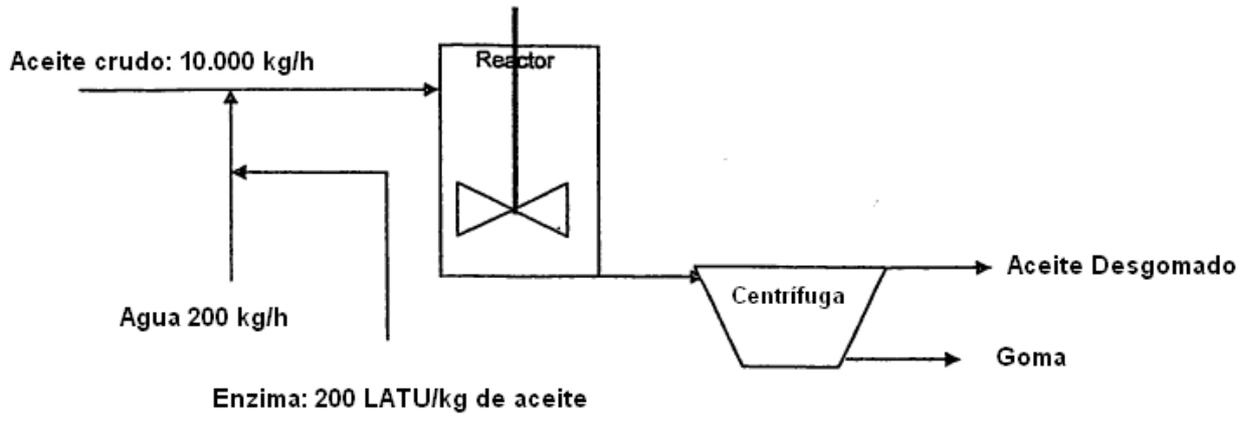


FIGURA 118

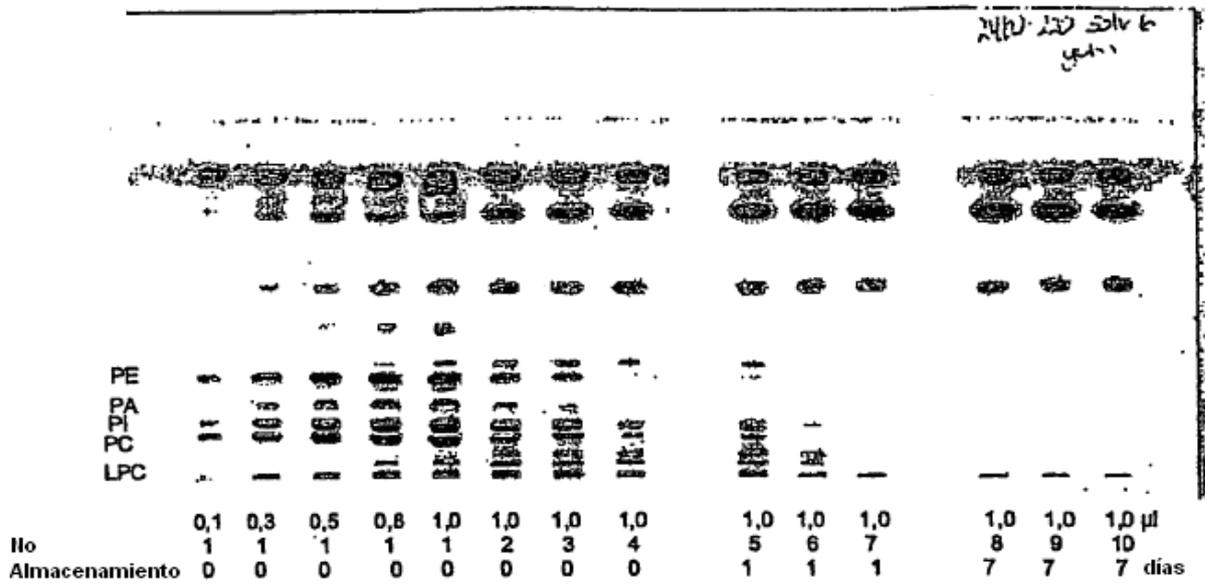


FIGURA 119

