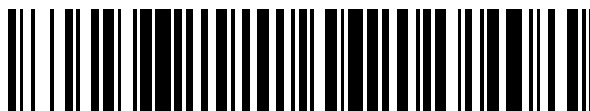


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 492**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

A23C 19/032 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2009 E 09714422 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2013 EP 2254996**

54 Título: **Lipasas con alta especificidad hacia ácidos grasos de cadena corta y usos de las mismas**

30 Prioridad:

29.02.2008 EP 08102175

31.03.2008 EP 08103246

15.07.2008 EP 08160388

16.07.2008 EP 08160545

07.08.2008 EP 08162023

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

15.11.2013

73 Titular/es:

DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)

Het Overloon 1

6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:

LAAN, VAN DER, JAN METSKE;

EFIMOVA, YULIA M.;

TÜRK, KARIN;

VAN DIJK, ALBERTUS ALARD;

SCHOONEVELD-BERGMANS, MARGOT

ELISABETH FRANCOISE;

TERDU, ARIE GERRIT y

SEIN, ARJEN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 429 492 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

Lipasas con alta especificidad hacia ácidos grasos de cadena corta y usos de las mismas

Campo de la Invención

5 La invención se refiere a secuencias nucleotídicas recientemente identificadas que comprenden genes que codifican una enzima lipolítica novedosa. La invención caracteriza la secuencia codificante de longitud completa del gen
novedoso así como también la secuencia de aminoácidos de la proteína funcional de longitud completa y de los
equivalentes funcionales del gen, o la secuencia de aminoácidos. La invención también se refiere a métodos que
utilizan estas proteínas en procesos industriales, por ejemplo en la industria de alimentos, tal como la industria de
lácteos. También se incluyen en la invención células transformadas con un polinucleótido de acuerdo con la
10 invención, adecuado para producir estas proteínas y células.

Antecedentes de la Invención

15 Las lipasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de los enlaces éster en sustratos lipídicos, que conducen a la liberación de ácidos grasos. Las lipasas se utilizan en las aplicaciones lácteas para generar sabor, de manera más importante en queso. Tradicionalmente, las preparaciones de lipasa de rumiantes se utilizan derivadas de cabra,
cabritas, becerros u ovejas. Estas se derivan de tejidos pregástricos de estos rumiantes, y estas preparaciones de
lipasa también se denominan como esterases pregástricas. Las preparaciones comerciales están en el mercado,
tales como Piccantase® C, L, KG y K (DSM Food Specialties, Países Bajos). Estas lipasas se utilizan en la
preparación de una variedad de queso italiano, español, griego y francés. El desarrollo de un perfil de sabor
específico en estos tipos de queso durante la maduración se debe mayormente a la acción de las lipasas sobre la
20 grasa de la leche. Las lipasas catalizan la hidrólisis de la grasa de la leche con la generación de ácidos grasos libres. Dichos ácidos grasos pueden tener cadenas cortas (ácidos grasos C4-C6, tales como los que contienen 4 o 6 átomos de carbono, es decir, ácido butírico, caproico) y una cadena media a larga (ácidos grasos C12-C18). Posteriormente los ácidos grasos libres pueden tomar parte en reacciones químicas, por ejemplo, la formación de compuestos de sabor tal como acetoacetato, beta-cetoácidos, metilcetonas, ésteres y lactonas. La conversión de
25 ácidos grasos en componentes de sabor se puede catalizar por las enzimas que se originan de la población microbiana en el queso.

30 Se conoce que el tipo de ácidos grasos libres liberados por las lipasas en el queso se puede influenciar por el tipo de las lipasas utilizadas. Por ejemplo, las lipasas que liberan principalmente ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo, ácidos grasos que contienen C4 y C6) conducen al desarrollo de un sabor picante, agudo, a especias, fuerte, aunque la liberación de los ácidos grasos de cadena media a larga puede conducir a un sabor jabonoso. Las lipasas encuentran uso creciente en otras aplicaciones lácteas diferentes del queso, tal como el Queso modificado con Enzima (EMC; Wilkinson *et al.* en Encyclopédia of Dairy Sciences, (2003; Fox *et al.* eds, Academic Press) p. 434-438) o la hidrólisis de la grasa de mantequilla y nata y sus aplicaciones (Kilara en Encyclopédia of Dairy Sciences, (2003; Fox *et al.* eds, Academic Press) p. 914-918).

35 Las lipasas de rumiante se prefieren sobre las lipasas microbianas en razón de su especificidad para liberar ácidos grasos de cadena corta (ácidos grasos que contienen C4, C6) de la grasa de la leche. Estos compuestos son ya sea compuestos de sabor en si mismos o se convierten en ésteres volátiles con un impacto de sabor particular ((Liu *et al.*, Int. Dairy J. 2004, 14, 923-945). Un tema interesante es la composición de lipasas de rumiante, que es el tema de varios documentos (por ejemplo, Addis *et al* Int. dairy J. (2005) 15, 1271-1278; Richardson *et al*, J. Dairy Sci. (1967) 50, 1061- 1065; Addid *et al* Int. Dairy J. (2005) 15, 563-569; Hamosh Nutrition (1990) 6, 421-428; Calvo *et al* (2004) J. Dairy Sci. 87, 1132-1142). Los datos presentados conducen a la conclusión de que la mayoría de las enzimas de rumiante probablemente son mezclas de 2 o más lipasas, y que las variaciones en la composición ocurren conduciendo a cambios en el comportamiento en la formación de sabor del queso. Esta variación es un conductor para la industria para buscar fuentes de enzimas alternativas con consistencia mejorada. La aparición de enfermedades animales como la tembladera de las ovejas y la enfermedad de las vacas locas es otro conductor para la industria para buscar alternativas. El soporte adicional viene del deseo de tener fácil acceso a los productos de calidad Kosher y Halal. Existe por lo tanto un fuerte deseo industrial por alternativas para lipasas derivadas de animal. La solicitud de patente US 2004/0001819 describe la clonación y expresión de una esterasa pregástrica de cabrito en la levadura *Píchia pastoris*. Aunque potencialmente interesante, la enzima se produce pobremente y además el perfil de liberación del ácido graso libre cambia a ácidos grasos de cadena más larga, comparados con la esterasa de cabrito original. Estos dos aspectos hacen esta enzima poco atractiva en razón de la pobre economía y falta de comportamiento en la aplicación. Una alternativa preferida serían las lipasas microbianas o las lipasas (microbianas) recombinantemente producidas por los microorganismos. Varias lipasas microbianas están en el mercado (véase por ejemplo Bjurlin *et al*, JAOCS (2001) 78, 153-160). La característica más importante de las lipasas microbianas para aplicaciones en queso es su perfil de liberación de ácido graso de la grasa de la leche, que deben imitar tan cercanamente como sean posibles las lipasas derivadas de animal. Las lipasas microbianas son, sin embargo, pobres intérpretes a este respecto en razón a que ellas tienen una preferencia por la liberación de ácidos grasos de cadena larga (C12-C18) con relación a los ácidos grasos de cadena corta (C4, C6). Esto conduce a menudo a la formación de un sabor jabonoso y no al sabor picante deseado. Por lo tanto, a pesar del hecho de que existe un número considerable de preparaciones de lipasa microbiana comerciales en el mercado, subsiste aún
60

la necesidad industrial de una lipasa no derivada de animal que pueda reemplazar las lipasas derivadas de animal tales como las lipasas pregástricas de rumiante.

Se señala que el documento US 2005/059130 describe un método para producir una variante de enzima lipolítica y variantes de enzimas lipolíticas preparadas por el método.

5 Descripción de las Figuras

Figura 1: El perfil FFA generado por las enzimas lipolíticas L01, L03, L04 y por una lipasa microbiana comercial de *Rhizomucor miehei* (Piccantase® R8000) en pasta del Queso Cheddar comparado con el perfil FFA del queso parmesano.

Objeto de la invención

10 Es el objeto de la presente invención proporcionar enzimas lipolíticas novedosas que sean adecuadas para utilizarse en la industria láctea, más particularmente en la elaboración de queso o de productos similares a queso, en la lipólisis de grasa de mantequilla o nata, o en la producción de queso modificado con enzima. Adicionalmente, es un objeto de la invención proporcionar polinucleótidos novedosos que codifican las enzimas lipolíticas novedosas. Un objeto adicional es proporcionar enzimas lipolíticas recombinantemente producidas así como también cepas
15 recombinantes que producen éstas. También los polipéptidos de fusión son parte de la invención, así como también los métodos de elaboración y utilización de los polinucleótidos y polipéptidos de acuerdo con la invención.

Sumario de la Invención

La presente invención proporciona una enzima lipolítica novedosa que es adecuada para utilizarse en la industria láctea. De manera sorprendente, la enzima lipolítica novedosa es extremadamente adecuada para uso en la
20 producción de sabor mediante la modificación enzimática de ingredientes de alimentos que contienen lípido, preferiblemente queso. La enzima lipolítica novedosa se puede utilizar ventajosamente también en la maduración de queso, en la elaboración de productos similares a queso, en la modificación de nata, o de grasa de mantequilla. Adicionalmente, la enzima se puede utilizar adecuadamente también en otras aplicaciones de alimentos, tales como en la elaboración de productos de panadería.

25 La invención proporciona además polinucleótidos novedosos que codifican las enzimas lipolíticas novedosas.

El polinucleótido que codifica una enzima lipolítica de acuerdo con la invención comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de:

- (a) la secuencia nucleotídica como se establece en la SEC ID NO: 1; o
- 30 (b) una secuencia nucleotídica que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 1 y en la que la enzima lipolítica codificada por la secuencia nucleotídica tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18; o
- 35 (c) una secuencia nucleotídica que se hibrida con un polinucleótido que es el complemento de la SEC ID NO: 1 y en la que dicha secuencia nucleotídica es al menos 90% de identidad con la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 1 y en la que la enzima lipolítica codificada por la secuencia nucleotídica tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18; o
- 40 (d) una secuencia nucleotídica que codifica los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2; o
- (e) una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 que tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una
45 composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18; o
- (f) una secuencia que es degenerada como resultado de la degeneración del código genético para una secuencia como se define en uno cualquiera de (a) a (e) y en la que la enzima lipolítica codificada por la secuencia nucleotídica tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen
50 C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18.

En particular, la invención proporciona polinucleótidos que tienen una secuencia nucleotídica que se hibrida preferiblemente bajo condiciones restrictivas altas con un polinucleótido que es el complemento de la SEC ID NO: 1

y en donde dicha secuencia es al menos 90% homologa con la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 1. Consecuentemente, la invención proporciona polinucleótidos que son al menos 90%, preferiblemente al menos 91%, más preferiblemente al menos 92%, 93%, 94%, 95%, aún más preferiblemente al menos 96%, 97%, 98% ó 99% homólogas con la secuencia de acuerdo con la SEC ID NO: 1.

- 5 En una realización, tal polinucleótido aislado se puede obtener sintéticamente, por ejemplo mediante síntesis de fase sólida o mediante otros métodos conocidos por la persona experta en la técnica.

En otra realización, la invención proporciona un gen de enzima lipolítica de acuerdo con la SEC ID NO: 1 o equivalentes funcionales que están aún codificando para la enzima activa.

Preferiblemente, el polinucleótido de acuerdo con la invención es una secuencia de ADN.

- 10 La invención también se refiere a vectores que comprenden una secuencia polinucleotídica de acuerdo con la invención, y cebadores, sondas y fragmentos que se pueden utilizar para amplificar o detectar el ADN de acuerdo con la invención.

- 15 En una realización preferida adicional, se proporciona un vector en donde la secuencia polinucleotídica de acuerdo con la invención está operablemente ligada con al menos una secuencia reguladora que permite la expresión de la secuencia polinucleotídica en una célula hospedante adecuada. Preferiblemente, dicha célula hospedante adecuada es un hongo filamentoso, más preferiblemente de las especies *aspergillus*. Las cepas adecuadas pertenecen a *Aspergillus niger*, *oryzae* o *nidulans*. Preferiblemente, la célula hospedante es *Aspergillus niger*.

La invención también se refiere a células hospedantes recombinantemente producidas que contienen los polinucleótidos de acuerdo con la invención.

- 20 La invención también proporciona métodos para preparar polinucleótidos y vectores de acuerdo con la invención.

En otra realización, la invención proporciona células hospedantes recombinantes en donde la expresión de un polinucleótido de acuerdo con la invención se incrementa significativamente o en donde el nivel de producción de la actividad lipolítica se mejora significativamente.

- 25 En otra realización, la invención proporciona una célula hospedante recombinantemente producida que contiene ADN heterólogo u homólogo de acuerdo con la invención, y en donde la célula es capaz de producir una enzima lipolítica funcional de acuerdo con la invención, es decir, es capaz de expresar o preferiblemente sobre-exresar un polinucleótido que codifica la enzima lipolítica de acuerdo con la invención, por ejemplo una cepa de *Aspergillus* que comprende un número de copias creciente de un gen de acuerdo con la invención.

- 30 En aún otro aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad lipolítica. Los polipéptidos de acuerdo con la invención comprenden:

- 35 una secuencia de aminoácidos de acuerdo con los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de la leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18.

Las proteínas de fusión que comprenden un polipéptido de acuerdo con la invención también están dentro del alcance de la invención. La invención también proporciona métodos para elaborar los polipéptidos de acuerdo con la invención.

- 40 La invención también se refiere al uso de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención en cualquier proceso industrial como se describe aquí, más particularmente en la industria de alimentos, por ejemplo en la industria láctea o de panadería.

Descripción detallada de la invención

Polinucleótidos

- 45 La presente invención proporciona en un primer aspecto un polinucleótido aislado que codifica una enzima lipolítica que comprende una secuencia nucleotídica seleccionada de:

(a) la secuencia nucleotídica como se establece en la SEC ID NO: 1; o

- 50 (b) una secuencia nucleotídica que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 1 y en la que la enzima lipolítica codificada por la secuencia nucleotídica tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que

comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18; o

5 (c) una secuencia nucleotídica que se hibrida con un polinucleótido que es el complemento de la SEC ID NO: 1 y en la que dicha secuencia nucleotídica es al menos 90% de identidad con la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 1 y en la que la enzima lipolítica codificada por la secuencia nucleotídica tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18; o

10 (d) una secuencia nucleotídica que codifica los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2; o

15 (e) una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 que tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18; o

20 (f) una secuencia que es degenerada como resultado de la degeneración del código genético para una secuencia como se define en uno cualquiera de (a) a (e) y en la que la enzima lipolítica codificada por la secuencia nucleotídica tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18.

25 En una realización, la presente invención proporciona polinucleótidos que codifican las enzimas lipolíticas, que tienen una secuencia de aminoácidos que corresponde al polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2, o que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de homología con la secuencia de aminoácidos correspondiente al péptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2.

30 En el contexto de la presente invención, "polipéptido maduro" se define aquí como un polipéptido que tiene actividad lipolítica que esta en su forma final tras la traducción y cualquier modificación post-traducciona, tal como el procesamiento N terminal, el truncamiento C terminal, la glicosilación, la fosforilación, etc. El proceso de maduración puede depender del vector de expresión particular utilizado, del huésped de expresión y del proceso de producción. Preferiblemente, el polipéptido maduro tiene 34 hasta 304 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2. Una "secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido maduro" se define aquí como la secuencia polinucleotídica que codifica el polipéptido maduro. Preferiblemente, la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido maduro tiene 100 hasta 912 nucleótidos en la SEC ID NO: 1.

35 La invención proporciona secuencias nucleotídicas que comprenden el gen que codifica la enzima lipolítica así como también su secuencia codificante. De acuerdo con esto, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende la secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEC ID NO: 1 o a variantes tales como equivalentes funcionales de ésta que tienen al menos 90% de homología con la SEC ID NO: 1.

40 En particular, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia nucleotídica que se hibrida, preferiblemente bajo condiciones restrictivas, más preferiblemente bajo condiciones altamente restrictivas, al complemento de un polinucleótido de acuerdo con la SEC ID NO: 1 y en donde preferiblemente dicha secuencia es al menos 90% homóloga con la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 1.

Más específicamente, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende o consiste esencialmente en la secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEC ID NO: 1.

45 Tal polinucleótido aislado se puede obtener mediante síntesis con los métodos conocidos por la persona experta en la técnica.

50 Como se utiliza aquí, los términos "gen" y "gen recombinante" se refieren a moléculas de ácido nucleico que se pueden aislar del ADN cromosómico, que incluye un marco de lectura abierto que codifica una proteína, por ejemplo una enzima lipolítica. Un gen puede incluir secuencias codificantes, secuencias no codificantes, intrones y secuencias reguladoras. Más aún, un gen se refiere a una molécula de ácido nucleico aislado o a un polinucleótido como se definió aquí.

55 Una molécula de ácido nucleico de la presente invención, tal como una molécula de ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 1 o un equivalente funcional de ésta, se puede aislar utilizando técnicas de biología molecular estándar y la información de la secuencia proporcionada aquí. Por ejemplo, utilizando toda o una porción de la secuencia de ácido nucleico de la SEC ID NO: 1 como una sonda de hibridación, se pueden aislar las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención utilizando técnicas de hibridación y clonación estándar (por

ejemplo, como se describe en Sambrook, J., Fritsh, E. F. y Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989).

5 Más aún, una molécula de ácido nucleico que comprende toda o una porción de la SEC ID NO: 1 se puede aislar mediante la reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando cebadores oligonucleotídicos sintéticos diseñados basado en la información de secuencia contenida en la SEC ID NO: 1.

Un ácido nucleico de la invención se puede amplificar utilizando ADNc, ARNm o alternativamente, ADN genómico, como una plantilla, y cebadores oligonucleotídicos apropiados de acuerdo con las técnicas de amplificación de PCR estándar. El ácido nucleico así amplificado se puede clonar en un vector apropiado y se puede caracterar mediante análisis de secuencia de ADN.

10 Adicionalmente, los oligonucleótidos que corresponden a o son hibridables al complemento de las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante técnicas sintéticas estándar, por ejemplo, utilizando un sintetizador de ADN automatizado.

15 En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende la secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEC ID NO: 1. La secuencia de la SEC ID NO: 1 codifica el polipéptido de acuerdo con la SEC ID NO: 2 y la enzima lipolítica de acuerdo con el polipéptido maduro en la SEC ID NO: 2. La enzima lipolítica de acuerdo con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 se indica como L01. La secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEC ID NO: 1 se indica como DNA L01.

20 En otra realización preferida, una molécula de ácido nucleico aislada de la invención comprende una molécula de ácido nucleico que es un complemento de la secuencia nucleotídica mostrada en la SEC ID NO: 1 o un equivalente funcional de estas secuencias nucleotídicas.

Una molécula de ácido nucleico que es complementaria a otra secuencia nucleotídica es aquella que es suficientemente complementaria con la otra secuencia nucleotídica de tal manera que ésta pueda hibridarse a la otra secuencia nucleotídica formando de esta manera un dúplex estable.

25 Un aspecto de la invención corresponde a moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican un polipéptido de la invención o una variante, tal como un equivalente funcional de ésta, por ejemplo un fragmento o dominio biológicamente activo, así como también moléculas de ácido nucleico suficientes para uso como sondas de hibridación para identificar las moléculas de ácido nucleico que codifican un polipéptido de la invención y fragmentos de tales moléculas de ácido nucleico adecuados para uso como cebadores PCR para la amplificación o mutación de las moléculas de ácido nucleico.

30 Un "polinucleótido aislado" o "ácido nucleico aislado" es un ADN o ARN que no está inmediatamente contiguo con ambas de las secuencias codificantes con las cuales está inmediatamente contiguo (uno en el extremo 5' y uno en el extremo 3') en el genoma de origen natural del organismo del cual se deriva. Así, en una realización, un ácido nucleico aislado incluye algunas o todas las secuencias no codificantes 5' (por ejemplo, promotoras) que están inmediatamente contiguas a la secuencia codificante. El término por lo tanto incluye, por ejemplo, un ADN recombinante que se incorpora en un vector, en un plásmido o virus autónomamente replicante, o en el ADN genómico de un procarionte o eucariote, o que existe como una molécula separada (por ejemplo, un fragmento de cADN o de ADN genómico producido mediante PCR o tratamiento de endonucleasa de restricción) independiente de otras secuencias. Éste también incluye un ADN recombinante que es parte de un gen híbrido que codifica un polipéptido adicional que está sustancialmente libre de material celular, material vírico, o medio de cultivo (cuando se produce mediante técnicas de ADN recombinante), o precursores químicos u otras sustancias químicas (cuando se sintetiza químicamente). Más aún, un "fragmento de ácido nucleico aislado" es un fragmento de ácido nucleico que no es de origen natural como un fragmento y no se encontraría en estado natural.

35 Como se utiliza aquí, los términos "polinucleótido" o "molécula de ácido nucleico" pretenden incluir moléculas de ADN (por ejemplo, cADN o ADN genómico) y moléculas de ARN (por ejemplo, mRNA) y análogos del ADN o ARN generados utilizando análogos nucleotídicos. La molécula de ácido nucleico puede ser de monocatenaria o bicatenaria, pero preferiblemente es un ADN bicatenario. El ácido nucleico se puede sintetizar utilizando análogos o derivados de oligonucleótido (por ejemplo, nucleótidos de inosina o de fosforotioato). Tales oligonucleótidos se pueden utilizar, por ejemplo, para preparar ácidos nucleicos que tengan capacidades alteradas de emparejamiento de bases, o resistencia creciente a las nucleasas.

50 Otra realización de la invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que está en contrasentido a una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, por ejemplo la hebra que codificante de una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

También incluidas dentro del alcance de la invención están las cadenas complementarias de los polinucleótidos de acuerdo con la invención.

55

Fragmentos de ácido nucleico, sondas y cebadores

Una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención puede comprender solamente una porción o un fragmento de la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID NO: 1, por ejemplo un fragmento que se puede utilizar como una sonda o cebador o un fragmento que codifica una porción de una proteína de acuerdo con la invención. La secuencia nucleotídica de acuerdo con la invención permite la generación de sondas y cebadores diseñados para uso en identificar y/o clonar equivalentes funcionales de la proteína de acuerdo con la invención que tienen al menos 90% de homología con la proteína de acuerdo con la SEC ID NO: 2. La sonda/cebador comprende típicamente oligonucleótido sustancialmente purificado que comprende típicamente una región de la secuencia nucleotídica que se hibrida preferiblemente bajo condiciones altamente restrictivas a al menos aproximadamente 12 ó 15, preferiblemente aproximadamente 18 ó 20, preferiblemente aproximadamente 22 ó 25, más preferiblemente aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, ó 75 o más nucleótidos consecutivos de una secuencia nucleotídica de acuerdo con la invención.

Se pueden utilizar sondas basadas en las secuencias nucleotídicas de acuerdo con la invención, más preferiblemente basadas en la SEC ID NO: 1, para detectar transcritos o secuencias genómicas que codifican las mismas proteínas o proteínas homólogas, por ejemplo en los organismos. En las realizaciones preferidas, la sonda comprende además un grupo marcador unido a ésta, por ejemplo el grupo marcador puede ser un radioisótopo, un compuesto fluorescente, una enzima, o un cofactor enzimático. Tales sondas se pueden utilizar como parte de un kit de prueba de diagnóstico para identificar células que expresan una proteína de acuerdo con la invención.

Identidad y homología

Los términos "homología" o "porcentaje de identidad" se utilizan intercambiamente aquí. Para los fines de esta invención, se define aquí que con el fin de determinar el porcentaje de homología de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias se alinean con fines de comparación óptima. Con el fin de optimizar el alineamiento entre las dos secuencias, se pueden introducir saltos en cualquiera de las dos secuencias que se comparan. Tal alineamiento se puede llevar a cabo sobre la longitud completa de las secuencias que se comparan. Alternativamente, el alineamiento se puede llevar a cabo sobre una longitud más corta, por ejemplo sobre aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100 o más ácidos nucleicos/bases o aminoácidos. La identidad es el porcentaje de las coincidencias idénticas entre las dos secuencias sobre la región alineada reportada.

Una comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre las dos secuencias se pueden lograr utilizando un algoritmo matemático. La persona experta estará al tanto del hecho de que varios programas de ordenador diferentes están disponibles para alinear las dos secuencias y determinar la homología entre las dos secuencias (Kruskal, J. B. (1983) An overview of sequence comparison In D. Sankoff and J. B. Kruskal, (ed.), Time warps, string edits and macromolecules: the theory and practice of sequence comparison, p. 1-44 Addison Wesley). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias de aminoácidos o entre las dos secuencias nucleotídicas se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch para el alineamiento de las dos secuencias. (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Ambas secuencias de aminoácidos y secuencias nucleotídicas se pueden alinear mediante el algoritmo. El algoritmo de Needleman-Wunsch se ha implementado en el programa de ordenador NEEDLE. Para el propósito de esta invención, se utilizó el programa NEEDLE que proviene del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o mayor, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. and Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) p. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para las secuencias de proteína se utiliza EBLOSUM62 para la matriz de sustitución.

Para la secuencia nucleotídica, se utiliza EDNAFULL. Los parámetros opcionales utilizados son una penalización de apertura de espacio de 10 y una penalización extensión de salto de 0,5. La persona experta apreciará que todos estos diferentes parámetros producirán resultados ligeramente diferentes pero que el porcentaje de identidad total de las dos secuencias no se altera significativamente cuando se utilizan diferentes algoritmos.

Después del alineamiento mediante el programa NEEDLE como se describió anteriormente, el porcentaje de identidad entre la secuencia de consulta y una secuencia de la invención se calcula como sigue: número de posiciones correspondientes en el alineamiento que muestra un aminoácido idéntico o un nucleótido idéntico en ambas secuencias dividido entre la longitud total del alineamiento después de restar el número total de saltos en el alineamiento. La identidad definida tal como se hizo aquí se puede obtener del NEEDLE al utilizar la opción NOBRIEF y se marca en la salida del programa como la "identidad más larga".

Las secuencias de ácido nucleico y proteína de la presente invención se pueden utilizar adicionalmente como una "secuencia de consulta" para desarrollar una búsqueda contra las bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Tales búsquedas se pueden desarrollar utilizando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10. Las búsquedas del nucleótido BLAST se pueden desarrollar con el programa NBLAST, calificación = 100, longitud de palabra = 12, para obtener las secuencias nucleotídicas homólogas a las moléculas de ácido nucleico de la invención. Las búsquedas de proteína BLAST se pueden desarrollar con el programa XBLAST, calificación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácido homólogas con las moléculas de proteína de la invención. Para

obtener los alineamientos espaciados con fine comparativos, se puede utilizar Gapped BLAST como se describe en Altschul, *et al.*, (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17): 3389- 3402. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por omisión de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST). Véase la página del National Center for Biotechnology Information en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.

5 Hibridación

Como se utiliza aquí, el término “hibridar” pretende describir condiciones para la hibridación y lavado bajo las cuales las secuencias nucleotídicas al menos aproximadamente 60%, 65%, 80%, 85%, 90%, preferiblemente al menos 93%, más preferiblemente al menos 95% y el más preferible al menos 98%, homólogas entre sí permanecen típicamente hibridadas el complemento de cada una de las otras.

10 Un ejemplo preferido, no limitante de tales condiciones de hibridación son la hibridación en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de uno o más lavados en 1 X SSC, SDS al 0,1% a 50°C, preferiblemente a 55°C, preferiblemente a 60°C y aún más preferiblemente a 65°C.

15 Las condiciones altamente restrictivas incluyen, por ejemplo, hibridar a 68°C en 5x SSC/5x solución de Denhardt / SDS al 1,0% y lavar en 0,2x SSC/0,1% SDS a temperatura ambiente. Alternativamente, el lavado se puede realizar a 42°C.

La persona experta conocerá las condiciones para aplicar las condiciones de hibridación restrictivas y altamente restrictivas. La guía adicional con relación a tales condiciones está disponible fácilmente en la técnica, por ejemplo en Sambrook *et al.*, 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y.; y Ausubel *et al.* (eds.), 1995, *Current Protocols in Molecular Biology*, (John Wiley & Sons, N.Y.).

20 Por supuesto, un polinucleótido que se hibrida solamente a una secuencia poli A (tal como el tramo poli (A) 3' terminal de los mARN), o a un tramo complementario de los restos T (o U), no se incluiría en un polinucleótido de la invención utilizado para hibridarse específicamente a una porción de un ácido nucleico de la invención, en razón a que tal polinucleótido se hibridaría a cualquier molécula de ácido nucleico que contenga un tramo poli (A) o el complemento de ésta (por ejemplo, prácticamente cualquier clon de cADN bicatenario).

25 Obtención del ADN de longitud completa de los otros organismos

En un enfoque típico, se pueden seleccionar las bibliotecas de cADN construidas de otros organismos, por ejemplo hongos filamentosos, en particular de las especies *Fusarium*.

30 Por ejemplo, las cepas de *Fusarium* se pueden seleccionar para polinucleótidos homólogos con respecto a la SEC ID NO: 1, mediante el análisis de transferencia Northern. Con la detección de los homólogos de transcritos a los polinucleótidos de acuerdo con la invención, las bibliotecas de cADN se pueden construir de ARN aislado proveniente de la cepa apropiada, utilizando técnicas estándar bien conocidas por aquellos expertos en la técnica. Alternativamente, se puede seleccionar una biblioteca de ADN genómico total utilizando una sonda hibridable a un polinucleótido de acuerdo con la invención.

35 Las secuencias del gen homólogo se pueden aislar, por ejemplo, al desarrollar la PCR utilizando dos grupos de cebadores oligonucleotídicos degenerados diseñados sobre la base de las secuencias nucleotídicas como se enseñó aquí.

40 La plantilla para la reacción puede ser el cADN obtenido mediante transcripción inversa del mARN preparado de las cepas conocidas o que se sospecha que expresan un polinucleótido de acuerdo con la invención. El producto de PCR se puede subclonar y secuenciar para asegurar que las secuencias amplificadas representan las secuencias de una nueva secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la invención, o un equivalente funcional de ésta.

El fragmento de PCR luego se puede utilizar para aislar un clon de cADN de longitud completa mediante una variedad de métodos conocidos. Por ejemplo, el fragmento amplificado se puede marcar y utilizar para seleccionar un bacteriófago o una biblioteca de cADN cosmidico. Alternativamente, el fragmento marcado se puede utilizar para seleccionar una biblioteca genómica.

45 La tecnología de PCR también se puede utilizar para aislar las secuencias de cADN de longitud completa de otros organismos. Por ejemplo, se puede aislar el ARN, siguiendo procedimientos estándar, de una fuente celular o de tejido apropiada. Se puede realizar una reacción de transcripción inversa sobre el ARN usando un cebador de oligonucleótido específico para el más extremo 5' del fragmento amplificado para el cebado de la síntesis de la primera hebra.

50 Al híbrido de ARN/ADN resultante se le puede entonces “añadir colas” (por ejemplo, con guaninas) utilizando una reacción de transferasa terminal estándar, el híbrido se puede digerir con RNasa H, y la síntesis de la segunda hebra se puede cebar entonces (por ejemplo, con un cebador poli-C). Así, las secuencias de cADN en dirección 5' del fragmento amplificado se pueden aislar fácilmente. Para una revisión de las estrategias de clonación útiles, véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, más arriba; y Ausubel *et al.*, más arriba.

Vectores

Otro aspecto de la invención corresponde a vectores, que incluyen vectores de clonación y de expresión, que comprenden una secuencia polinucleotídica de acuerdo con la invención que codifica un polipéptido que tiene una actividad lipolítica o un equivalente funcional de éste de acuerdo con la invención. La invención también corresponde a métodos de crecimiento, transformación o transfección de tales vectores en una célula hospedante adecuada, por ejemplo, bajo condiciones en las cuales se produce la expresión de un polipéptido de la invención. Como se utiliza aquí, el término “vector” se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual éste se ha ligado.

Los polinucleótidos de la invención se pueden incorporar en un vector replicable recombinante, por ejemplo un vector de clonación o de expresión. El vector se puede utilizar para replicar el ácido nucleico en una célula hospedante compatible. Así, en una realización adicional, la invención proporciona un método para obtener polinucleótidos de la invención introduciendo un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedante compatible, y haciendo crecer la célula hospedante bajo condiciones que provocan la replicación del vector. El vector se puede recuperar de la célula hospedante. Las células hospedantes adecuadas se describen en adelante.

El vector en el cual se inserta el casete de expresión o el polinucleótido de la invención puede ser cualquier vector que se puede someter convenientemente a procedimientos de ADN recombinante, y la elección del vector dependerá a menudo de la célula hospedante en la cual se va a introducir.

Un vector de acuerdo con la invención puede ser un vector autónomamente replicante, es decir, un vector que existe como una entidad extra-cromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido. Alternativamente, el vector puede ser aquel que, cuando se introduce en una célula hospedante, se integra en el genoma de la célula hospedante y se replica junto con los cromosomas en los que se ha integrado.

Un tipo de vector es un “plásmido”, que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular al cual se pueden ligar segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector vírico, en donde los segmentos de ADN adicionales se pueden ligar al genoma vírico. Ciertos vectores son capaces de replicación autónoma en una célula hospedante en la que se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen bacteriano de replicación y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula hospedante con la introducción en la célula hospedante, y de esta manera se replican a junto con el genoma del hospedante. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de los genes a los cuales están ligados operativamente. Tales vectores se denominan aquí como “vectores de expresión”. En general, los vectores de expresión de utilidad en las técnicas de ADN recombinantes están a menudo en la forma de plásmidos. Los términos “plásmido” y “vector” se pueden utilizar intercambiamente aquí, en razón a que el plásmido es la forma más comúnmente utilizada del vector. Sin embargo, la invención pretende incluir otras tales formas de vectores de expresión, tales como vectores cosmióticos, vectores víricos (por ejemplo, los retrovirus de replicación defectuosa, los adenovirus y los virus adenoasociados) y vectores fágicos que sirven funciones equivalentes.

Los vectores de acuerdo con la invención se pueden utilizar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o utilizar para transfectar o transformar una célula hospedante.

Un vector de la invención puede comprender dos o más, por ejemplo tres, cuatro o cinco, polinucleótidos de la invención, por ejemplo para sobreexpresión.

Los vectores de expresión recombinante de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedante, que significa que el vector de expresión recombinante incluye una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células hospedantes que se van a utilizar para expresión, que están operativamente ligadas a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar.

Dentro de un vector de expresión recombinante, “operablemente ligado” pretende significar que la secuencia nucleotídica de interés está ligada a las secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia nucleotídica (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedante cuando el vector se introduce en la célula hospedante), es decir, el término “operablemente ligado” se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar a su manera pretendida. Una secuencia reguladora, tal como un promotor, potenciador u otra señal de regulación de expresión, “operablemente ligada” a una secuencia codificante se ubica de tal manera que la expresión de la secuencia codificante se logra bajo la condición compatible con las secuencias de control, o las secuencias están dispuestas de tal manera que funcionan conjuntamente para su fin pretendido, por ejemplo la transcripción se inicia en el promotor y procede a través de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido.

La expresión “secuencia reguladora” pretende incluir los promotores, los potenciadores y otros elementos de control de expresión (por ejemplo, señal de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

5 La expresión secuencias reguladoras incluyen aquellas secuencias que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia nucleotídica en muchos tipos de células hospedantes y aquellos que dirigen la expresión de la secuencia nucleotídica solamente en cierta célula hospedante (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido).

10 Un vector o constructo de expresión para una célula hospedante dada puede comprender así los siguientes elementos operablemente ligados entre sí en un orden consecutivo desde el extremo 5' al extremo 3' con relación a la hebra codificante de la secuencia que codifica el polipéptido de la primera invención: (1) una secuencia promotora capaz de dirigir la transcripción de la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido en la célula hospedante dada; (2) opcionalmente, una secuencia señal capaz de dirigir la secreción del polipéptido desde la célula hospedante dada en un medio de cultivo; (3) una secuencia de ADN de la invención que codifica una forma madura y preferiblemente activa de un polipéptido que tiene una actividad lipolítica de acuerdo con la invención; y preferiblemente también (4) una región de terminación de la transcripción (terminadora) capaz de terminar la transcripción en dirección 3' de la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido.

15 En dirección 3' de la secuencia nucleotídica de acuerdo con la invención puede ser una región no traducida 3' que contiene uno o más sitios de terminación de transcripción (por ejemplo, un terminador). El origen del terminador es menos crítico. El terminador puede ser, por ejemplo, nativo a la secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Sin embargo, preferiblemente se utiliza un terminador de levadura en células hospedantes de levadura, y se utiliza un terminador de hongo filamentoso en células hospedantes de hongo filamentoso. Más preferiblemente, el terminador es endógeno a la célula hospedante (en la cual la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido se va a expresar). En la región transcrita, puede estar presente un sitio de unión al ribosoma para traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresada mediante los constructos incluirá un AUG de iniciación de la traducción al comienzo y un codón de terminación apropiadamente ubicado al final del polipéptido que se va a traducir.

20 La expresión mejorada del polinucleótido de la invención también se puede lograr mediante la selección de las regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo, las regiones promotoras, líder de secreción y/o terminadora, que pueden servir para incrementar la expresión y, si se desea, los niveles de secreción de la proteína de interés desde el huésped de expresión y/o para proporcionar el control inducible de la expresión de un polipéptido de la invención.

30 Se apreciará por aquellos expertos en la técnica que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula hospedante que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada, etc. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en células hospedantes para producir de esta manera proteínas o péptidos, codificados mediante ácidos nucleicos como se describe aquí (por ejemplo, el polipéptido que tiene una actividad lipolítica de acuerdo con la invención, el mutante que forma el polipéptido, los fragmentos, las variantes o los equivalentes funcionales de éstos, las proteínas de fusión, etc.).

35 Los vectores de expresión recombinante de la invención se pueden diseñar para la expresión de los polipéptidos de acuerdo con la invención en células procariontas o eucariotas. Por ejemplo, los polipéptidos de acuerdo con la invención se pueden producir en células bacterianas tales como *E. coli* y *Bacilli*, células de insecto (que utilizan vectores de expresión de baculovirus), células fúngicas, células de levadura o células de mamífero. Las células hospedantes adecuadas se discuten adicionalmente en Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Alternativamente, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo utilizando las secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

45 Para la mayoría de los hongos filamentosos y la levadura, el vector o el constructo de expresión se integra preferiblemente en el genoma de la célula hospedante con el fin de obtener transformantes estables. Sin embargo, para ciertas levaduras, también están disponibles vectores episómicos adecuados en los cuales el constructo de expresión se puede incorporar para la expresión estable y de alto nivel, incluyendo sus ejemplos los vectores derivados de los plásmidos 2 μ y pKDI de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*, respectivamente, o los vectores que contienen una secuencia AMA (por ejemplo, AMA1 de *Aspergillus*). En caso de que los constructos de expresión se integren en el genoma de las células hospedantes, los constructos se integran ya sea en loci aleatorios en el genoma, o en loci dianas predeterminados utilizando reconstrucción homóloga, en cuyo caso los loci diana comprenden preferiblemente un gen altamente expresado.

50 De acuerdo con esto, los vectores de expresión útiles en la presente invención incluyen vectores cromosómicos, episómicos, y derivados de virus, por ejemplo vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episoma de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus tales como baculovirus, virus del papiloma, polioma y vacuolizante (papova), virus de la vacuna, adenovirus, virus de la viruela del pollo, virus de pseudorabia y retrovirus, y vectores derivados de sus combinaciones, tales como los derivados del plásmido y de elementos genéticos de bacteriófago, tales como los cósmidos y los fagómidos.

- El inserto de nucleótido se debe ligar operablemente a un promotor apropiado. Además desde el promotor nativo al gen que codifica el polipéptido de la invención, se pueden utilizar otros promotores para dirigir la expresión del polipéptido de la invención. El promotor se puede seleccionar por su eficiencia para dirigir la expresión del polipéptido de la invención en el hospedante de expresión deseado. Los ejemplos de promotores que pueden ser útiles en la invención incluyen el promotor PL del fago lambda, los promotores lac, trp y tac de *E. coli*, los promotores SV40 temprano y tardío y los promotores de las LTR retrovirales, por nombrar unos pocos. Otros promotores adecuados se conocerán por la persona experta. En una realización específica, se prefieren los promotores que son capaces de dirigir un nivel de expresión alto de los polipéptidos de acuerdo con la invención en un hongo o levadura. Tales promotores se conocen en la técnica.
- Se puede utilizar una variedad de promotores que sean capaces de dirigir la transcripción en las células hospedantes de la invención. Preferiblemente, la secuencia promotora se deriva de un gen altamente expresado. Los ejemplos de genes preferidos altamente expresados cuyos promotores se derivan preferiblemente y/o que están comprendidos en los loci diana predeterminados preferidos para la integración de los constructos de expresión incluyen, pero no se limitan, a los genes que codifican las enzimas glicolíticas tales como triosefosfato isomerasas (TPI), gliceraldehído-fosfato deshidrogenasas (GAPDH), fosfoglicerato cinasas (PGK), piruvato cinasas (PYK o PKI), alcohol deshidrogenasas (ADH), así como también los genes que codifican amilasas, glucoamilasas, proteasas, xilanasas, celobiohidrolasas, β -galactosidasas, alcohol (metanol) oxidasas, factores de elongación y proteínas ribosómicas. Los ejemplos específicos de genes altamente expresados adecuados incluyen, por ejemplo, el gen *LAC4* de *Kluyveromyces* sp., los genes de metanol oxidasa (*AOX* y *MOX*) de *Hansenula* y *Pichia*, respectivamente, los genes de glucoamilasa (*glaA*) de *A. niger* y *A. awamori*, el gen de TAKA-amilasa de *A. oryzae*, el gen *gpdA* de *A. nidulans* y los genes de celobiohidrolasa de *T. reesei*.
- Los ejemplos de promotores constitutivos y/o inducibles fuertes que se prefieren para uso en hospedantes de expresión fúngica son aquellos que son obtenibles de los genes fúngicos para xilanasas (*xlnA*), fitasa, ATP-sintetasa, la subunidad 9 (*oliC*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*), alcohol deshidrogenasa (*AdhA*), α -amilasa (*amy*), amilogucosidasa (AG- del gen *glaA*), acetamidasa (*amdS*) y los promotores gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*).
- Los ejemplos de promotores de levadura fuertes son aquellos obtenibles de los genes para el alcohol deshidrogenasa, lactasa, 3-fosfoglicerato cinasa y triosefosfato isomerasa.
- Los ejemplos de promotores bacterianos fuertes son los promotores α -amilasa y *SPo2* así como también los promotores provenientes de genes de proteasa extracelular.
- Los promotores adecuados para las células vegetales incluyen nopalina sintasa (*nos*), octopina sintasa (*ocs*), manopina sintasa (*mas*), la subunidad pequeña de ribulosa (rubisco ssu), histona, actina de arroz, faseolina, el virus del mosaico del coliflor (CMV) 35S y 19S y los promotores de circovirus.
- Todos los promotores anteriormente mencionados están fácilmente disponibles en la técnica.
- El vector puede incluir además secuencias que flanquean el polinucleótido que da origen al ARN el cual comprende las secuencias homólogas a las secuencias genómicas eucariotas o a las secuencias genómicas víricas. Esto permitirá la introducción de los polinucleótidos de la invención en el genoma de una célula hospedante.
- El vector puede contener un polinucleótido de la invención orientado en una dirección antisentido para proporcionar la producción del ARN antisentido.
- El ADN del vector se puede introducir en células procariontas o eucariotas por vía de técnicas de transformación o de transfección convencionales. Como se utiliza aquí, los términos "transformación" y "transfección" pretenden referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico extraño (por ejemplo, ADN) en una célula hospedante, que incluye co-precipitación con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transducción, infección, lipofección, transfección mediada por lípidos catiónicos o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedantes se pueden encontrar en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989), Davis et al., Basic Methods in Molecular Biology (1986) y otros manuales de laboratorio.
- Para la transfección estable de las células de mamífero, se conoce que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizada, solamente una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) se introduce de manera general en las células hospedantes junto con el gen de interés. Los marcadores seleccionables preferidos incluyen, pero no se limitan a, aquellos que confieren resistencia a fármacos o que complementan un defecto en la célula hospedante. Ellos incluyen, por ejemplo, genes marcadores versátiles que se pueden utilizar para la transformación de la mayoría de los hongos filamentosos y levaduras, tales como los genes de acetamidasa o los cADN (los genes *amdS*, *niaD*, *facA* o los cADN de *A. nidulans*, *A. oryzae* o *A. niger*), o genes que proporcionan resistencia a antibióticos como G418, higromicina, bleomicina, canamicina, metotrexato, resistencia a fleomicina orbenomilo (*benA*). Alternativamente, se pueden utilizar marcadores de

selección específicos, tales como los marcadores auxotróficos que requieran las cepas hospedantes mutantes correspondientes: por ejemplo URA3 (de *S. cerevisiae* o genes análogos de otras levaduras), *pyrG* o *pyrA* (de *A. nidulans* o *A. niger*), *argB* (de *A. nidulans* o *A. niger*) o *trpC*. En una realización preferida, el marcador de selección se suprime de la célula hospedante transformada después de la introducción del constructo de expresión, con el fin de obtener células hospedantes transformadas capaces de producir el polipéptido que están libres de los genes marcadores de selección.

Otros marcadores incluyen el ATP sintetasa, la subunidad 9 (*oliC*), la orotidina-5'-fosfatedecarboxilasa (*pvrA*), el gen de resistencia a G418 bacteriano (este también se puede usar en levadura, pero no en hongos), el gen de resistencia a ampicilina (*E. coli*), el gen de resistencia a neomicina (*Bacillus*) y el gen *uidA* de *E. coli*, que codifica para β -glucuronidasa (GUS). Los vectores se pueden utilizar *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN, o se pueden utilizar para transfectar o transformar una célula hospedante.

La expresión de las proteínas en procariotas a menudo se lleva a cabo en *E. coli* con vectores que contienen los promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no fusión. Los vectores de fusión añaden un número de aminoácidos a una proteína codificada en ellos, por ejemplo el término amino de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión típicamente sirven tres propósitos: 1) incrementar la expresión de la proteína recombinante; 2) incrementar la solubilidad de la proteína recombinante; y 3) ayudar en la purificación de la proteína recombinante al actuar como un ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para posibilitar la separación de la proteína recombinante del resto de fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión.

Como se indica, los vectores de expresión contendrán preferiblemente marcadores seleccionables. Tales marcadores incluyen resistencia a dihidrofolato reductasa o a neomicina para cultivo de célula eucariótica, y resistencia a tetraciclina o ampicilina para cultivos en *E. coli* y en otras bacterias. Los ejemplos representativos del hospedante apropiado incluyen células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium* y ciertas especies de *Bacillus*; células fúngicas tales como especies de *Aspergillus*, por ejemplo *A. niger*, *A. oryzae* y *A. nidulans*, levaduras tales como *Kluyveromyces*, por ejemplo *K. lactis* y/o *Pichia*, por ejemplo *P. pastoris*; células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células de animales tales como CHO, COS y *Bowes melanoma*; y células vegetales. Los medios de cultivo apropiados y las condiciones para las células hospedantes descritas anteriormente se conocen en la técnica.

Los vectores preferidos para uso en bacterias están por ejemplo descritos en el documento WO-A1-2004/074468, que se incluye aquí como referencia. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes a aquellos medianamente versados.

Los promotores bacterianos conocidos adecuados para uso en la presente invención incluyen los promotores descritos en el documento WO-A1-2004/074468, que se incluye aquí como referencia.

La transcripción del ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención mediante eucariotas superiores se puede incrementar al insertar una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de acción cis del ADN, usualmente aproximadamente desde 10 hasta 300 pb que actúan para incrementar la actividad trascricional de un promotor en un tipo de célula hospedante dado. Los ejemplos de potenciadores incluyen el potenciador SV40, que se localiza en el lado tardío del origen de replicación a 100 hasta 270 pb, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus.

Para la secreción de la proteína traducida en la luz del retículo endoplásmico, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, se puede incorporar la señal de secreción apropiada en el gen expresado. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

El polipéptido de acuerdo con la invención se puede producir de una manera modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no solamente señales de secreción sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Así, por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, particularmente los aminoácidos cargados, se pueden añadir al término N del polipéptido para mejorar la estabilidad y la persistencia en la célula hospedante, durante la purificación o durante la manipulación y almacenamiento posteriores. También, los restos peptídicos se pueden añadir al polipéptido para facilitar la purificación.

Polipéptidos de acuerdo con la Invención

La invención proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad lipolítica, que comprende:

una secuencia de aminoácidos de acuerdo con los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 o una secuencia de aminoácidos al menos 90% idéntica a los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende

grasa de la leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18.

5 Por lo tanto, la invención proporciona un polipéptido aislado que tiene actividad lipolítica que comprende el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2, preferiblemente que comprende los aminoácidos 34-304 de la SEC ID NO: 2, y una secuencia de aminoácidos obtenible al expresar el polinucleótido de la SEC ID NO: 1 en un hospedante apropiado. También, un péptido o polipéptido que es un equivalente funcional y que es al menos 90% homólogo con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 está comprendido dentro de la presente invención.

10 Los polipéptidos anteriores están colectivamente comprendidos en el término "polipéptidos de acuerdo con la invención".

15 Los términos "péptido" y "oligopéptido" se consideran sinónimos (como se reconoce comúnmente), y cada término se puede utilizar intercambiamente en la medida en que el contexto lo requiera para indicar una cadena de al menos dos aminoácidos acoplados por enlaces peptídico. La palabra "polipéptido" (o proteína) se utiliza aquí para cadenas que contienen más de siete restos de aminoácido. Todas las fórmulas o secuencias oligopeptídicas y polipeptídicas aquí se escriben de izquierda a derecha y en la dirección del término amino al término carboxi. El código de una letra de aminoácidos utilizado aquí se conoce comúnmente en la técnica y se puede encontrar en Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2a, ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989).

20 Por polipéptido o proteína "aislada" se pretende un polipéptido o una proteína eliminada de su entorno nativo. Por ejemplo, los polipéptidos recombinantemente producidos y las proteínas producidas en las células hospedantes se consideran aislados para el propósito de la invención puesto que son polipéptidos nativos o recombinantes que han sido sustancialmente purificados mediante cualquier técnica adecuada, tal como, por ejemplo, el método de purificación de etapa única descrito en Smith y Johnson, Gene 67:31-40 (1988).

25 Como se conoce para la persona experta en la técnica, es posible que el término N de la SEC ID NO: 2 o del polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 pudiera ser heterogéneo así como también el término C de la SEC ID NO: 2 o del polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2, debido a errores de procesamiento durante la maduración. En particular, tales errores de procesamiento podrían ocurrir con la sobreexpresión del polipéptido. Además, la actividad de exo-proteasa podría dar origen a heterogeneidad. El grado al cual ocurre la heterogeneidad depende también del hospedante y los protocolos de fermentación que se utilicen. Tales artefactos de procesamiento C terminales podrían conducir a polipéptidos más cortos o polipéptidos más largos como se indica en la SEC ID NO: 2, o con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2. Como resultado de tales errores, el término N también podría ser heterogéneo.

35 En una realización adicional, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica al menos un dominio funcional de un polipéptido de acuerdo con la SEC ID NO: 2 o del polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que contiene restos adicionales y comienza en la posición -1, o -2, o -3, etc. Alternativamente, podrían faltar ciertos restos y, como consecuencia, comenzar en la posición 2, o 3, o 4, etc. También pueden estar presentes restos adicionales en el término C, por ejemplo en la posición 347, 348, etc. Alternativamente, al término C le podrían faltar ciertos restos y, como consecuencia, podría terminar en la posición 345, o 344, etc.

40 La enzima lipolítica de acuerdo con la invención se puede recuperar y purificar de los cultivos de célula recombinante mediante los métodos conocidos en la técnica (Protein Purification Protocols, Methods in Molecular Biology series por Paul Cutler, Humana Press, 2004).

45 Los polipéptidos de la presente invención incluyen productos naturalmente purificados, productos de procedimientos sintéticos químicos, y productos producidos mediante técnicas recombinantes de un hospedante procarionta o eucariota, que incluye, por ejemplo, células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos. Dependiendo del hospedante empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención se pueden glicosilar o se pueden no glicosilar. Además, los polipéptidos de la invención también pueden incluir un resto de metionina modificado inicial, en algunos casos como resultado de los procesos mediados por huésped.

Fragmentos polipeptídicos

La invención también caracteriza fragmentos biológicamente activos de los polipéptidos de acuerdo con la invención.

55 Los fragmentos biológicamente activos de un polipéptido de la invención incluyen polipéptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente idénticas con o derivadas de la secuencia de aminoácidos de la proteína de acuerdo con la invención (por ejemplo, el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2), que incluye menos aminoácidos que la proteína de longitud completa pero que exhibe al menos una actividad biológica de la proteína de longitud completa correspondiente, preferiblemente que exhibe actividad

lipolítica. Típicamente, los fragmentos biológicamente activos comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de la proteína de acuerdo con la invención. Un fragmento biológicamente activo de una proteína de la invención puede ser un polipéptido que es, por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 25, o más aminoácidos en longitud más corto que el polipéptido maduro en la SEC ID NO: 2, y que tiene al menos 90% de homología con el polipéptido maduro en la SEC ID NO: 2. Más aún, se pueden preparar otras porciones biológicamente activas, en las cuales se suprimen otras regiones de la proteína, mediante técnicas recombinantes, y se pueden evaluar en busca de una o más actividades biológicas de la forma nativa de un polipéptido de la invención.

La invención también caracteriza fragmentos de ácido nucleico que codifican los fragmentos biológicamente activos anteriores de la proteína de acuerdo con la invención.

10 Proteínas de Fusión

Los polipéptidos de acuerdo con la invención o sus equivalentes funcionales, por ejemplo sus porciones biológicamente activas, se pueden ligar operativamente a un polipéptido no de acuerdo con la invención (por ejemplo, secuencias de aminoácido heterólogas) para formar proteínas de fusión. Un "polipéptido no de acuerdo con la invención" se refiere a un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos que corresponde a una proteína que no es sustancialmente homóloga con la proteína de acuerdo con la invención. Tal "polipéptido no de acuerdo con la invención" se puede derivar del mismo o de un organismo diferente. Dentro de una proteína de fusión, el polipéptido de acuerdo con la invención puede corresponder a todo o un fragmento biológicamente activo de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención. En una realización preferida, una proteína de fusión comprende al menos dos porciones biológicamente activas de la proteína de acuerdo con la invención. Dentro de la proteína de fusión, el término "operablemente ligado" pretende indicar que el polipéptido de acuerdo con la invención y el polipéptido no de acuerdo con la invención estén fusionados entre sí en el marco. El polipéptido no de acuerdo con la invención se puede fusionar al término N o al término C del polipéptido.

Por ejemplo, en una realización, la proteína de fusión es una proteína de fusión en la cual las secuencias de aminoácidos se fusionan al término C de las secuencias GST. Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de la proteína recombinante de acuerdo con la invención. En otra realización, la proteína de fusión de acuerdo con la invención es una proteína que contiene la secuencia señal heteróloga en su término N. En ciertas células hospedantes (por ejemplo, células hospedantes de mamífero y de levadura), la expresión y/o la secreción de la proteína de acuerdo con la invención se pueden incrementar a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

En otro ejemplo, la secuencia secretora gp67 de la proteína de cubierta del baculovirus se puede utilizar como una secuencia señal heteróloga (Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, 1992). Otros ejemplos de secuencias señal heterólogas eucariotas incluyen las secuencias secretoras de melitina y fosfatasa alcalina de placenta humana (Stratagene; La Jolla, California). En aún otro ejemplo, las secuencias señal heterólogas procariotas útiles incluyen la señal secretora phoA (Sambrook et al., *más arriba*) y la señal secretora de la proteína A (Pharmacia Biotech; Piscataway, New Jersey).

Se puede utilizar una secuencia señal para facilitar la secreción y el aislamiento de una proteína o polipéptido de la invención. Las secuencias señal se caracterizan típicamente por un núcleo de aminoácidos hidrófobos, que se escinden generalmente desde la proteína madura durante la secreción en uno o más sucesos de escisión. Tales péptidos señal contienen sitios de procesamiento que permiten la escisión de la secuencia señal desde las proteínas maduras a medida que pasan a través de la ruta secretora. La secuencia señal dirige la secreción de la proteína, tal como desde el hospedante eucariota en el cual se transforma el vector de expresión, y la secuencia señal se escinde posterior o concurrentemente. La proteína se puede purificar fácilmente entonces del medio extracelular mediante métodos conocidos. Alternativamente, la secuencia señal se puede ligar a la proteína de interés utilizando una secuencia, que facilita la purificación, tal como con un dominio GST. Así, por ejemplo, la secuencia que codifica el polipéptido se puede fusionar a una secuencia marcadora, tal como la secuencia que codifica un péptido, que facilita la purificación del polipéptido fusionado. En ciertas realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, la secuencia marcadora es un péptido de hexa-histidina, tal como la etiqueta proporcionada en el vector pQE (Qiagen, Inc), entre otros, muchos de los cuales están comercialmente disponibles. Como se describe en Gentz et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824 (1989), por ejemplo, la hexa-histidina proporciona purificación conveniente de la proteína de fusión. La etiqueta HA es otro péptido útil para la purificación que corresponde a un epítipo derivado de la proteína hemaglutinina de la gripe, que se ha descrito por Wilson et al., Cell 37:767 (1984), por ejemplo.

Preferiblemente, la proteína de fusión de la invención se produce mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias polipeptídicas se ligan juntos en el marco de acuerdo con técnicas convencionales, por ejemplo al emplear términos de extremo romo o de extremo escalonado para ligación, digestión de enzima de restricción para proporcionar los términos apropiado, llenado de extremos cohesivos según sea adecuado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar la unión indeseable, y ligación enzimática. En otra realización, el gen de fusión se puede sintetizar mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, la amplificación mediante PCR de los fragmentos génicos se puede llevar a cabo utilizando cebadores de anclaje, que dan origen a salientes complementarios entre dos fragmentos génicos consecutivos que se pueden hibridar y reamplificar para generar una secuencia génica

quimérico (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John & Wiley & Sons: 1992). Más aún, hay comercialmente disponibles muchos vectores de expresión que ya codifican un resto de fusión (por ejemplo, un polipéptido GST). Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención se puede clonar en tal vector de expresión de tal manera que el resto de fusión está ligado en el marco a la proteína de acuerdo con la invención.

Equivalentes funcionales

Los términos “equivalentes funcionales” y “variantes funcionales” se utilizan intercambiamente aquí.

Los equivalentes funcionales del polinucleótido de acuerdo con la invención son polinucleótidos aislados que tienen al menos 90% de homología con la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 1 y que codifica un polipéptido que exhibe al menos una función particular de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención, preferiblemente un polipéptido que tiene actividad lipolítica. Un equivalente funcional de un polipéptido de acuerdo con la invención es un polipéptido que tiene al menos 90% de homología con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 y que exhibe al menos una función de una enzima lipolítica de acuerdo con la invención, preferiblemente que exhibe actividad lipolítica. Los equivalentes funcionales como se mencionan aquí también comprenden fragmentos biológicamente activos que tienen actividad lipolítica como se describió anteriormente.

Los equivalentes funcionales del polipéptido de acuerdo con la invención pueden contener sustituciones de uno o más aminoácidos del polipéptido maduro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2, o sustituciones, inserciones o supresiones de los aminoácidos que no afectan la funcionalidad particular de la enzima. De acuerdo con esto, una sustitución de aminoácidos funcionalmente neutra es una sustitución en el polipéptido maduro de la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que no altera sustancialmente su funcionalidad particular. Por ejemplo, se predice que los restos de aminoácidos que se conservan entre las proteínas de la presente invención son particularmente no susceptibles a alteración. Adicionalmente, los aminoácidos conservados entre las proteínas de acuerdo con la presente invención y otras enzimas lipolíticas no son probablemente susceptibles a alteración.

Los equivalentes funcionales de los polinucleótidos de acuerdo con la invención pueden contener típicamente mutaciones silenciosas o mutaciones que no alteran la función biológica del polipéptido codificado. De acuerdo con esto, la invención proporciona moléculas de ácido nucleico que codifican polipéptidos de acuerdo con la invención que contienen cambios en los restos de aminoácidos que no son esenciales para la actividad biológica particular. Tales proteínas difieren en la secuencia de aminoácidos del polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2, y aún retienen al menos la actividad biológica de éste, preferiblemente retienen la actividad lipolítica. En una realización, un equivalente funcional del polinucleótido de acuerdo con la invención comprende una secuencia nucleotídica que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención, en donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos sustancialmente homóloga de al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2. En una realización, el equivalente funcional del polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que tiene al menos 90% de homología con ésta es el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 4 (indicada posteriormente como L02), en otra realización es el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 6 (indicada posteriormente como L03), y en aún otra realización es el polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 8 (indicada posteriormente como L04). En una realización preferida, el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 6 o SEC ID NO: 8 respectivamente es la secuencia de aminoácidos 34 hasta 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 6 o SEC ID NO: 8, respectivamente.

Un equivalente funcional del polinucleótido de acuerdo con la invención que codifica un polipéptido de acuerdo con la invención comprenderá una secuencia polinucleotídica que es al menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homóloga con la secuencia de ácido nucleico de acuerdo con la SEC ID NO: 1.

En una realización, un equivalente funcional del polinucleótido de acuerdo con la SEC ID NO: 1 que tiene al menos 90% de homología con ésta es el polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEC ID NO: 3 (indicada como ADN L02), en otra realización es el polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEC ID NO: 5 (indicada como ADN L03), en aún otra realización es el polinucleótido que tiene una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEC ID NO: 7 (indicada como ADN L04). La secuencia polinucleotídica de acuerdo con la SEC ID NO: 3 codifica el polipéptido de acuerdo con la SEC ID NO: 4, la secuencia polinucleotídica de acuerdo con la SEC ID NO: 5 codifica el polipéptido de acuerdo con la SEC ID NO: 6, la secuencia polinucleotídica de acuerdo con la SEC ID NO: 7 codifica el polipéptido de acuerdo con la SEC ID NO: 8. En una realización preferida, el polinucleótido 100-912 en la SEC ID NO: 3, 5, 7, respectivamente, codifica el polipéptido maduro en la SEC ID NO: 4, 6, 8.

Se puede crear un polinucleótido aislado que codifica una proteína homologa con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 introduciendo una o más sustituciones, adiciones o supresiones nucleotídicas en las secuencias nucleotídicas codificantes de acuerdo con la SEC ID NO: 1, de tal manera que se introducen en la proteína codificada una o más sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos. Tales mutaciones se pueden introducir mediante técnicas estándares, tal como la mutagénesis dirigida al sitio y la mutagénesis medida por PCR.

Los ácidos nucleicos que codifican otros miembros de la familia que tienen actividad lipolítica, que tienen así una secuencia nucleotídica que difiere de la SEC ID NO: 1, 3, 5, 7, y que cumplen con las condiciones mencionadas anteriormente, están dentro del alcance de la invención. Más aún, los ácidos nucleicos que codifican proteínas que tienen actividad lipolítica, que tienen una secuencia de aminoácidos que difiere del polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2, 4, 6, 8 y que cumplen las condiciones mencionadas anteriormente están dentro del alcance de la invención.

Los polinucleótidos de acuerdo con la invención se pueden optimizar en su uso de codones, preferiblemente de acuerdo con los métodos descritos en los documentos WO2006/077258 y/o WO2008/000632. El documento WO2008/000632 señala la optimización del par de codones. La optimización del par de codones es un método en el que las secuencias nucleotídicas que codifican un polipéptido se modifican con respecto a su uso de los codones, en particular los pares de codones que se utilizan, para obtener la expresión mejorada de la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido, y/o la producción mejorada del polipéptido codificado. Los pares de codones se definen como un conjunto de dos tripletes subsecuentes (codones) en una secuencia codificante.

Las moléculas de ácido nucleico que corresponde a variantes (por ejemplo, variantes alélicas naturales) y homólogos de los polinucleótidos de acuerdo con la invención se pueden aislar basándose en su homología con los ácidos nucleicos descritos aquí utilizando los cADN descritos aquí o un fragmento adecuado de éstos, como una sonda de hibridación de acuerdo con las técnicas de hibridación estándar, preferiblemente bajo condiciones de hibridación altamente restrictivas.

En otro aspecto de la invención, se proporcionan proteínas mejoradas. Las proteínas mejoradas son proteínas en las que se mejora al menos una actividad biológica si se compara con la actividad biológica del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2. Tales proteínas se pueden obtener al introducir aleatoriamente mutaciones a lo largo de todo o parte de la secuencia codificante de la SEC ID NO: 1, tal como mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden expresar recombinantemente y se pueden seleccionar en busca de la actividad biológica. Por ejemplo, la técnica proporciona ensayos estándar para medir la actividad enzimática de las enzimas lipolíticas, y así se pueden seleccionar más fácilmente las proteínas mejoradas.

En una realización preferida, el polipéptido de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con los aminoácidos 34 a 304 en la SEC ID NO: 2. En otra realización, el polipéptido es al menos 90% homólogo con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 y retiene al menos una actividad biológica de un polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2, preferiblemente retiene la actividad lipolítica, y difiere aún en la secuencia de aminoácidos debido a la variación natural o la mutagénesis como se describió anteriormente.

En una realización preferida adicional, la proteína de acuerdo con la invención tiene una secuencia de aminoácidos codificada por un fragmento de ácido nucleico aislado que se hibrida con un polinucleótido que es el complemento de la SEC ID NO: 1 y en el que dicha secuencia nucleotídica es al menos 90% homologa con la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 1, preferiblemente bajo condiciones de hibridación altamente restrictivas.

De acuerdo con esto, la proteína de acuerdo con la invención es preferiblemente una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más homologa con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2, y retiene al menos una actividad funcional del polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2.

Los equivalentes funcionales de una proteína de acuerdo con la invención también se pueden identificar, por ejemplo, seleccionando bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo mutantes de truncamiento, de la proteína de la invención para la actividad de enzima lipolítica. En una realización, se genera una biblioteca variegada de variantes mediante mutagénesis combinatoria al nivel de ácidos nucleicos. Se puede producir una biblioteca variegada de las variantes, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de tal manera que un conjunto degenerado de secuencias de proteína potenciales es expresable como polipéptidos individuales, o alternativamente, como un conjunto de proteínas de fusión más grandes (por ejemplo, para presentación de fagos). Existe una variedad de métodos que se pueden utilizar para producir bibliotecas de variantes potenciales de los polipéptidos de la invención a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. Los métodos para sintetizar los oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Narang (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al. (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477).

Además, se pueden utilizar bibliotecas de fragmentos de la secuencia codificante de un polipéptido de la invención para generar una población variegada de polipéptidos para seleccionar una selección posterior de variantes. Por ejemplo, se puede generar una biblioteca de fragmentos de secuencias codificantes tratando un fragmento de PCR bicatenario de la secuencia codificante de interés con una nucleasa bajo condiciones en las que se produce un corte sólo aproximadamente una vez por molécula, desnaturalizando el ADN bicatenario, renaturalizando el ADN para formar un ADN bicatenario que puede incluir pares sentido/antisentido de diferentes productos cortados, removiendo las porciones monocatenarias de los dúplex reformados mediante el tratamiento con nucleasa S1, y ligando la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Por este método, se puede derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N terminales e internos de varios tamaños de la proteína de interés.

Se conocen varias técnicas en la técnica para seleccionar productos génicos de bibliotecas combinatorias hechas mediante mutaciones de truncamiento puntuales, y para seleccionar bibliotecas de cADN para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Las técnicas más ampliamente utilizadas, que son susceptibles a análisis de alto rendimiento, para seleccionar grandes bibliotecas de genes incluyen típicamente clonar la biblioteca de genes en vectores de expresión replicables, transformar células apropiadas con la biblioteca resultante de los vectores, y expresar los genes combinatorios bajo condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. La mutagénesis de ensamblaje recursivo (REM), una técnica que mejora la frecuencia de los mutantes funcionales en las bibliotecas, se puede utilizar en combinación con los ensayos de selección para identificar variantes de una proteína de la invención (Arkin y Yourvan (1992) Proc. Nati. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delgrave et al. (1993) Protein Engineering 6(3): 327-331).

Los fragmentos de un polinucleótido de acuerdo con la invención también pueden comprender polinucleótidos que no codifican polipéptidos funcionales. Tales polinucleótidos pueden funcionar como sondas o cebadores para una reacción de PCR.

Se pueden utilizar ácidos nucleicos de acuerdo con la invención, sin importar si codifican polipéptidos funcionales o no funcionales, como sondas de hibridación o cebadores de la reacción en cadena de polimerasa (PCR). Los usos de las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que no codifican un polipéptido que tiene una actividad lipolítica de acuerdo con la invención incluyen, entre otros, (1) aislar el gen que codifica la proteína, o sus variantes alélicas a partir de una biblioteca de cADN; (2) la hibridación in situ (por ejemplo, FISH) a propagaciones cromosómicas de metafase para proporcionar la localización cromosómica precisa del gen, como se describe en Verma et al., Human Chromosomes: a Manual of Basic Techniques, Pergamon Press, Nueva York (1988); (3) el análisis de transferencia Northern para detectar la expresión del mRNA en tejidos y/o células específicas; y (4) sondas y cebadores que se pueden utilizar como una herramienta de diagnóstico para analizar la presencia de un ácido nucleico hibridable a la sonda en una muestra biológica dada (por ejemplo, tejido).

También comprendido por la invención es un método para obtener un equivalente funcional de un gen de acuerdo con la invención. Tal método implica obtener una sonda marcada que incluye un ácido nucleico aislado que codifica toda o una porción de una secuencia de proteína de acuerdo con el polipéptido maduro en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 o una variante de cualquiera de ellas; seleccionar una biblioteca de fragmentos de ácido nucleico con una sonda marcada bajo condiciones que permitan la hibridación de la sonda a los fragmentos de ácido nucleico en la biblioteca, formando de esta manera los dúplex de ácido nucleico, y preparar una secuencia génica de longitud completa de los fragmentos de ácido nucleico en cualquier dúplex marcado para obtener un gen relacionado con el gen de acuerdo con la invención.

Células hospedantes

En otra realización, la invención caracteriza células, por ejemplo células hospedantes transformadas o células hospedantes recombinantes que comprenden un polinucleótido de acuerdo con la invención, o que comprenden un vector de acuerdo con la invención.

Una "célula transformada" o "célula recombinante" es una célula en la cual (o en un ancestro de la cual) se ha introducido, por medio de técnicas de ADN recombinante, un ácido nucleico de acuerdo con la invención. Ambas células procariotas y eucariotas están incluidas, por ejemplo bacterias, hongos, levaduras, y similares. Las células hospedantes también incluyen, pero no se limitan a, líneas celulares de mamífero tales como CHO, VERO, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, WI38, y líneas celulares del plexo coroideo. Un número de vectores adecuados para la transfección estable de células de mamífero están disponibles al público, los métodos para construir tales líneas celulares también son públicamente conocidos, por ejemplo en Ausubel et al. (supra). Se prefieren especialmente las células provenientes de hongos filamentosos, en particular las especies *Aspergillus* tales como *Aspergillus niger* u *oryzae* o *awamori*.

Se puede escoger una célula hospedante que module la expresión de las secuencias insertadas, o que modifique y procese el producto génico en una forma específica, deseada. Tales modificaciones (por ejemplo, glicosilación) y procesamiento (por ejemplo, división) de los productos de proteína pueden facilitar el funcionamiento óptimo de la proteína.

Diversas células hospedantes tienen características y mecanismos específicos para el procesamiento post-transduccional y la modificación de las proteínas y los productos génicos. Se pueden escoger líneas celulares apropiadas o sistemas hospedantes familiares para aquellos expertos en la técnica de biología molecular y/o microbiología para asegurar la modificación deseada y correcta y el procesamiento de la proteína extraña producida.

5 Para este fin, se pueden utilizar células hospedantes eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado del transcrito primario, la glicosilación, y la fosforilación del producto génico. Tales células hospedantes se conocen bien en la técnica.

Si se desea, una célula como se describió anteriormente se puede utilizar en la preparación de un polipéptido de acuerdo con la invención. Tal método comprende típicamente cultivar una célula hospedante recombinante (por ejemplo, transformada o transfectada con el vector de expresión como se describió anteriormente) bajo condiciones para proporcionar la expresión (mediante el vector) de una secuencia codificante que codifica el polipéptido, y opcionalmente recuperar, más preferiblemente recuperar y purificar el polipéptido producido a partir de la célula o medio de cultivo. Los polinucleótidos de la invención se pueden incorporar en un vector recombinante replicable, por ejemplo un vector de expresión. El vector se puede utilizar para replicar el ácido nucleico en una célula hospedante compatible. Así, en una realización adicional, la invención proporciona un método para elaborar un polinucleótido de la invención introduciendo un polinucleótido de la invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedante compatible, y haciendo crecer la célula hospedante bajo condiciones que provocan la replicación del vector. El vector se puede recuperar de la célula hospedante.

Preferiblemente, el polipéptido se produce como una proteína secretada, en cuyo caso la secuencia nucleotídica que codifica una forma madura del polipéptido en el constructo de expresión está operablemente ligada a una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia señal. Preferiblemente, la secuencia señal es nativa (homóloga) a la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido. Alternativamente, la secuencia señal es extraña (heteróloga) a la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido, en cuyo caso la secuencia señal es preferiblemente endógena a la célula hospedante en la cual se expresa la secuencia nucleotídica de acuerdo con la invención. Los ejemplos de secuencias señal adecuadas para células hospedantes de levadura son las secuencias señal derivadas de los genes del factor α de levadura. De manera similar, una secuencia señal adecuada para células hospedantes fúngicas filamentosas es por ejemplo una secuencia señal derivada de un gen de amiloglucosidasa fúngico filamentososo (AG), por ejemplo un gen *glaA* de *A. niger*. Este se puede utilizar en combinación con el propio promotor de amiloglucosidasa (también denominado (gluco) amilasa), así como también en combinación con otros promotores. Las secuencias señal híbridas también se pueden utilizar con el contexto de la presente invención.

Las secuencias líderes de secreción heteróloga preferidas son aquellas que se originan del gen de amiloglucosidasa fúngico (AG) (*glaA*- versiones tanto de 18 como de 24 aminoácidos, por ejemplo de *Aspergillus*), el gen del factor α (levaduras, por ejemplo *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o el gen de α -amilasa (*Bacillus*).

Los vectores se pueden transformar o transfectar en células hospedantes adecuadas como se describieron anteriormente para proporcionar la expresión de un polipéptido de la invención. Este proceso puede comprender cultivar una célula hospedante transformada con un vector de expresión como se describió anteriormente bajo condiciones para proporcionar la expresión por el vector de una secuencia codificante que codifica el polipéptido.

La invención proporciona así células hospedantes transformadas o transfectadas con o que comprenden un polinucleótido o vector de la invención. Preferiblemente, el polinucleótido se lleva en un vector para la replicación y la expresión de un polinucleótido. Las células serán escogidas para ser compatibles con dicho vector, y pueden ser por ejemplo células procariotas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levadura o de vegetales.

Un hospedante heterólogo también se puede escoger, en el que el polipéptido de la invención se produce en una forma que está sustancialmente libre de actividades enzimáticas que pudieran interferir con las aplicaciones, por ejemplo libres de enzimas de degradación del almidón, de degradación de la celulosa o de degradación de la hemicelulosa. Esto se puede lograr seleccionando un huésped que no produzca normalmente tales enzimas.

La invención comprende procesos para la producción del polipéptido de la invención por medio de la expresión recombinante de una secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Para este fin, se puede utilizar la secuencia de ADN de la invención para la amplificación génica y/o el intercambio de señales de expresión, tales como promotores, secuencias señal de secreción, con el fin de permitir la producción económica del polipéptido en una célula hospedante homóloga o heteróloga adecuada. Una célula hospedante homóloga es una célula hospedante que es de la misma especie o que es una variante dentro de la misma especie que la especie de la cual deriva la secuencia de ADN.

Las células hospedantes adecuadas son preferiblemente microorganismos procariotas tales como bacterias, o más preferiblemente organismos eucariotas, por ejemplo hongos, tales como levaduras u hongos filamentosos, o células vegetales. En general, se prefieren células de levadura sobre las células fúngicas, porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas son secretadas pobremente a partir de las levaduras, o en algunos casos no se procesan adecuadamente (por ejemplo, hiperglicosilación en levadura). En estos casos, se debe seleccionar el organismo hospedante fúngico.

La célula hospedante puede sobreexpresar el polipéptido, y se conocen bien las técnicas para trabajar con ingeniería la sobreexpresión. El hospedante puede tener así dos o más copias del polinucleótido codificante (y en consecuencia, el vector puede tener así dos o más copias).

5 Por lo tanto, en una realización de la invención, la célula hospedante recombinante de acuerdo con la invención es capaz de expresar o sobreexpresar un polinucleótido o vector de acuerdo con la invención.

De acuerdo con la presente invención, se puede efectuar la producción del polipéptido de la invención mediante el cultivo de una célula hospedante de acuerdo con la invención, que se ha transformado con uno o más polinucleótidos de la presente invención, en un medio de fermentación de nutriente convencional.

10 Las células hospedantes recombinantes de acuerdo con la invención se pueden cultivar utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Para cada combinación de un promotor y una célula hospedante, están disponibles las condiciones de cultivo, las cuales conducen a la expresión de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido. Después de alcanzar la densidad celular deseada o la titulación del polipéptido, se detiene el cultivo y el polipéptido se recupera utilizando los procedimientos conocidos.

15 El medio de fermentación puede comprender un medio de cultivo conocido que contiene una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa, maltosa, molasas, etc.), una fuente de nitrógeno (por ejemplo, sulfato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de amonio, etc.), una fuente de nitrógeno orgánico (por ejemplo, extracto de levadura, extracto de malta, peptona, etc.) y fuentes de nutrientes inorgánicas (por ejemplo, fosfato, magnesio, potasio, zinc, hierro, etc.).

20 La selección del medio apropiado se puede basar en la elección del hospedante de expresión y/o puede estar basada en requisitos regulatorios del constructo de expresión. Tales medios se conocen por aquellos expertos en la técnica. El medio puede, si se desea, contener componentes adicionales que favorecen los hospedantes de expresión transformados sobre otros microorganismos potencialmente contaminantes.

25 La fermentación se puede desarrollar durante un periodo de 0,5-30 días. Éste puede ser un proceso discontinuo, continuo o de lote alimentado, adecuadamente a una temperatura en el intervalo de, por ejemplo, desde 0 a 45°C y/o a un pH, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 10. Las condiciones de fermentación preferidas están a una temperatura en el intervalo de aproximadamente 20 a aproximadamente 37°C y/o a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 9. Las condiciones apropiadas se seleccionan usualmente basándose en la elección del hospedante de expresión y la proteína que se va a producir.

30 Después de la fermentación, si es necesario, se pueden retirar las células del caldo de fermentación por medio de centrifugación o filtración. Después de que se ha detenido la fermentación, o después de la retirada de las células, el polipéptido de la invención se puede recuperar entonces y, si se desea, purificar y aislar por medios convencionales.

Uso de la enzima lipolítica en procesos industriales

35 La invención también se refiere al uso de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención en un número de procesos industriales. A pesar de la gran experiencia obtenida con estos procesos, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención caracteriza un número de ventajas significativas sobre las enzimas habitualmente utilizadas. Dependiendo de la aplicación específica, estas ventajas pueden incluir aspectos como menores costes de producción, mayor especificidad hacia el sustrato, menos actividades antigénicas, menos actividades colaterales indeseables, mayores rendimientos cuando se producen en un microorganismo adecuado, intervalos de pH y temperatura más adecuados, mejores sabores del producto final, así como también grado de alimento y aspectos kosher.

40 Preferiblemente, el polipéptido aislado de acuerdo con la invención que tiene actividad lipolítica se puede utilizar en la industria de alimentos, más preferiblemente en la elaboración de alimentos.

Aplicaciones lácteas

En una realización preferida, el polipéptido de acuerdo con la invención se puede utilizar en la industria láctea.

45 En una realización, el polipéptido de acuerdo con la invención se utiliza en la elaboración de un producto lácteo, preferiblemente queso, un producto similar a queso, EMC, o mezclas de ácido graso libre derivado de grasa de leche, preferiblemente para desarrollar y/o intensificar el sabor del producto lácteo.

En el contexto de la presente invención, un "producto lácteo" se refiere a cualquier clase de producto basado en leche, que incluye pero no se limita a queso, mantequilla, EMC, nata, análogo lácteo, etc. De interés particular en el presente contexto son los productos que contienen grasa de la leche y sus equivalentes, que incluyen quesos normales, análogos de queso, quesos procesados, mantequilla, untables, margarinas, EMC, etc.

50 En una realización preferida, el producto lácteo es un queso. El queso se puede obtener de cualquier variedad, por ejemplo quesos duros tales como Chester, Danbo, Manchego, Saint Paulin, Cheddar, Monterey, Colby, Edam, Gouda, Muenster, tipo Suizo, Gruyer, Emmenthaler, Parmesano, Pecorino, Provolone, y Romano; cuajada tal como Feta, quesos pasta filata tales como Mozzarella; queso procesado; queso de moho blanco tales como Brie y Camembert; o quesos de moho azul tales como Gorgonzola y queso azul danés, o queso fresco tal como, por

ejemplo, Ricotta, queso crema, Neufchatel o queso Cottage. Los tipos preferidos de quesos en este contexto son Parmesano, Pecorin, Provolone, Romano, Feta.

5 La expresión “análogos lácteos” se refiere a productos similares a los lácteos que contienen grasas (tales como por ejemplo grasa de leche, por ejemplo nata) como parte de la composición, y que contienen además, como parte de la composición, un constituyente no lácteo, tales como por ejemplo aceite vegetal.

La presente invención también se refiere a un método para preparar un producto lácteo en el que se añade un polipéptido aislado de acuerdo con la invención a una composición láctea utilizada en la producción de un producto lácteo.

10 En el contexto de la presente invención, una composición láctea puede ser una composición que comprende leche y/o uno o más componentes de leche y/o fracciones de leche que es la composición de partida en la producción del producto lácteo de acuerdo con la invención, o puede ser un producto intermedio en la producción del producto lácteo (por ejemplo, cuajada o suero). La composición láctea es un sustrato adecuado para la enzima lipolítica, y por lo tanto la composición láctea comprenderá al menos grasa de leche y/u otra grasa, por ejemplo grasa derivada de vegetales. Las enzimas lipolíticas de acuerdo con la invención son capaces de catalizar la hidrólisis de enlaces éster en glicéridos presentes en la composición láctea, y por lo tanto tienen actividad de lipasa. Los glicéridos son ésteres de glicerol con ácidos grasos. Los triglicéridos (también conocidos como triacilglicerol o triacilglicéridos) están principalmente presentes en aceites vegetales y en grasas animales. Las lipasas (EC 3.1.1.3) se definen aquí como enzimas que hidrolizan uno o más ácidos grasos de los lípidos, más específicamente hidrolizan los enlaces éster entre el ácido graso y los grupos hidroxilo del glicerol.

20 Un componente lácteo puede ser cualquier constituyente de leche, tal como grasa de la leche, proteína de leche, caseína, proteína de suero, lactosa. Una fracción de leche puede ser cualquier fracción de leche tal como por ejemplo leche desnatada, leche de mantequilla, suero, nata, mantequilla, leche tratada mediante ultrafiltración, leche en polvo, polvo de leche entera, polvo de leche de mantequilla, o polvo de leche desnatada. En el presente contexto, la leche puede ser la secreción láctea de cualquier mamífero. Así, la leche se puede obtener al ordeñar, por ejemplo, 25 una vaca, oveja, cabra, búfalo o camello.

El producto lácteo producido con el método de este aspecto de la invención se puede producir con cualquier proceso adecuado conocido en la técnica, y la enzima lipolítica se añadirá a la composición láctea en cualquier etapa adecuada durante la producción del producto lácteo bajo condiciones adecuadas de, por ejemplo, concentración de enzima, temperatura y tiempo suficiente para que la enzima exhiba su actividad lipolítica.

30 En una realización, el método de acuerdo con la invención es un método para la producción de queso. En este caso, el método comprenderá una etapa en la cual la cuajada se forma mediante la coagulación enzimática de una composición láctea con cuajo, o mediante la coagulación ácida con un ácido de grado alimento o un ácido producido al crecer bacterias de ácido láctico y se separa posteriormente del suero. Dependiendo del tipo de queso que se va a producir, la producción de queso puede comprender adicionalmente procesar la cuajada y envejecer el queso resultante. El método para producir queso de acuerdo con este aspecto de la invención incluirá preferiblemente envejecer el queso resultante. La enzima lipolítica se puede añadir a una composición láctea en varias etapas de la preparación del queso. Preferiblemente, la enzima se añade a la leche antes o junto con la adición de un coagulante (por ejemplo, quimosina). La adición en este punto asegura una distribución homogénea de la enzima en todo el queso. Alternativamente, la enzima se puede añadir en una etapa posterior, por ejemplo, a la cuajada, pero esto introduce el riesgo de deshomogenizar la distribución de enzima en el queso. Por esa razón, se prefiere la adición de las enzimas a la leche.

45 En otra realización, el método para producir un producto lácteo de acuerdo con la presente invención es la elaboración de mezclas de ácidos grasos libres de derivados grasos de la leche que se obtiene mediante lipólisis de la grasa de la leche (por ejemplo, grasa de mantequilla o nata) para producir una mezcla de ácidos grasos libres que se puede utilizar por ejemplo como saborizante, por ejemplo en sabor de queso azul. Estas mezclas de ácidos grasos libres se pueden utilizar como ingredientes del sabor en la producción de otros productos, por ejemplo untables, sopas, aderezos, aperitivos, chips, nachos, etc.). Otras aplicaciones de lipasa incluyen el uso en polvo de leche modificada (Kilara en Encyclopedia of Dairy Sciences, (2003; Fox et al. eds, Academic Press) p. 914-918.

50 En aún otra realización, el método para producir un producto lácteo de acuerdo con la presente invención es un método para producir EMC. En este caso, el método se puede desarrollar típicamente utilizando condiciones conocidas por aquellos expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Cap. 2.12 en Industrial Enzymology, 2ª Ed., Godfrey, West, Eds, MacMillan Press, Londres, 1996; Wikinson et al en Encyclopedia of Dairy Sciences, (2003; Fox et al. eds, Academic Press) p. 434-438).

55 La cantidad de enzima que se añade en cualquiera de los procesos anteriormente mencionados dependerá de la actividad de la enzima y del efecto del sabor deseado en el producto final. La cantidad que se va a utilizar en una aplicación se puede determinar por aquellos expertos en la técnica al utilizar una curva de respuesta frente a la dosis. En este enfoque, se añaden cantidades crecientes de enzima a la composición láctea y posteriormente se analiza la intensidad del perfil de sabor en el producto final mediante un panel de sabor entrenado.

En una realización preferida del uso de acuerdo con la invención o del método para producir un producto lácteo de acuerdo con la invención, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención se utiliza para el desarrollo y/o la intensificación del sabor. El desarrollo del sabor en la producción de un producto lácteo se debe, entre otros, a la acción de las enzimas, producidas por microorganismos utilizados durante la producción del producto lácteo, o añadidos específicamente durante la elaboración, más específicamente a la acción de las enzimas lipolíticas y proteolíticas.

Las enzimas lipolíticas son responsables de la lipólisis de la grasa de la leche presente en el producto lácteo y la consecuente liberación en el producto de mezclas de ácidos grasos libres (posteriormente indicadas como FFA). La composición de la mezcla de ácidos grasos libres es responsable parcialmente del el sabor final del producto lácteo. Partiendo de un sustrato que contiene grasa de leche, una enzima lipolítica producirá una mezcla de FFA específica de ácidos grasos libres que contienen C4 a C18, en donde la cantidad relativa de cada componente en la mezcla dependerá de la especificidad de la enzima hacia la hidrólisis de los enlaces de éster de triglicérido específicos que implican los ácidos grasos que contienen C4 a C18 presentes en el triglicérido. Por ejemplo, una enzima lipolítica que tiene alta especificidad por los ácidos grasos que contienen C4 hidrolizará preferiblemente los enlaces de ésteres de triglicérido del resto de triglicerilo con un ácido graso que contiene C4 en lugar de con ácidos grasos que contienen C6 a C18, y el contenido relativo del ácido graso libre que contiene C4 en la mezcla será mayor si se compara con el contenido relativo de los ácidos grasos libres que contienen C6 a C18. Adicionalmente, la cantidad relativa de cada componente en la mezcla también dependerá del sustrato de partida y de la composición de los triglicéridos allí presentes. Debido a que cada ácido graso es responsable de impartir a un producto características de sabor específicas, cuando se somete un sustrato que contiene grasa de la leche específica a la acción de la enzima lipolítica bajo condiciones de concentración enzimática, temperatura y tiempo suficiente para que la enzima reaccione, se produce una mezcla de FFA específica que da origen a un perfil de sabor específico en el sustrato. La especificidad de varias enzimas lipolíticas frente a la liberación de los ácidos grasos libres y por lo tanto también el perfil de sabor generado se puede comparar entre sí mediante la determinación de un perfil de FFA para cada una de las enzimas que utilizan el mismo sustrato. Un perfil de FFA da la cantidad relativa de cada uno de los ácidos grasos libres que contienen C4 a C18 con respecto a la cantidad total del ácido graso libre liberado por la acción de la enzima lipolítica sobre el sustrato. El perfil de FFA dependerá generalmente del sustrato de partida, de la especificidad de la enzima lipolítica hacia los sustituyentes de ácido graso en la composición de lípido.

El grado de conversión de grasa (D) se calcula como sigue (expresado en %):

$$D = \frac{[(\text{cantidad total de FFA en la composición que se ha tratado con la enzima lipolítica}) - (\text{cantidad total de FFA en la composición no tratada})]}{(\text{ácidos grasos totales presentes en la composición})}$$

La cantidad total de FFA y la cantidad total de ácido graso se expresan en mol/kg de sustrato.

Un método adecuado para determinar el perfil de FFA partiendo de un sustrato se describe en los Ejemplos.

La enzima lipolítica de acuerdo con la invención tiene preferiblemente una especificidad mayor hacia la liberación de ácidos grasos libres de cadena corta, es decir, ácidos grasos libres que contienen C4 a C10, preferiblemente ácidos grasos libres que contienen C4, si se compara con los ácidos grasos libres de cadena más larga, es decir, ácidos grasos libres que contienen C12 a C18. En una realización preferida, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención tiene un grado de especificidad hacia los ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 si se compara con los ácidos grasos libres que contienen C12 a C18 que se expresan mediante la Relación de Especificidad (R_{espec}) que es al menos 0,7, preferiblemente al menos 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,5, 1,7, 2, 2,5, 3. En general, la R_{espec} será tan alta como sea posiblemente logable.

R_{espec} se puede calcular como sigue:

$$R_{\text{espec}} = \frac{\Sigma \text{ contenido de C4-C10 relativo}}{\Sigma \text{ contenido de C12-C18 relativo}}$$

en la que “ Σ contenido de C4-C10 relativo” es la suma del contenido relativo de los ácidos grasos libres que contienen C4, que contienen C6, que contienen C8 y que contienen C10 presentes en la composición que se ha tratado con la enzima lipolítica, y en la que el “ Σ contenido de C12-C18 relativo” es la suma del contenido relativo de los ácidos grasos libres que contienen C12, que contienen C14, que contienen C16 y que contienen C18 presentes en la composición que se ha tratado con la enzima lipolítica.

El “contenido de Cx relativo”, en el que X puede ser cualquiera de 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, corresponde al porcentaje (%) de la cantidad de ácido graso libre que contiene Cx en la composición que se ha tratado con la enzima lipolítica con respecto a la cantidad total de los ácidos grasos libres presentes en la composición que se ha tratado con la enzima lipolítica. La cantidad de FFA (o de ácido graso libre) en la fórmula anteriormente mencionada se expresa en mol/kg.

El R_{espec} se determina en una composición láctea hecha utilizando queso joven (preferiblemente queso Cheddar o Gouda, preferiblemente un queso joven con un tiempo de maduración de menos de 2 semanas) y en el que la enzima lipolítica se incubaba bajo condiciones (tales como dosis, tiempo de incubación y temperatura de incubación)

que conducen a un grado de conversión de grasa en la muestra incubada comprendida entre 5% - 25%, en el que el grado de conversión de grasa se calcula como se indicó anteriormente.

5 En una realización preferida del uso de cualquier péptido aislado de acuerdo con la invención o del método para producir el producto lácteo de acuerdo con la invención, el Σ contenido de C4-C10 relativo / Σ contenido de C12-C18 relativo es al menos 0,7, preferiblemente al menos 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,5, 1,7, 2, 2,5, 3. En, por ejemplo, el queso Parmesano tratado con la esterasa pregástrica de rumiante, esta relación es aproximadamente 1,7 (calculada a partir de los datos D.T. Lai, A.D. Mackenzie, C.J. O'Connor, K.W. Turner J. Dairy Sci. 80:2249-2257 (1997), página 2255). El "contenido de C4-C10 relativo" y el " Σ C12-C18 relativo" tienen el mismo significado que anteriormente.

10 En la técnica se conoce que cuando la enzima lipolítica que actúa sobre un sustrato que contiene grasa de la leche principalmente libera ácidos grasos de cadena corta (por ejemplo, ácidos grasos que contienen C4 y C6), esto conduce al desarrollo de un sabor picante, agudo, de especies, fuertes, mientras que, por ejemplo, la liberación de ácido graso de cadena media puede conducir a un sabor jabonoso.

15 Por lo tanto, en una realización preferida del uso de la invención o del método para producir un producto lácteo de acuerdo con la invención, las notas agudas, fuertes, de especies en el perfil de sabor del producto lácteo se incrementan, preferiblemente las notas jabonosas en el perfil de sabor del producto lácteo disminuyen.

Los ejemplos de productos lácteos adecuados son aquellos mencionados en los aspectos previos de la invención.

Aplicaciones de panadería

Otro ejemplo de una aplicación industrial de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención en alimento es su uso en aplicaciones de panadería para mejorar la calidad de la masa y/o del producto horneado.

20 Se ha encontrado de manera sorprendente que las enzimas lipolíticas de acuerdo con la invención pueden actuar bajo varios tipos de lípidos, que varían desde glicéridos (por ejemplo, triglicéridos), fosfolípidos, o glucolípidos, tales como galatolípidos, en aplicaciones de panadería.

Más específicamente, las enzimas lipolíticas de acuerdo con la invención muestran al menos una de las siguientes propiedades in situ cuando se utilizan en masa:

- 25
- una actividad relativamente baja hacia lípidos apolares.
 - una actividad relativamente alta hacia diacil-lípidos polares, al menos hacia diacil-galactolípidos.
 - una actividad relativamente baja hacia los compuestos monoacílicos polares, tales como lisogalactolípidos y lisofosfolípidos.

30 Estas propiedades no esperadas se encuentran todas extremadamente ventajosas cuando se utilizan como un sustituto de emulsionantes químicos en la masa.

Los glicéridos y las lipasas se han definido anteriormente.

35 Los glucolípidos (por ejemplo, galactolípidos) consisten en una cadena principal de glicerol con dos ácidos grasos esterificados en una posición exterior (sn-1) y media (sn-2), mientras que el tercer grupo hidroxilo está unido a restos de azúcar tales como, en el caso de los galactolípidos, una galactosa, por ejemplo monogalacosildiglicérido o dígalacosildiglicérido. La galactolipasa (EC 3.1.1.26) cataliza la hidrólisis de uno o ambos grupos acilo grasos en las posiciones sn-1 y sn-2 respectivamente de un galactosildiglicérido.

40 Los fosfolípidos consisten en una cadena principal de glicerol con dos ácidos grasos esterificados en una posición externa (sn-1) y media (sn-2), mientras que el tercer grupo hidroxilo del glicerol se esterifica con ácido fosfórico. El ácido fosfórico puede, a su vez, esterificarse a por ejemplo un aminoalcohol como etanolamina (fosfatidiletanolamina), colina (fosfatidicolina). Las fosfolipasas se definen aquí como enzimas que participan en la hidrólisis de uno o más enlaces en los fosfolípidos.

Se pueden distinguir varios tipos de actividad fosfolipasa que hidrolizan los enlaces éster que enlazan los restos acilo grasos a la cadena principal del glicerol:

45

- La Fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32) y A2 (EC 3.1.1.4) catalizan la desacilación de un grupo acilo graso en las posiciones sn-1 y sn-2 respectivamente, a partir de un diacilglicerofosfolípido para producir un lisofosfolípido. Esta es una actividad deseable para sustitución del emulsionante.

50

- La Lisofosfolipasa (EC 3.1.1.5 - también denominada fosfolipasa B por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (Enzyme Nomenclature, Academic Press, Nueva York, 1992)) cataliza la hidrólisis del grupo acilo graso restante en un lisofosfolípido. Se ha dado a conocer una fosfolipasa B de *Penicillium notatum* (Saito et al., 1991, Methods in Enzymology 197:446-456) que cataliza la desacilación de ambos ácidos grasos provenientes de un diacilglicerofosfolípido, y posee intrínsecamente actividad de lisofosfolipasa. Para

la sustitución del emulsionante, la actividad de lisofosfolipasa es menos deseable, en razón a que ésta daría como resultado la supresión de la combinación de una cabeza polar y una cola apolar, deshabilitando el producto resultante para influir en las propiedades de superficie. De manera sorprendente, se ha mostrado que la enzima lipolítica de acuerdo con la invención muestra relativamente baja actividad de lisofosfolipasa en la masa.

5 La harina de trigo contiene aproximadamente 2.2-2.9% de lípidos. Los lípidos de harina se pueden dividir en lípidos de almidón (0.8 – 0,9%) y lípidos no de almidón (1,4 – 2,0%). Mientras que los lípidos de almidón consisten principalmente en lisofosfolípidos polares, los lípidos no de almidón consisten en aproximadamente 40% de triglicéridos neutros y 40% de fosfo- y glucolípidos polares. Para la optimización de la fracción de lípidos de harina, la lipasa de acuerdo con la invención es capaz de hidrolizar los lípidos polares, que son los fosfolípidos y los
10 glucolípidos más específicamente los galactolípidos *in situ* en la masa al añadir la lipasa de acuerdo con la invención.

Las enzimas de panadería se pueden utilizar en multiplicidad de productos horneados. La expresión “productos horneados” se define aquí como los productos de pan tales como pan delgado, mendrugos de pan, pan francés, así como también rollos, productos de masa laminada tales como pasta danesa, cruasán o productos de pasta de nata,
15 tortas, pudines, bollitos, levadura elevada y donas de horno y similares.

La enzima lipolítica de acuerdo con la invención se puede utilizar, por ejemplo, en productos horneados. Los productos horneados tales como el pan se preparan a partir de una masa. Por lo tanto, en una realización de la invención, se proporciona el uso de un polipéptido aislado de acuerdo con la invención en la preparación de una masa y proporciona una masa que comprende el polipéptido de acuerdo con la invención. La invención también
20 proporciona la preparación de una masa que comprende las etapas de añadir el polipéptido de acuerdo con la invención a al menos uno de los ingredientes de la masa. La masa se obtiene habitualmente de los ingredientes básicos harina (trigo), agua y opcionalmente sal. Dependiendo de los productos horneados, se pueden añadir otros ingredientes como azúcares, sabores, etc. Para los productos con levadura, se utiliza principalmente levadura de panadería, próxima a los sistemas de fermentado químico tales como una combinación de un ácido (compuesto generador) y bicarbonato.
25

Se añaden generalmente levadura, enzimas y aditivos químicos de manera separada a la masa.

Las enzimas se pueden añadir en una forma seca, por ejemplo, forma granulada o en forma líquida. Los aditivos químicos se añaden en la mayoría de los casos en forma de polvo. También, las composiciones de auxiliares de procesamiento que se adecuan a aplicaciones de horneado específicas, se pueden componer de una mezcla dedicada de aditivos químicos y enzima.
30

La preparación de una masa proveniente de los ingredientes y los auxiliares del procesamiento descritos anteriormente se conocen bien en la técnica, y comprende mezclar dichos ingredientes y procesar los auxiliares y una o más etapas de moldeo y fermentación.

La preparación de productos horneados provenientes de tales masas también es bien conocida en la técnica, y puede comprender moldear y conformar y además la fermentación de la masa, seguido del horneado a las temperaturas requeridas y a los tiempos de horneado. En una realización, la invención proporciona el método para preparar un producto horneado, que comprende la etapa de hornear la masa de acuerdo con la invención. La invención también proporciona un producto horneado obtenible de acuerdo con este método. Preferiblemente, el producto horneado de acuerdo con la invención es pan.
35

La presente invención también se refiere a métodos para preparar una masa o un producto horneado, que comprende incorporar en la masa una cantidad eficaz de una enzima lipolítica de la presente invención que mejora una o más propiedades de la masa o del producto horneado obtenido de la masa con relación a una masa o un producto horneado en el cual no se incorpora el polipéptido.
40

La frase “que se incorpora en la masa” se define aquí como añadir la enzima lipolítica de acuerdo con la invención en la masa, cualquier ingrediente del cual se obtiene la masa, y/o cualquier mezcla de los ingredientes de la masa de los cuales se obtiene la masa. En otras palabras, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención se puede añadir en cualquier etapa de la preparación de la masa, y se puede añadir en una, dos o más etapas. La enzima lipolítica de acuerdo con la invención se añade a los ingredientes de una masa que se amasa y hornea para obtener el producto horneado utilizando los métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de U.S. nº
4.567.046, EP-A-426,211, JP-A-60-78529, JP-A-62-111629, y JP-A-63-258528.
50

La expresión “cantidad eficaz” se define aquí como una cantidad de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención que es suficiente para proporcionar un efecto que se puede medir sobre al menos una propiedad de interés de la masa y/o el producto horneado.

La expresión “propiedad mejorada” se define aquí como cualquier propiedad de una masa y/o un producto obtenido de la masa, en particular un producto horneado, que se mejora mediante la acción de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención con relación a una masa o un producto en el cual no se incorpora la enzima lipolítica de acuerdo con la invención. La propiedad mejorada puede incluir, pero no se limita a, resistencia creciente de la masa,
55

- 5 elasticidad creciente de la masa, estabilidad creciente de la masa, pegajosidad reducida de la masa, extensibilidad mejorada de la masa, maquinabilidad mejorada de la masa, volumen incrementado del producto horneado, sabor mejorado del producto horneado, estructura de miga mejorada del producto horneado, suavidad de miga mejorada del producto horneado, formación reducida de ampollas del producto horneado y/o anti-añejamiento mejorado del producto horneado.
- 10 La propiedad mejorada se puede determinar mediante comparación de una masa y/o un producto horneado preparado con y sin la adición de un polipéptido de la presente invención de acuerdo con los métodos de la presente invención que se describen adelante en los Ejemplos. Las cualidades organolépticas se pueden evaluar utilizando procedimientos bien establecidos en la industria de horneados, y pueden incluir, por ejemplo, el uso de un panel de probadores de sabor entrenado.
- La expresión “resistencia creciente de la masa” se define aquí como la propiedad de una masa que tiene generalmente propiedades más elásticas y/o requiere más trabajo para moldear y conformar.
- La expresión “elasticidad creciente de la masa” se define aquí como la propiedad de la masa que tiene una mayor tendencia a volver a ganar su forma original después de someterse a cierto esfuerzo físico.
- 15 La expresión “estabilidad creciente de la masa” se define aquí como la propiedad de una masa que es menos susceptible al abuso mecánico y así a mantener mejor su forma y volumen, y se evalúa mediante la relación de altura: anchura de una sección transversal de un mendrugo después de una prueba normal y/o extendida.
- 20 La expresión “pegajosidad reducida de la masa” se define aquí como la propiedad de la masa que tiene menos tendencia a adherirse a las superficies, por ejemplo en la maquinaria de producción de la masa, y se evalúa empíricamente por el panadero probador experto, o se mide mediante el uso de un analizador de texturas (por ejemplo, TAXT2) como se conoce en la técnica.
- La expresión “extensibilidad mejorada de la masa” se define aquí como la propiedad de la masa que se puede someter a una resistencia creciente o un estiramiento sin ruptura.
- 25 La expresión “maquinabilidad mejorada de la masa” se define aquí como la propiedad de la masa que es generalmente menos pegajosa y/o más firme y/o más elástica.
- La expresión “volumen creciente del producto horneado” se mide como el volumen de un mendrugo de pan dado determinado por un analizador de volumen de pan automático (por ejemplo BVM-3, TexVol Instruments AB, Viken, Suecia), que utiliza detección mediante ultrasonidos o láser como se conoce en la técnica.
- 30 La expresión “formación reducida de ampollas del producto horneado” se define aquí como una reducción visualmente determinada de las ampollas sobre la corteza del pan horneado.
- La expresión “estructura de miga mejorada del producto horneado” se define aquí como la propiedad del producto horneado con celdas más finas y/o paredes de celdas más delgadas en la miga y/o distribución más uniforme/homogénea de las celdas en la miga, y se evalúa habitualmente de manera visual por el panadero o mediante el análisis de la imagen digital como se conoce en la técnica (por ejemplo, celda C, Calibre Control International Ltd, Appleton, Warrington, UK).
- 35 La expresión “suavidad mejorada del producto horneado” es el opuesto de “firmeza”, y se define aquí como la propiedad de un producto horneado que se comprime más fácilmente y se evalúa empíricamente por el panadero probador experto, o se mide mediante el uso de un analizador de texturas (por ejemplo, TAXT2) como se conoce en la técnica.
- 40 La expresión “sabor mejorado del producto horneado” se evalúa mediante un panel de prueba entrenado.
- La expresión “anti-añejamiento mejorado del producto horneado” se define aquí como las propiedades de un producto horneado que tienen una velocidad reducida de deterioro de los parámetros de calidad, por ejemplo suavidad y/o elasticidad, durante el almacenamiento.
- 45 La expresión “cualidad crujiente mejorada” se define aquí como la propiedad de un producto horneado para dar una sensación más crujiente que un producto de referencia conocido en la técnica, así como para mantener esta percepción más crujiente durante un tiempo mayor que un producto de referencia. Esta propiedad se puede cuantificar midiendo una curva de fuerza frente a distancia a una velocidad fija en un experimento de compresión que utiliza por ejemplo un analizador de texturas TA-XT Plus (Stable Micro Systems Ltd, Surrey, UK), y obteniendo los parámetros físicos de esta curva de compresión, a saber (i) la fuerza del primer pico, (ii) la distancia del primer pico, (iii) la pendiente inicial, (iv) la fuerza del pico más alto, (v) el área bajo la gráfica y (vi) la cantidad de eventos de fractura (la fuerza cae más que un cierto valor preestablecido). Las indicaciones de una cualidad crujiente mejorada son una mayor fuerza del primer pico, una distancia más corta del primer pico, una mayor pendiente inicial, una mayor fuerza del pico más alto, un área mayor bajo la curva y un número mayor de eventos de fractura. Un producto más crujiente debe calificarse estadísticamente de manera significativa mejor en al menos dos de estos parámetros
- 50

comparados con un producto de referencia. En la técnica, la “calidad crujiente” también se refiere como tostamiento, crujimiento o enmascaramiento, que significa un material con un comportamiento de fractura, crujiente, tostado o enmascarado.

5 La presente invención proporciona una masa de acuerdo con la invención que tiene al menos una de las propiedades mejoradas seleccionadas del grupo que consiste en una resistencia creciente, elasticidad creciente, estabilidad creciente, pegajosidad reducida, y/o extensibilidad mejorada de la masa.

10 La invención también proporciona un producto horneado de acuerdo con la invención que tiene un volumen de mendrugo creciente. La invención proporciona también un producto horneado de acuerdo con la invención que tiene al menos una propiedad mejorada seleccionada del grupo que consiste en un volumen creciente, sabor mejorado, estructura de miga mejorada, suavidad de miga mejorada, crujimiento mejorado, formación mejorada de ampollas y/o anti-añejamiento mejorado.

El término “masa” se define aquí como una mezcla de harina y otros ingredientes suficientemente firmes para amasar o enrollar. La masa puede estar fresca, congelada, preparada, o pre-horneada. La preparación de masa congelada se describe por Kulp y Lorenz en Frozen and Refrigerated Doughs and Batters.

15 La expresión “producto horneado” se define aquí como cualquier producto preparado a partir de una masa, de carácter suave o crujiente. Los ejemplos de productos horneados, sean de tipo blanco, claro u oscuro, que se pueden producir ventajosamente por medio de la presente invención son el pan (en particular blanco, harina completa o pan de centeno), típicamente en forma de mendrugos o rollos, pan francés tipo baguette, pastelería, cruasán, pasta, tallarines (hervidos o (agitado-)frito), pan de pita, tortillas, tacos, tartas, panqués, bizcochos, galletas, donas, roscas, cubiertas de tartas, pan horneado, y pan tostado, y similares.

20 Las enzimas lipolíticas de la presente invención y/o las enzimas adicionales que se van a utilizar en los métodos de la presente invención pueden estar en cualquier forma adecuada para el uso en cuestión, por ejemplo en forma de un polvo seco, polvo aglomerado, o granulado, en particular un granulado no formador de polvo, un líquido, en particular un líquido estabilizado, o una enzima protegida tal como se describe en los documentos WO01/11974 y WO02/26044. Los polvos granulados y aglomerados se pueden preparar por métodos convencionales, por ejemplo pulverizando la enzima lipolítica de acuerdo con la invención sobre un vehículo en un granulador de lecho fluido. El vehículo puede consistir en núcleos de partículas que tienen un tamaño de partículas adecuado. El vehículo puede ser soluble o insoluble, por ejemplo una sal (tal como NaCl o sulfato de sodio), azúcar (tal como sacarosa o lactosa), alcohol de azúcar (tal como sorbitol), almidón, harina de arroz, harina de trigo, sémola de maíz, maltodextrinas, soya. La enzima lipolítica de acuerdo con la invención y/o las enzimas adicionales pueden estar contenidas en formulaciones de liberación lenta. Los métodos para preparar formulaciones de liberación lenta se conocen bien en la técnica. La adición de estabilizantes nutricionalmente aceptables, tales como azúcar, alcohol de azúcar, u otro poliol, y/o ácido láctico u otro ácido orgánico de acuerdo con los métodos establecidos, puede, por ejemplo, estabilizar preparaciones enzimáticas líquidas.

35 La enzima lipolítica de acuerdo con la invención también se incorpora en composiciones que comprenden levadura, tales como las descritas en los documentos EP-A-0619947, EP-A-0659344 y WO02/4 9441.

Para la inclusión en pre-mezclas de harina es ventajoso que el polipéptido de acuerdo con la invención esté en forma de un producto seco, por ejemplo, un granulado no formador de polvo, mientras que para la inclusión junto con un líquido es ventajoso en una forma líquida.

40 También se pueden incorporar una o más enzimas adicionales en la masa. Por lo tanto, la invención proporciona una composición enzimática para horneado que comprende la enzima lipolítica de acuerdo con la invención y una o más enzimas adicionales. La enzima adicional puede ser de cualquier origen, incluyendo mamífero y vegetal, y preferiblemente de origen microbiano (bacteriana, levadura u hongo), y se puede obtener mediante técnicas convencionalmente utilizadas en la técnica.

45 En una realización preferida, la enzima adicional puede ser una amilasa, tal como una alfa-amilasa (útil para proporcionar los azúcares fermentables mediante levadura y un añejamiento retardado), beta-amilasa, amilasa maltogénica o amilasa no maltogénica, una ciclodextrina glucanotrasferasa, una proteasa, una peptidasa, en particular una exopeptidasa (útil en el mejoramiento del sabor), transglutaminasa, lipasa (útil para la modificación de los lípidos presentes en la masa o los constituyentes de la masa con el fin de suavizar la masa), galactolipasa, fosfolipasa, celulasa, hemicelulasa, en particular una pentosanasa tal como xilanasa (útil para la hidrólisis parcial de pentosanos, más específicamente arabinoxilano, que incrementa la extensibilidad de la masa), proteasa (útil para el debilitamiento del gluten, en particular cuando se utiliza harina de trigo dura), disulfuro isomerasa de proteína, por ejemplo una disulfuro isomerasa de proteína como se describe en el documento WO 95/00636, glucosiltransferasa, peroxidasa (útil para mejorar la consistencia de la masa), lacasa, u oxidasa, hexosa oxidada, por ejemplo una glucosa oxidada, aldosa oxidada, piranosa oxidada, lipoxigenasa u L-aminoácido oxidada (útil para mejorar la consistencia de la masa).

55 Cuando se añaden una o más actividades enzimáticas adicionales de acuerdo con los métodos de la presente invención, estas actividades se pueden añadir separadamente o junto con un polipéptido de acuerdo con la

invención, opcionalmente como constituyentes de la composición mejoradora del pan y/o mejoradora de la masa. Las otras actividades enzimáticas pueden ser cualquiera de las enzimas descritas anteriormente, y se pueden dosificar de acuerdo con las prácticas de horneado establecidas.

5 La presente invención también se refiere a método para preparar un producto horneado, que comprende hornear una masa obtenida mediante un método de la presente invención para producir un producto horneado. El horneado de la masa para producir un producto horneado se puede realizar utilizando los métodos bien conocidos en la técnica. En una realización de la invención, las enzimas lipolíticas de la invención se utilizan para preparar masas laminadas para productos horneados con crujimiento mejorado.

10 La presente invención también se refiere a masas y productos horneados, respectivamente, producidos por lo métodos de la presente invención.

15 La presente invención se refiere además a una premezcla, por ejemplo en forma de una composición de harina, para masa y/o productos horneados hechos de masa, en los cuales la pre-mezcla comprende un polipéptido de la presente invención. El término "pre-mezcla" se define aquí entendiéndose en su significado convencional, es decir, como una mezcla de agentes de horneado, que incluye generalmente harina, que se puede utilizar no solamente en plantas/instalaciones industriales de horneado de pan, sino también en panaderías de venta al por menor. La pre-mezcla se puede preparar mezclando el polipéptido o una composición mejoradora de pan y/o mejoradora de masa de la invención, que comprende el polipéptido, con un vehículo adecuado tal como harina, almidón, un azúcar, o una sal. La pre-mezcla puede contener otros aditivos que mejoran la masa y/o que mejoran el pan, por ejemplo cualquiera de los aditivos, incluyendo enzimas, mencionados anteriormente.

20 La presente invención se refiere además a aditivos de horneado en forma de un polvo granulado o aglomerado, que comprende un polipéptido de la presente invención. El aditivo de horneado tiene preferiblemente una distribución estrecha de tamaños de partículas, con más del 95% (en peso) de las partículas en el intervalo de 25 a 500 μm .

25 En la elaboración de la masa y el pan, la presente invención se puede utilizar en combinación con los auxiliares del procesamiento definidos anteriormente, tal como los auxiliares químicos del procesamiento como oxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico), agentes reductores (por ejemplo, L-cisteína), y/o emulsionantes (por ejemplo, DATEM, SSL y/o CSL), y/o cualquiera de los precursores de emulsionantes que pueden ser un sustrato para la enzima lipolítica de la invención y/o auxiliares enzimáticos del procesamiento tales como oxidorreductasas (por ejemplo, glucosa oxidasa), enzimas modificadoras de polisacáridos (por ejemplo, α -amilasa, hemicelulosa, enzimas de ramificación, etc.) y/o enzimas modificadoras de proteína (endoproteasa, exoproteasa, enzimas ramificadoras, etc.).

30 En una realización de la invención, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención se puede utilizar para sustituir completa o parcialmente el emulsionante de masa DATEM.

35 En otra realización, la invención proporciona una composición de horneado que comprende una enzima lipolítica de acuerdo con la invención y DATEM. DATEM es un acrónimo para ésteres de ácido diacetiltartárico con mono- y diglicéridos. Uno de los principales componentes en DATEM puede ser el 1-estearoil-3-diacetiltartril-glicerol. En una realización preferida, la composición de horneado comprende DATEM y una enzima lipolítica de acuerdo con la invención seleccionada de L01, L02, L03 y L04. Preferiblemente, la enzima lipolítica es L01 o L02. Se ha encontrado de manera sorprendente que una composición de horneado que comprende una enzima lipolítica de acuerdo con la invención y el DATEM tiene un efecto sinérgico sobre la masa obtenida utilizando dicha composición y/o el producto horneado obtenible al hornear dicha masa. El efecto sinérgico se puede medir al obtener masas o productos horneados con la adición de DATEM o la enzima lipolítica de acuerdo con la invención de manera separada y como una combinación. Se pueden comparar los efectos producidos sobre al menos una propiedad de la masa o de los productos horneados al utilizar la composición de horneado de una parte y por otra parte DATEM solo o la enzima lipolítica sola, utilizados cada uno a una doble dosis. Se encuentra sinergia cuando el efecto de la combinación es mejor de tanto el efecto producido por el DATEM solo en una dosis doble como la enzima lipolítica sola en una dosis doble. La sinergia se puede mostrar por ejemplo mediante la estabilidad mejorada de la masa, crecimiento en horno mejorado, estructura de migaja mejorada, color de migaja mejorado, volumen mejorado del producto horneado. Como un ejemplo, existe un efecto sinérgico por ejemplo cuando la estabilidad de una masa obtenida utilizando una composición que comprende 0,15% p/p (con base en harina) del DATEM y 0,12 ppm de enzima lipolítica (es decir, 0,12 mg de proteína Bradford de enzima lipolítica por kg de harina) es mejor que la estabilidad de una masa obtenida utilizando 0,3% p/p de DATEM solo y es mejor que la estabilidad de una masa obtenida utilizando 0,24 ppm de enzima lipolítica sola.

45 La persona experta puede determinar fácilmente las cantidades de enzima lipolítica adecuada y DATEM que se van a utilizar en la composición de horneado de acuerdo con la invención. Las cantidades óptimas del DATEM o de la enzima lipolítica respectivamente se pueden determinar primero, por lo que una o más propiedades de la masa o del producto horneado producido con dicha masa mejoran si se comparan con las propiedades de las masas o los productos horneados obtenidos al no añadir DATEM ni enzima lipolítica. Posteriormente, se puede utilizar en la composición 30% a 50% p/p de la cantidad óptima de cada producto, y la persona experta puede verificar mediante experimentación de rutina en qué relación de DATEM y de enzima lipolítica se observa el efecto sinérgico en la composición.

En otra realización preferida de la invención, la composición de horneado que comprende DATEM y la enzima lipolítica de acuerdo con la invención se utiliza en un método para producir una masa o un producto horneado de la invención.

5 La composición de horneado de acuerdo con la invención puede comprender cerca de una enzima lipolítica de acuerdo con la invención y de DATEM, uno o más auxiliares del procesamiento utilizados en el horneado tales como los mencionados anteriormente y/o una o más enzimas adicionales como se describió anteriormente. La composición de horneado que comprende DATEM y la enzima lipolítica de acuerdo con la invención pueden estar en cualquier forma adecuada para utilizarse en horneado, tal como en forma sólida o líquida. Una composición en forma
10 sólida puede ser por ejemplo un polvo o un granulado. La composición líquida puede ser por ejemplo una composición a base de agua o aceite y opcionalmente se puede estabilizar. La composición de horneado que comprende la enzima lipolítica de acuerdo con la invención y el DATEM también puede ser parte de una premezcla como se definió anteriormente. La composición de horneado que comprende la enzima lipolítica de acuerdo con la invención y DATEM se puede añadir como tal a la harina utilizada para preparar la masa. Opcionalmente se puede formar directamente en la masa al añadir separadamente la enzima lipolítica de acuerdo con la invención y el
15 DATEM en las cantidades apropiadas a los ingredientes de la masa.

En otra realización, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención se puede utilizar en la producción de una torta y en la producción de una masa de cocinar de la cual se puede derivar una torta.

20 La enzima lipolítica de acuerdo con la invención se puede utilizar en todos los tipos de tortas, incluyendo tortas quebradizas, tales como por ejemplo tortas de libra y tortas de mantequilla, e incluyendo tortas de espuma, tal como por ejemplo los merengues, tortas de esponjado, torta de bizcocho, tortas roulade, genoise y chiffon. La torta de esponjado es un tipo de torta suave a base de harina de trigo, azúcar, levadura en polvo y huevos (y opcionalmente levadura en polvo). La única grasa presente es la proveniente de la yema de los huevos, que se añade algunas veces de manera separada de la clara. Se utiliza a menudo como base de otros tipos de tortas y postres. Una torta de libra se prepara tradicionalmente de una libra de cada uno de harina, mantequilla, huevos, y azúcar,
25 opcionalmente complementada con levadura en polvo. En la torta chiffon, la mantequilla/margarina se ha sustituido por aceite. El contenido de azúcar y yema de huevo se ha disminuido comparado con la torta de libra o de esponjado, y se ha incrementado el contenido de clara de huevo.

30 La enzima lipolítica de acuerdo con la invención se puede utilizar tanto en tortas normales como en tortas en las cuales se ha reducido la cantidad de huevos y/o grasa. La reducción de la cantidad de los huevos y/o la grasa que es posible difiere por tipo de torta. La persona experta en la técnica conoce las cantidades de huevos y/o grasa que están normalmente presentes en las recetas de tortas que dependen del tipo de torta. En general, se puede alcanzar una reducción de la cantidad de huevos de al menos 5% p/p. Más preferiblemente, se puede alcanzar una reducción de la cantidad de huevos de al menos 10% p/p, aún más preferiblemente se puede alcanzar una reducción de al menos 15% p/p. Se mostró que se puede alcanzar aún una reducción de la cantidad de huevos utilizada de al menos 20% p/p. La reducción de la cantidad de huevos puede ser de al menos 30% p/p, 40% p/p o aún al menos
35 50% p/p.

En general, se puede alcanzar una reducción de la cantidad de grasa de al menos 10%. Más preferiblemente, se puede alcanzar una reducción de la cantidad de grasa de al menos 20%, aún más preferiblemente se puede alcanzar una reducción de al menos 30%. Se mostró que se puede alcanzar aún una reducción de la cantidad de
40 grasa utilizada de al menos 50%.

En la Solicitud de Patente Internacional número PCT/EP2008/051147 se ha descrito que la fosfolipasa A se puede utilizar en la producción de torta para mejorar al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste de: (i) viscosidad de la masa de cocinar, (ii) densidad específica, (iii) suavidad de miga inicial, (iv) homogeneidad del poro de la miga, (v) diámetro del poro de la miga, (vi) suavidad de la miga con el almacenamiento, (vii) periodo de caducidad y/o (viii) volumen de la torta. En la misma solicitud de patente se ha descrito también que una fosfolipasa A se puede utilizar en la producción de una torta para posibilitar la reducción de la cantidad de huevos y/o grasa utilizada en la receta de la torta. En particular, se mostró que fue posible, cuando se utilizaba fosfolipasa A, reducir la cantidad de huevos y/o la grasa utilizada en la receta mientras que al menos se mantenía al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste de: (i) viscosidad de la masa de cocinar, (ii) densidad específica, (iii) suavidad de la miga inicial, (iv) homogeneidad del poro de la miga, (v) diámetro del poro de la miga, (vi) suavidad de la miga con el almacenamiento, (vii) periodo de caducidad y/o (viii) volumen de la torta. La expresión "se mantenía al menos" se utiliza aquí para indicar que se mantiene o se mejora una propiedad.
45
50

55 Se ha encontrado ahora que una composición que comprende al menos una fosfolipasa A y una enzima lipolítica de acuerdo con la invención se puede utilizar en la producción de una torta para mejorar al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste de: (i) viscosidad de masa de cocinar, (ii) densidad específica, (iii) suavidad de la miga inicial, (iv) homogeneidad del poro de la miga, (v) diámetro del poro de la miga, (vi) suavidad de la miga con el almacenamiento, (vii) periodo de caducidad y/o (viii) volumen de la torta. Se ha encontrado también que una composición que comprende al menos una fosfolipasa A y una enzima lipolítica de acuerdo con la invención se pueden utilizar en la producción de una torta para posibilitar la reducción de la cantidad de huevos y/o grasa
60

utilizada en la receta de la torta, preferiblemente mientras al menos se mantiene al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste de: (i) viscosidad de la masa de cocinar, (ii) densidad específica, (iii) suavidad de la miga inicial, (iv) homogeneidad del poro de la miga, (v) diámetro del poro de la miga, (vi) suavidad de la miga con el almacenamiento, (vii) periodo de caducidad y/o (viii) volumen de la torta. En particular, cuando una composición que comprende al menos una fosfolipasa A y una enzima lipolítica de acuerdo con la invención se utiliza en la torta en la que se ha reducido la cantidad de huevos y/o grasa en la receta de la torta, o en una torta que comprende una cantidad normal de huevos y/o grasa, se puede mejorar adicionalmente una o más de las propiedades mencionadas anteriormente si se compara con el uso de la fosfolipasa A sola.

En este contexto, se pueden utilizar todos los tipos de fosfolipasa A, por ejemplo la fosfolipasa A1 o la fosfolipasa A2. Se puede utilizar cualquier tipo de fosfolipasa A1. La fosfolipasa A1 tiene una naturaleza de extensibilidad amplia, por ejemplo en los microorganismos *E. coli*, en venenos de serpientes, y en mamíferos en el cerebro, testículos e hígado. Un ejemplo de una fosfolipasa A1 adecuada comercialmente disponible es Lecitase Ultra™ (Novozymes). Se puede utilizar cualquier tipo de fosfolipasa A2. Preferiblemente se utiliza una fosfolipasa A2. Un ejemplo de una fosfolipasa A2 adecuada comercialmente disponible es Cakezyme™ (DSM) o Lecitase 10L (Novozymes). Una fosfolipasa A2 preferida es la fosfolipasa A2 pancreática porcina, por ejemplo la expresada en *Aspergillus niger* (Cakezyme™, DSM).

La medición de si una propiedad se mantiene, se mejora o se deteriora en general se mide preparando una masa de cocinar y/o una torta en una receta original, que no contenga ninguna fosfolipasa A y ninguna enzima lipolítica de acuerdo con la invención, y preparando otras masas de cocina y/o tortas en una receta que contenga fosfolipasa A, opcionalmente menos huevos y/o grasa y opcionalmente la enzima lipolítica de acuerdo con la invención, y comparando una cierta propiedad. En el caso de que las propiedades de las masas de cocina o tortas así comparadas sean sustancialmente las mismas, la propiedad se mantiene, en el caso de que difieran, ha tenido lugar una mejora o un deterioro. Para todas las propiedades mencionadas más abajo se ha dado un método de medición así como también una indicación de cuándo una propiedad se puede considerar mejorada.

La viscosidad de la masa de cocinar se puede medir con un Farinógrafo mediante métodos estándar de acuerdo con la Asociación Internacional de Química del Cereal (ICC) y la Asociación Americana de Química del Cereal (AACC 54-2, ICC 115). El hecho de que por ejemplo la viscosidad de la masa de cocinar de una masa de cocinar obtenida con una cantidad reducida de huevos y/o grasa y que comprende fosfolipasa A y una enzima lipolítica de acuerdo con la invención se ha mejorado o deteriorado con respecto a la misma masa de cocinar pero que comprende fosfolipasa A sola o ninguna fosfolipasa A ni enzima lipolítica, se puede por ejemplo medir como sigue. En el caso de que la viscosidad de la masa de cocinar de una masa de cocinar que contiene una cantidad reducida de huevos y/o grasa y preparado con la fosfolipasa A y la enzima lipolítica de acuerdo con la invención es igual que aquella de por ejemplo la misma masa de cocinar preparada sin fosfolipasa A y sin la enzima lipolítica, o es la misma que aquella de por ejemplo la misma masa de cocinar preparada con fosfolipasa A solamente, la viscosidad de la masa de cocinar se ha mantenido. En el caso de que se haya incrementado la viscosidad de la masa de cocinar, ésta ha mejorado.

La densidad específica de la masa de cocinar se puede medir pesando un volumen predeterminado de masa de cocinar. La densidad específica mejora si ésta disminuye.

La suavidad de la miga de la torta se evalúa empíricamente por el panadero probador experto, o se mide mediante el uso de un analizador de texturas (por ejemplo, TAXT2) como se conoce en la técnica. De hecho, la firmeza de la miga de la torta se mide como se conoce por la persona experta en la técnica. La suavidad de la miga medida a las 24 horas después del horneado se denomina suavidad de la miga inicial. La suavidad de la miga más de 24 horas después del horneado se denomina suavidad de la miga con el almacenamiento, y también se mide para determinar el periodo de caducidad. En el caso de que la suavidad de la miga inicial se haya incrementado, ésta ha mejorado. En el caso de que la suavidad de la miga con el almacenamiento se ha incrementado, ésta ha mejorado.

La homogeneidad del poro de la miga de la torta se puede evaluar empíricamente por el panadero probador experto, o mediante análisis de imagen digital como se conoce en la técnica (por ejemplo, celda C, Calibre Control International Ltd, Appleton, Warrington, UK). En el caso de que la desviación en el tamaño de poro sea pequeña, el miga es más homogéneo. En el caso en que la desviación del tamaño de poro se haga más pequeña, la propiedad mejora.

El diámetro de poro de la miga de la torta se puede evaluar al utilizar un análisis de imagen digital como se conoce en la técnica (por ejemplo, celda C, Calibre Control International Ltd, Appleton, Warrington, UK). En el caso de que el diámetro de poro de la miga promedio disminuya, mejora la propiedad. Preferiblemente, este es el caso cuando se mantiene a la vez el mismo volumen de la torta.

El periodo de caducidad de la torta se puede medir al determinar la elasticidad de la torta en el tiempo. Esto es parte del método para medir la suavidad de la miga, como se conoce por la persona experta en la técnica, por medio del cual el relajamiento de la torta también se puede medir mediante el uso de un analizador de texturas (por ejemplo, TAXT2) como se conoce en la técnica.

El volumen de una torta dada se puede determinar mediante un analizador de volumen de pan automatizado (por ejemplo, BVM-3, TexVol Instruments AB, Viken, Suecia), utilizando detección mediante ultrasonido o láser como se conoce en la técnica. En el caso de que se incremente el volumen, mejora la propiedad. De manera alternativa, la altura de la torta después del horneado en el mismo tamaño de lata es un índice del volumen de la torta. En el caso de que se incremente la altura de la torta, se ha incrementado el volumen de la torta.

La estabilidad de la emulsión de la masa de cocinar se puede determinar determinando la altura de la torta y el análisis visual de la estructura de la torta. En el caso de que la altura de la torta haya disminuido, la estabilidad de la emulsión de la masa de cocinar ha disminuido. En el caso de que la estructura de la torta sea más densa, la estabilidad de la emulsión de la masa de cocinar también ha disminuido.

Se ha encontrado que por ejemplo cuando se añade una composición que comprende una fosfolipasa A y una enzima lipolítica de acuerdo con la invención en una torta de esponja normal o en una torta de esponja que contenga una cantidad reducida de huevos, se puede observar al menos una o más de las siguientes propiedades, por ejemplo una estabilidad de emulsión mejorada o la masa de cocinar, un emulsionamiento más eficiente de la masa de cocinar, una elasticidad mejorada de la masa de cocinar, una suavidad de la miga mejorada de la torta, un volumen mejorado de la masa de cocinar, si se compara con la misma torta o masa de cocinar en la cual se puede usar solamente la fosfolipasa A o ni la fosfolipasa A ni la enzima lipolítica de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona por lo tanto el uso de una composición que comprende una enzima lipolítica de acuerdo con la invención y la fosfolipasa A en la producción de una torta para mejorar al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste de: (i) viscosidad de la masa de cocinar, (ii) densidad específica, (iii) suavidad de la miga inicial, (iv) homogeneidad del poro de la miga, (v) diámetro del poro de la miga, (vi) suavidad de la miga con el almacenamiento, (vii) periodo de caducidad y/o (viii) volumen de la torta. La presente invención también proporciona el uso de una composición que comprende una enzima lipolítica de acuerdo con la invención y fosfolipasa A en la producción de una torta para posibilitar la reducción de la cantidad de huevos y/o grasa utilizada en la receta de la torta, preferiblemente mientras que al menos se mantiene al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste de: (i) viscosidad de la masa de cocinar, (ii) densidad específica, (iii) suavidad inicial de la miga, (iv) homogeneidad del poro de la miga, (v) diámetro del poro de la miga, (vi) suavidad de la miga con el almacenamiento, (vii) periodo de caducidad y/o (viii) volumen de la torta.

La persona experta puede determinar fácilmente las cantidades adecuadas de respectivamente la fosfolipasa A y la enzima lipolítica de acuerdo con la invención que se van a utilizar en la composición, dependiendo de la receta y el tipo de torta.

Opcionalmente, uno o más ingredientes pueden estar presentes en la composición, cerca de la fosfolipasa A y de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención, por ejemplo, permitir la reducción de huevos y/o grasa en la torta, tal como por ejemplo fuentes de proteína alternativas, hidrocoloides, almidón modificado, extracto de levadura, calcio. Los ingredientes preferidos son extracto de levadura, almidón modificado, calcio.

Se puede utilizar un extracto de levadura el cual comprende al menos 30% p/p de 5'-ribonucleótidos, preferiblemente al menos 34% p/p, 38% p/p, 40% p/p o 42% p/p, más preferiblemente al menos 44% p/p, 46% p/p, 48% p/p o al menos 50% p/p de 5'-ribonucleótidos sobre la base de una materia seca libre de cloruro de sodio. Se ha encontrado que el uso de tal extracto de levadura no solamente mejora el sabor de la torta, sino que también tiene un efecto emulsionante sorprendente, porque luego de su uso, la viscosidad de la masa de cocinar mejora.

En el contexto de la presente invención, la frase "5'-ribonucleótido" se refiere a la cantidad total de 5'-monofosfato ribonucleótidos formados durante la degradación del ARN, a saber, 5'-monofosfato guanina (5'-GMP), 5'-monofosfato uracilo (5'-UMP), 5'-monofosfato citosina (5'-CMP), 5'-monofosfato adenina (5'-AMP), donde 5'-AMP puede estar parcial o completamente convertido en 5'-monofosfato inosina (5'-IMP). Por ejemplo, en un extracto de levadura que comprenda 30% p/p de 5'-ribonucleótidos sobre la base de una materia seca libre de cloruro de sodio, la cantidad total de 5'-GMP, 5'-UMP, 5'-CMP, 5'-AMP y 5'-IMP es 30% p/p sobre la base de materia seca libre de cloruro de sodio. En una realización preferida, se utiliza un extracto de levadura en el que la cantidad total de 5'-GMP más 5'-IMP es al menos 15% p/p, preferiblemente al menos 17% p/p, 19% p/p, 20% p/p o 21% p/p, más preferiblemente al menos 22% p/p, 23% p/p, 24% p/p o 25% p/p, sobre la base de una materia seca libre de cloruro de sodio. Debido a la constitución del ARN, del cual surgen los 5'-ribonucleótidos, siempre estarán presentes el 5'-GMP y 5'-IMP en aproximadamente cantidades iguales en esta realización. En el contexto de la presente invención, los cálculos de porcentaje en peso de los 5'-ribonucleótidos están basados en el heptahidrato de su sal de disodio, a menos que se especifique otra cosa. Todos los porcentajes se calculan sobre la materia seca libre de cloruro de sodio. En la presente invención, la frase "materia seca libre de cloruro de sodio" se refiere al hecho de que, para el cálculo del porcentaje en peso, se excluye de la composición el peso de cualquier cloruro de sodio presente en el extracto de levadura. La medición del cloruro de sodio en el extracto de levadura y el cálculo anteriormente mencionado se pueden realizar por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Un ejemplo de extractos de levadura que comprende 40% p/p de 5'-ribonucleótidos, de los cuales 20% p/p de 5'-GMP más 5'-IMP, estando los porcentajes en peso basados en materia seca de extracto de levadura libre de cloruro de sodio, se vende bajo la marca comercial Maxarite® Delite (DSM Food Specialities, Países Bajos).

Se puede utilizar almidón modificado para reducir aún más la cantidad de grasa utilizada en la receta de la torta. Se pueden utilizar todos los tipos de almidón modificado, por ejemplo almidón de patata modificado o almidón de trigo modificado. Se utiliza preferiblemente almidón de patata modificado, tal como por ejemplo el descrito en el documento US 6.864.063. Se utiliza más preferiblemente almidón de patata modificado, el cual se obtiene al tratar almidón de patata con amilomaltasa. Un ejemplo de un almidón de patata modificado preferido se vende bajo la marca comercial Etenia® (Avebe Food). Se ha encontrado de manera sorprendente que en las tortas que comprenden una cantidad reducida de grasa, por ejemplo tan baja como 30% p/p, y que se preparan utilizando una combinación de fosfolipasa A, una enzima lipolítica de acuerdo con la invención y un almidón de patata modificado, las propiedades de torta deseadas son aquellas mencionadas anteriormente, por ejemplo la viscosidad de la masa de cocinar, se mejoran si se compara con las tortas producidas al utilizar 30% p/p menos de grasa y sin adición de fosfolipasa A, enzima lipolítica y almidón de patata modificado.

Se añade preferiblemente calcio para potenciar la actividad de la fosfolipasa A. Se ha encontrado especialmente ventajoso añadir aproximadamente entre 40 - 200 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 5.000 CPU de Fosfolipasa A (indicada en adelante como PLA) a la receta de la torta. Preferiblemente, se añaden entre 50 y 150 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 5.000 CPU de PLA a la receta de la torta, y más preferiblemente al menos 90 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ por 5.000 CPU de PLA. El CPU (Unidad de Fosfolipasa Cromogénica = 1 EYU (Unidad de Yema de Huevo) se define como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de ácido por minuto a partir de yema de huevo a 40°C y un pH de 8,0. El sustrato en este método: rac-1,2-dioctanoilditio fosfatidilcolina, medida espectrofotométricamente a 405 nm. De manera sorprendente, se ha encontrado que la masa de cocinar de la torta no proporciona suficiente calcio para que la fosfolipasa A trabaje de manera eficiente. La invención proporciona además un método para preparar una masa de cocinar o un método para preparar una torta en el que se añade una composición que comprende una fosfolipasa A y la enzima lipolítica de acuerdo con la invención a los ingredientes de la torta.

Los ingredientes típicos de la torta son harina de trigo, huevos y azúcar. Opcionalmente, se añaden levadura en polvo, sal, agua, emulsionantes (tales como por ejemplo los PGE y monoglicéridos), margarina, mantequilla y/o aceite (por ejemplo para tortas de libra y bollitos). Un método para preparar una masa de cocinar de acuerdo con la invención comprende preferiblemente las etapas de:

a. preparar la masa de cocinar de la torta añadiendo al menos:

i. azúcar

ii. harina

iii. fosfolipasa A, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención y los huevos

Un método para preparar una torta de acuerdo con la invención comprende además la etapa de

b. hornear la masa de cocinar para producir una torta

De acuerdo con el método anteriormente mencionado, se pueden preparar tanto tortas que comprenden una cantidad reducida de huevos y/o grasa como tortas en las que no se ha aplicado reducción de huevos y/o grasa.

La persona experta en la técnica sabe cómo preparar una masa de cocinar o una torta partiendo de los ingredientes de la torta. Opcionalmente pueden estar presentes uno o más de otros ingredientes en la composición, por ejemplo para permitir la reducción de los huevos y/o la grasa en la torta, tal como fuentes de proteína, hidrocoloides, extracto de levadura, almidón modificado, calcio. Los ingredientes preferibles son extracto de levadura, almidón modificado, calcio como se definió anteriormente.

La invención proporciona además una torta o una masa de cocinar obtenible mediante el método anteriormente mencionado. La invención también proporciona una composición de horneado, que puede utilizarse por ejemplo en la producción de una torta o masa de cocinar, que comprende una fosfolipasa A y una enzima lipolítica de acuerdo con la invención. Esta composición de horneado también se puede utilizar en productos de masa y productos horneados obtenidos de tal masa. Por ejemplo, se puede utilizar en productos de masa que contienen además huevos y en productos horneados derivados de ellos, tales como brioche y panettone, tanto normales como con una cantidad de huevos reducida.

Dicha composición de horneado también puede ser parte de una pre-mezcla de torta que comprende también harina y opcionalmente otros ingredientes.

Las aplicaciones industriales mencionadas anteriormente de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención comprende solamente unos pocos ejemplos, y esta lista no pretende ser restrictiva.

La enzima lipolítica se puede producir convenientemente en microorganismos. En los procesos anteriores, es ventajoso utilizar enzima lipolítica que se obtenga mediante técnicas de ADN recombinante. Las enzimas recombinantes se pueden producir a bajo coste, alto rendimiento, libres de agentes contaminantes como bacterias o virus, pero también libres de toxinas bacterianas o que contaminen otras actividades enzimáticas.

A continuación se ilustra la invención por medio de los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Producción de las lipasas de la invención

5 Las enzimas lipolíticas L01, L02, L03, L04 codificadas mediante las secuencias nucleotídicas SEC ID NO: 1 (ADN LO 1), SEC ID NO: 3 (ADN L02), SEC ID NO: 5 (ADN L03), SEC ID NO: 7 (ADN L04) como se proporciona aquí se obtuvieron al construir plásmidos de expresión que contienen la secuencia de ADN, transformando una cepa de *Aspergillus niger* con tal plásmido, y haciendo crecer las cepas de *A. niger* de la manera siguiente.

10 Esporas frescas (10^6 - 10^7) de cepas de *A. niger* se inocularon en 20 ml de un medio CSL (matraz de 100 ml, deflector) y se hacen crecer durante 20-24 horas a 34°C y 170 rpm. Después de la inoculación de 5-10 ml de CSL pre-cultivo en 100 ml de medio CSM (matraz de 500 ml, deflector), las cepas se fermentaron a 34°C y 170 rpm durante 3 a 5 días.

15 Los sobrenadantes libres de células se obtuvieron mediante centrifugación del caldo de fermentación a 5000xg durante 30 minutos a 4°C. Los sobrenadantes libres de células se almacenan a -20°C hasta el uso. Opcionalmente, el sobrenadante se puede filtrar adicionalmente sobre un filtro de microfibras de vidrio GF/A Whatmann (150 mm de diámetro) para eliminar las partículas más grandes. Si es necesario, el pH del sobrenadante se ajusta hasta pH 5 con KOH 4 N, y se filtra de forma estéril sobre un filtro de 0,2 µm (parte superior de la botella) con succión, para eliminar el material fúngico.

20 El medio CSL consiste en (en cantidad por litro): 100 g de Sólidos de Maceración del Maiz (Roquette), 1 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g de glucosa $\cdot \text{H}_2\text{O}$ y 0,25 g de Basildon (anti-espuma). Los ingredientes se disolvieron en demi-agua, y el pH se ajustó hasta pH 5,8 con NaOH o H_2SO_4 ; matraces de 100 ml con deflector y bola de espuma se llenaron con 20 ml de caldo de fermentación y se esterilizaron durante 20 minutos a 120°C, después de lo cual se añadieron 200 µl de una solución estéril que contiene 5000 IU/ml de penicilina y 5 mg/ml de estreptomicina a cada matraz después de enfriar hasta temperatura ambiente.

25 El medio CSM consistió de (en cantidades por litro): 150 g de maltosa $\cdot \text{H}_2\text{O}$, 60 g de Soytone (peptona), 1 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 15 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,08 g de Tween 80, 0,02 g de Basildon (anti-espuma), 20 g de MES, 1 g de L-arginina. Los ingredientes se disolvieron en demi-agua y el pH se ajustó hasta pH 6,2 con NaOH o H_2SO_4 ; matraces de 500 ml con deflector y bola de espuma se llenaron con 100 ml de caldo de fermentación y se esterilizaron durante 20 minutos a 120°C, después de lo cual se añadió 1 ml de una solución estéril que contenía 5000 IU/ml de penicilina y 5 mg/ml de estreptomicina a cada matraz después de enfriar hasta temperatura ambiente.

30

Ejemplo 2

Purificación de la enzima lipolítica de la invención

35 Después de descongelar los sobrenadantes libres de célula congelados obtenidos en el ejemplo 1, los sobrenadantes se centrifugaron ampliamente a 4°C para eliminar cualquier sólido. Con el fin de eliminar los contaminantes de bajo peso molecular, los sobrenadantes se ultrafiltraron utilizando un sistema Millipore Labscale TFF equipado con un filtro con un corte de 10 kDa. Las muestras se lavaron 3 a 5 veces con volúmenes de 40 ml de 100 mM de solución amortiguadora de fosfato fría, pH 6,0, que incluye 0,5 mM de CaCl_2 . El volumen final de la disolución de enzima fue 30 ml y se denomina adicionalmente como "ultrafiltrado".

40 Para la purificación adicional, el ultrafiltrado se puede aplicar a una columna de intercambio de anión MonoQ. El gradiente de sal se ajusta a 1M de NaCl sobre 20 volúmenes de columna. Las soluciones amortiguadoras fueron una mezcla de 70 mM de Bis-TRIS y 50 mM de TRIS. El pH se ajustó con HCl 0,1M. De manera sorprendente, se observó que se obtuvieron los mejores resultados cuando se realizó la purificación a un pH=9, en el que la lipasa eluye a una conductividad de 35mS/cm.

45 El contenido de proteína total de las muestras se determinó utilizando un método Bradford (The Protein Protocols Handbook, 2a edición, Editado por J.M. Walker, Humana Press Inc, Totowa 2002, p15-21).

Determinación de la concentración de la enzima lipolítica mediante A280 y HPSEC

50 Alternativamente la concentración de la enzima lipolítica se puede calcular a partir de la extinción a 280 nm (A280) atribuible a la enzima lipolítica y el coeficiente de extinción molecular calculado de la enzima lipolítica. La medición de la A280 se realizó mediante un espectrofotómetro Uvikon XL Secomam (Beun de Ronde, Abcoude, Países Bajos).

El coeficiente de extinción molecular de la enzima se puede calcular a partir del número de restos de tirosina, triptófano y cisteína por molécula de enzima (S.C. Gil y P.H. von Hippel, Anal. Biochem. 182, 319-326 (1989)). El coeficiente de extinción molecular de estos aminoácidos es 1280, 5690 y 120 $\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, respectivamente. El número

de restos de tirosina, triptófano y cisteína en la enzima lipolítica de la invención se puede deducir de las secuencias proteicas seleccionadas del grupo que consiste en SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 8. Los cálculos se llevaron a cabo para SEC ID NO: 2, SEC ID NO: 4, SEC ID NO: 6, SEC ID NO: 8, que comprenden los aminoácidos 34-304. El coeficiente de extinción molar para las enzimas lipolíticas codificada mediante las secuencias polinucleotídicas anteriormente mencionadas es $35560 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, que corresponde a una OD a 280 nm de $1,25 \text{ cm}^{-1}$ para 1 mg/ml. El peso molecular calculado de los polipéptidos maduros es 28,4, 28,3, 28,4, 28,5 kD para las lipasas L01, L04, L03 y L02 respectivamente, considerando los aminoácidos 34-304 solamente.

La extinción del ultrafiltrado a 280 nm (A280), que es atribuible a la enzima lipolítica, depende de la pureza de la muestra de enzima. Este contenido de lipasa específico se puede determinar utilizando HP-SEC (Cromatografía de Exclusión de Tamaños de Alto Comportamiento) con una columna TSK SW-XL (300*7,8 mm; intervalo de MW 10-300 kDa). La solución amortiguadora de elución consistió en 25 mM de solución amortiguadora de fosfato de sodio pH 6,0, y se utilizó a un caudal de 1 ml/min. Se inyectaron muestras de 5-100 μl . Se midió la absorbancia a 280 nm.

El A280 atribuible a la enzima lipolítica de la invención se obtuvo a partir de la relación de la superficie pico del pico de enzima lipolítica respectivo en el cromatograma y la superficie total de los picos que absorben a 280 nm. La concentración de la enzima lipolítica se calculó entonces multiplicando la A280 de la muestra por la relación descrita anteriormente y dividida entre el coeficiente de extinción calculado para la enzima lipolítica.

Ejemplo 3

Ensayos

La actividad de lipasa se determinó espectrofotométricamente utilizando el sustrato cromogénico palmitato de p-nitrofenilo (pNPP, Sigma N-2752). En este ensayo, el pNPP se disuelve en 2-propanol (40 mg de pNPP por 10 ml de 2-propanol (Merck 1.09634)) y se suspendió en 100 mM de solución amortiguadora de acetato pH=5,0 que contiene 1,0% de Tritón X-100 (Merck 1.12298) (5 ml de sustrato en 45 ml de solución amortiguadora). La concentración de sustrato final es de 1,1 mM. La lipasa se incubó con esta solución de sustrato a 37°C durante 10 minutos. La reacción se detiene por adición de la solución amortiguadora de parada 2% de TRIS (Merck 1.08387) + 1% de Tritón X-100 en una relación 1:1 con respecto a la mezcla de reacción, y posteriormente el p-nitrofenol formado (pNP) se mide a 405 nm. Este ensayo también se puede aplicar a diferentes valores de pH con el fin de determinar la dependencia del pH de una lipasa. Se debe entender que a diferentes valores de pH se pueden requerir diferentes soluciones amortiguadoras, o que se pueden necesitar diferentes detergentes para emulsionar el sustrato. Una unidad de lipasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones de reacción establecidas. Se debe entender que es práctica común en el análisis de rutina utilizar soluciones de enzima de calibración estándar con actividad conocida determinada en un ensayo diferente para correlacionar la actividad de un ensayo dado con unidades como se determinarían en el ensayo de calibración.

Alternativamente, se puede determinar la actividad de lipasa utilizando tributirato de 2,3-mercapto-1-propanol (TBDMP) como sustrato. La lipasa hidroliza los enlaces de tioéster del TBDMP, liberando de esta manera ácido butanóico y dibutirato de 2,3-mercapto-1-propanol, monobutirato de 2,3-mercapto-1-propanol o el 2,3-mercapto-1-propanol. Los grupos tiol liberados se valoran en una reacción posterior con 4,4-ditiopiridina (DTDP), formando 4-tiopiridona. Esta última está en un equilibrio tautomérico con 4-mercaptopiridina, que absorbe a 334 nm. La reacción se lleva a cabo en una solución amortiguadora de acetato 0,1 M pH 5,0 que contiene 0,2% de Triton-X100, 0,65 mM de TBDMP y 0,2 mM de DTDP a 37°C. Una unidad de lipasa se define como la cantidad de enzima que libera 1 micromol de 4-tiopiridona por minuto a las condiciones de reacción establecidas.

Además de la medición espectrofotométrica, la actividad de lipasa también se puede determinar utilizando una medición titrimétrica. Por ejemplo, la actividad de esterasa de una enzima lipolítica se puede medir sobre tributirina como un sustrato de acuerdo con el Food Chemical Codex, Cuarta Edición, National Academy Press, 1996, p803.

Mediciones de la Actividad

Tabla 1. Las actividades de la enzima lipolítica en sobrenadantes libres de células como se prepararon en el Ejemplo 1 (la actividad de la lipasa se determinó a pH 5 utilizando como un sustrato palmitato de p-nitrofenilo. La actividad de lipasa se da como unidades/mg de proteína Bradford total).

Enzima lipolítica	Lipasa (Unidades/mg)
L01	34
L03	34
L04	44
L02	83

Se debe notar adicionalmente que en este ensayo solamente está presente un único sustrato, y que el número de actividad no predice la actividad real en las mezclas de sustratos como masa de pan.

Caracterización de la Proteína

Tabla 2: Propiedades bioquímicas de lipasas L01, L02, L03, L04

	Intervalo de MW aparente	MW aparente desglucosilado	MW aparente glucosilado	Intervalo aparente de pI	pI teórico
L02	28-35	29	33	4,5-5,0	5,3
L03	28-35	29	33	4,5-5,0	5,3
L04	30-33	29	33	4,3-4,7	5,0
L01	28-41	29	33-41	4,2-4,7	4,9

5

La estimación del peso molecular mediante SDS-PAGE se desarrolló con NuPage 4-12% MES Simple Blue Safe Stain en las muestras del ultrafiltrado. Con el fin de desglucosilar las proteínas, se trató la muestra de proteína con PNGase-F (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Alemania). Posteriormente, tanto la muestra tratada como la no tratada se sometieron a una electroforesis en gel SDS-PAGE. La caracterización y manejo de las glucoproteínas se describió ampliamente en The Protein Protocols Handbook, 2ª edición, Editada por J.M.Walker, Humana Press Inc, Totowa 2002, capítulo VI.

10

El punto isoelectrico (pI) se determinó mediante electroforesis en gel de enfoque isoelectrico en comparación con el IEF Maker 3-10 (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Alemania), que contiene proteínas marcadoras con el intervalo de pI desde 3,5 a 10,7. Si es necesario, se pueden desalinizar las muestras por ejemplo utilizando columnas de giro de desalinización de proteínas (producto número 89849, Pierce, Rockford, USA) como se describió por el fabricante. Las muestras se diluyeron entonces 1:1 con Novex® IEF Simple Buffer pH 3-10 y se sometieron a una electroforesis en gel de enfoque isoelectrico que utiliza un sistema de Electroforesis Xcell SureLock™ Mini-Cell para geles Novex® IEF (Invitrogen Carlsbad, USA) como se describió por el fabricante. Después del experimento, el gel se fijó con 12,5% de TCA, se lavó y se tiñó con SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen, Carlsbad, USA).

15

20 Determinación del peso molecular de L01 mediante espectroscopía de masas (MS)

La lipasa L01 se desglucosiló antes del análisis de MW. Antes de la desglucosilación, se realizó una precipitación con TCA. La precipitación con TCA se realizó diluyendo la muestra 1:1 en 20% de TCA. La muestra se incubó durante 4 horas a 4°C. Las proteínas se peletizaron mediante centrifugación a 13000 rpm durante diez minutos a 4°C. El peletizado se lavó con acetona a -20°C y se centrifugó de nuevo a 13000 rpm durante diez minutos a 4°C. Esta etapa de lavado se repitió tres veces. El pelete se suspendió en 100 mM de NH₄HCO₃ y la desglucosilación se llevó a cabo utilizando N-glicosidasa F (PNGase-F, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim Alemania) a 37°C durante la noche. Las cadenas de azúcar liberadas se eliminaron mediante ultrafiltración, utilizando un dispositivo centrífugo de corte de 10 kDa (Pall).

25

La lipasa desglucosilada L01 se analizó mediante MS. La muestra se infundió directamente en el LTQ-Orbitrap MS (Thermo). Se pudieron calcular seis masas de proteína diferentes entre 28 y 29 kDa. Estas masas de proteína, los correspondientes restos de lipasa L01 y su relativa abundancia, comparada con la forma más abundante, se muestran en la tabla 1.

30

Tabla 3: Las masas intactas calculadas de la lipasa desglucosilada L01. La abundancia relativa se compara con la forma más abundante de 28435,7 Da, ajustada al 100%.

Peso Molecular (Da)	Abundancia relativa (%)	Restos de L01
28435,7	100	34-304
28250,6	61	34-303 -W C-term
28707,8	32	31-304 +AVT N-term
28520,7	28	31-303 -W y +AVT
28912,9	21	34-307 +RRY C-term
28163,5	19	34-302 -SW C-term

29185,1	17	31-307 +AVT y +RRY
---------	----	--------------------

Las pequeñas diferencias en MW indican que, utilizando SDS-PAGE, estas formas se observarán como una banda única a 28-29 kD. Tanto el término N como el término C exhiben heterogeneidad, que se podían originar por la especificidad reducida del procesamiento o por la degradación proteolítica adicional en el proceso de producción después de la maduración inicial. Debido a que las lipasas desglucosiladas L02, L03, L04 muestran en SDS-PAGE una movilidad que es virtualmente idéntica a la movilidad del L01, se concluye que el L02, L03 y L04 sufren un procesamiento post-transduccional similar como se observa para L01.

pH óptimo

La dependencia del pH óptimo de la enzima lipolítica se puede determinar al llevar a cabo un ensayo que mide cierto tipo de actividad lipolítica a diferentes valores de pH. El pH al cual se observa la actividad máxima es el pH óptimo de la enzima particular. Como el pH óptimo puede depender del tipo de sustrato y de las condiciones de ensayo aplicadas, se debe establecer cuando se utilizan diferentes sustratos o cuando las condiciones de ensayo cambian drásticamente.

L01 tiene un pH óptimo amplio 6,5-9,5 utilizando palmitato de p-nitrofenilo como sustrato a 37°C en amortiguador de fosfato.

Ejemplo 4

Aplicación Láctea - perfil de Ácido Graso Libre generado por las lipasas de acuerdo con la invención en un sistema similar a queso

Se comparó el perfil de FFA generado por los polipéptidos L01, L03 y L04 de acuerdo con la invención y los perfiles de FFA de una lipasa microbiana (Piccantase® R8000, una lipasa microbiana de *Rhizomucor miehei* de DSM Food Specialties, Países Bajos) (a continuación abreviada como PicR8000) después de incubación con pasta de queso Cheddar. El perfil de FFA del queso Parmesano como un estándar de oro se toma de D.T. Lai, A.D. Mackenzie, C.J. O'Connor, K.W. Turner J. Dairy Sci. 80:2249-2257 (1997), página 2255 (abreviada aquí como ParmChees). El perfil de FFA de la pasta de queso Cheddar incubada con agua en lugar de lipasa se utilizó como un control o blanco negativo en todos los experimentos, y no fue muy diferente del perfil de FFA del queso Cheddar como se conoce de la literatura, M.V. Arbige, P.R. Freund, S.C. Silver, J.T. Zelko, Food Technology 1986, páginas 91-98.

La pasta de queso Cheddar se preparó a partir de queso Cheddar joven (es decir, con un tiempo de maduración menor de 2 semanas) gratinando y mezclando con agua hasta un contenido de humedad final de 46,4% p/p (el contenido de grasa sobre la materia seca fue de 49,3% p/p). La pasta de queso Cheddar se pasteurizó durante 5 min a +80°C, se dividió en pequeñas porciones y se almacenó a +4°C hasta el uso como un sustrato para las enzimas lipolíticas en este experimento.

Cada una de las lipasas ensayadas (solución en agua) se añadió a una pasta de queso Cheddar de una porción caliente a +40°C, se mezcló completamente y se incubó durante 1 y 4 días a +40°C. Las dosis de lipasas se escogieron a fin de conseguir una relación de conversión de grasa en la pasta de queso Cheddar entre 5-25%. Con el fin de detener la actividad lipolítica en la pasta de queso Cheddar, las muestras se congelaron instantáneamente a -20°C y se almacenaron hasta el análisis.

Todas las muestras se analizaron con respecto a su perfil de FFA. Se llevó a cabo la determinación del FFA liberado en la pasta de queso Cheddar de acuerdo con un método estándar descrito en la técnica (Jong C., de y Badings H.T. J. High Resolution Chromatography, 13:84-98 (1990)). En pocas palabras, después de la extracción de la grasa sin reaccionar y el FFA de las muestras, cada FFA se aisló mediante un método de extracción en fase sólida, y el FFA aislado se analizó mediante cromatografía de gases en una columna capilar. Los picos en los cromatogramas se identificaron mediante comparación de los tiempos de retención con una mezcla estándar que contiene el mismo FFA. Los contenidos de FFA en las diversas muestras se calcularon a partir de las áreas pico de los FFA individuales utilizando patrones internos que se añadieron a las muestras (con corrección para la respuesta del detector y rendimiento de extracción).

El contenido de ácidos grasos libres se midió en mg de cada ácido graso libre por kg de pasta de queso Cheddar y, utilizando además un peso molecular de FFA, se recalculó en mmol por kg de pasta de queso Cheddar.

Como resultado, los perfiles de ácidos grasos libres dados en mmol/kg se utilizaron para calcular el porcentaje de conversión de grasa en cada muestra para verificar que está comprendida entre 5-25%. El grado de conversión de grasa se determinó corrigiendo el valor inicial utilizando el perfil de FFA de una medición de un blanco que es pasta de queso Cheddar incubada con agua.

Por lo tanto, el grado de conversión de grasa en cada muestra se determina como se indicó en la descripción y suponiendo que la pasta de queso Cheddar contiene una cantidad total de ácidos grasos de 1,19 moles/kg:

$$D = \frac{(\text{cantidad total FFA en muestra} - \text{cantidad de ácidos FFA en el blanco}) \cdot 100\%}{\dots}$$

$$D = 1,19$$

[1]

Utilizando la fórmula [1], el D se calculó para cada una de las muestras y los resultados se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Grado de conversión de grasa

Lipasa	D% 1 día	D% 4 días
L01	14,8	15,8
L03	21,0	22,5
L04	21,1	21,5
PicR8000	6,2	10,0

5

Como se puede ver a partir de la Tabla 4, el D no cambia significativamente tras 1 a 4 días de tiempo de incubación y cuando la dosificación de las enzimas está en un intervalo adecuado.

Con el fin de comparar la especificidad de las lipasas para liberar ciertos FFA independientes de sus dosis, es conveniente calcular el contenido de Cx relativo de cada FFA (en mmol/kg de pasta de queso Cheddar) al FFA total (en mmol/kg de pasta de queso Cheddar), y así se expresan los perfiles FFA en %. Este método de comparación se conoce bien por la persona experta en la técnica y es ampliamente utilizado en la bibliografía. Puesto que se encontró que los perfiles de FFA de las muestras investigadas no cambian significativamente entre el día 1 y el día 4, sólo se representan los datos para el día 4 en la Tabla 5 y se muestran en la Figura 1.

El perfil de FFA del Queso Parmesano se da también; véase D.T. Lai, A.D. Mackenzie, C.J. O'Connor, K.W. Turner J. Dairy Sci. 80:2249-2257 (1997), página 2255.

15

Tabla 5: Contenido de Cx relativo en cada muestra

FFA que contiene Cx	Contenido de Cx relativo en cada muestra (expresado en % en moles)				
	L03	L01	L04	PicR8000	Queso Parm.
C4:0	29,5	27,0	28,3	18,1	39,6
C6:0	9,9	10,8	9,6	9,5	13,2
C8:0	3,1	4,1	3,3	3,3	3,7
C10:0	10,1	9,5	9,7	7,1	6,9
C12:0	8,2	8,0	8,2	5,7	5,3
C14:0	18,3	17,5	18,2	13,2	6,7
C16:0	12,6	14,3	13,1	19,7	11,8
C18:0	3,1	3,2	3,5	7,5	3,1
C18:1	5,3	5,8	6,1	11,8	9,6

A partir de la Tabla 5 y la figura 1, está claro que el perfil de FFA del Queso Parmesano es muy diferente de aquel generado por la lipasa microbiana PicR8000, que se comercializa para producción de variedades intensas y picantes de quesos italianos, tales como Provolone, Parmesano, Romano, (Technical Bulletin, DSM Países Bajos). Se conoce en general que las lipasas microbianas no son FFA C4-C10 cortos, y en la técnica existen ejemplos específicos y variados que incluyen preparaciones comerciales. Hasta ahora la PicR8000 se utiliza como una de las lipasas microbianas que son capaces de liberar FFA corto a partir de grasa de la leche.

20

De manera sorprendente, se encontró que las lipasas de acuerdo con la invención L01, L03 y L04 muestran en comparación con PicR8000 una alta especificidad para la liberación de ácido graso libre que contiene C4. El perfil de FFA generado por estos polipéptidos es más próximo al perfil de FFA del queso Parmesano si se compara con PicR8000. La especificidad de las lipasas se puede comparar utilizando la relación de especificidad R_{espec} que se puede calcular como:

$$R_{espec} = \frac{\sum C4 - C10}{\sum C12 - C18}$$

En la que “ $\sum C4-C10$ y $\sum C12-18$ ” son las sumas de FFA relativo, y se define en la descripción. La R_{espec} se determina para la composición láctea que se obtuvo utilizando queso joven (preferiblemente queso Cheddar o Gouda con un tiempo de maduración de menos de 2 semanas) incubado con la enzima lipolítica bajo condiciones de dosificación, tiempo de incubación y temperatura de incubación que conducen a un grado suficiente de conversión de grasa en las muestras incubadas comprendidas entre 5%-25%, en donde el grado de conversión de grasa se calcula como se indicó anteriormente. Los valores de R_{espec} para L01, L03, L04 y PicR8000 se dan en la Tabla 6.

Tabla 6. Relación de especificidad R_{espec} de las lipasas de la invención L01, L03 y L04 en comparación con la lipasa microbiana PicR8000 y el queso Parmesano.

	Queso Parmesano	PicR8000	L03	L04	L01
R_{espec}	1,7	0,62	1,11	1,04	1,05

Como se puede ver, las lipasas de acuerdo con la invención, L01, L03 y L04 muestran una alta especificidad para la liberación de los ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 en comparación con la enzima microbiana Piccantase® R8000, que es menos específica.

Ejemplo 5

Experimento de Horneado – barra alargada de pan a escala completa

El comportamiento del horneado de las enzimas lipolíticas L01-L04 también se ensayó en una barra alargada de pan a escala completa. Se mezclaron 2000 g de harina (Kolibri™), 47 g de levadura comprimida, 40 g de sal, 50 ppm de ácido ascórbico, 2 ppm de Bakezyme® P500 (alfa-amilasa fúngica), 15 ppm de Bakezyme® HSP6000 (hemicelulasa fúngica) y 58% ml de agua en un mezclador Diosna durante 2 minutos a velocidad 1 y 71 Wh a velocidad 2, a una temperatura final de masa de 27°C. La masa se dividió en 6 piezas de 350 g, se redondeó y se levó durante 20 minutos a 32°C y 90% de humedad relativa. Posteriormente, las piezas de masa se moldearon y se conformaron y se levaron durante 100 minutos a 34°C a una humedad relativa de 90%. Las piezas de masa completamente levadas se grabaron y se hornearon en un horno a 240°C durante 30 minutos con adición de vapor inicial.

Los sobrenadantes libres de células (con al menos 2 mg/ml de proteína Bradford total) que contenían L01, L02, L03 o L04, respectivamente, se añadieron a la harina en dosis que varían desde 0,1 hasta un máximo de 4 ppm de proteína Bradford (1 ppm de proteína Bradford es igual a 1 mg de proteína Bradford por kg de harina). Como control adicional, se ensayó el sobrenadante libre de células de la cepa hospedante de *A. niger* que no contiene L01-L04, que contiene 0,3 mg/ml de proteína Bradford, dosificando un volumen (ml) equivalente al volumen más alto del sobrenadante libre de células añadido para lograr las dosis más altas de L01-L04 ensayadas.

Los diversos efectos de las enzimas lipolíticas a las diferentes dosis, tanto en masa como el producto final horneado, se compararon con un blanco, un mendrugo que no contiene adiciones extra, y un mendrugo que contiene 0,3% de DATEM (Panodan® 80CP). Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, los volúmenes de los mendrugos se determinaron mediante un analizador de volumen de pan automatizado (BVM-3, TexVol Instruments). El volumen del mendrugo del pan blanco se definió como 100%. Los efectos adicionales se evaluaron manual y visualmente por un panadero experimentado como sigue: la estabilidad de la masa se resolvió juzgando visualmente la relación de altura/anchura de una sección transversal del pan en una escala de 1 a 5. 1 = muy plano (relación de altura/anchura de la sección transversal cercana a 0, 5 = muy alto (relación de altura/anchura de la sección transversal del pan cercano a 0,8).

La extensibilidad de la masa se resolvió mediante manualmente en una escala de 1-5.

1 = Muy corto hasta 5 = muy extensible

Crecido en el horno: 1 = incisión cerrada completamente hasta 5 = incisión completamente abierta; rasgada

ES 2 429 492 T3

Estructura de la miga: 1 = estructura de la miga abierta/irregular con paredes celulares más gruesas hasta 5 = estructura de la miga muy fina/uniforme con paredes de célula más delgadas

Color de la miga: 1 = muy oscuro a 5 = blanco muy brillante

Los resultados se dan en las Tablas 7-11.

- 5 Tabla 7: sobrenadante libre de células de la cepa hospedante *A. niger* (control) en comparación con el control y DATEM

	Blanco	Control	DATEM
Volumen (%)	100	101	116
Extensibilidad de masa	3	3	3
Estabilidad de masa	2	2	3
Crecimiento en horno	2	2	4
Estructura de miga	2	2	4
Color de miga	2	2	4

- 10 El sobrenadante libre de células de la cepa hospedante *A. niger* (control), dosificado como se describió anteriormente, no mostró ni efecto positivo ni efecto negativo sobre el comportamiento del horneado en comparación con el blanco.

Tabla 8. Comportamiento de horneado de la enzima lipolítica L01 a diferentes dosis (mg de proteína total por kg de harina (determinado de acuerdo con Bradford)

	Blanco	0,1	0,25	0,5	1	2	4	DATEM
Volumen (%)	100	104	113	117	117	115	107	116
Extensibilidad de masa	3	3	3	4	4	4	4	3
Estabilidad de masa	2	3	4	5	5	5	3	3
Crecimiento en horno	2	3	5	5	5	5	3	4
Estructura de la miga	2	2	3	4	5	4	4	4
Color de la miga	2	2	3	3	4	4	4	4

- 15 Tabla 9. Comportamiento de horneado de la enzima lipolítica L02 a diferentes dosis (mg de proteína total por kg de harina (determinado de acuerdo con Bradford)

	Blanco (0)	0,1	0,25	0,5	1,0	2	4	DATEM
Volumen (%)	100	97	112	114	114	115	110	116
Extensibilidad de masa	3	3	3	3	4	4	4	3
Estabilidad de masa	2	3	4	4	5	5	3	3
Crecimiento en horno	2	2	3	4	5	5	3	4
Estructura de la miga	2	2	4	5	5	5	4	4
Color de la miga	2	2	3	3	4	4	4	4

Tabla 10. Comportamiento de horneado de la enzima lipolítica L03 a diferentes dosis (mg de proteína total por kg de harina (determinado de acuerdo con Bradford)

	Blanco (0)	0,1	0,25	0,5	1,0	2	DATEM
Volumen (%)	100	101	113	117	113	111	116
Extensibilidad de masa	3	3	3	3	3	5	3
Estabilidad de masa	2	2	3	4	4	2	3
Crecimiento en horno	2	2	3	5	5	3	4
Estructura de la miga	2	2	3	5	3	3	4
Color de la miga	2	2	3	5	4	3	4

5 Tabla 11. Comportamiento de horneado de la enzima lipolítica L04 a diferentes dosis (mg de proteína total por kg de harina (determinado de acuerdo con Bradford)

	Blanco (0)	0,1	0,25	0,5	1	2	4	DATEM
Volumen (%)	100	110	117	116	116	116	112	116
Extensibilidad de masa	3	3	3	3	3	3	4	3
Estabilidad de masa	2	3	5	4	4	5	3	3
Crecimiento en horno	2	4	5	5	5	4	3	4
Estructura de la miga	2	3	3	4	5	5	5	4
Color de la miga	2	2	4	3	4	5	4	4

10 Las lipasas L01 a L04 mejoran claramente la estabilidad de la masa, mejoran el volumen del mendrugo, mejoran el crecimiento en el horno y mejoran la regularidad de la miga en comparación con el blanco. L01 al L04 fueron eficaces sustituyendo 0,3% de DATEM, siendo el intervalo de dosis eficaz de al menos: 0,25-2,0 ppm para L01, L02 y L04, y 0,25-1 ppm para L03.

Las lipasas L01 a L04 no influyen en la pegajosidad de la masa en comparación con el blanco o el control DATEM. A mayores dosis de L01 a L04, las masas se vuelven ligeramente más extensibles y no existe ningún efecto significativo sobre el manejo de la masa.

Ejemplo 6

15 Determinación de las conversiones de lípido en la masa del mini-barra alargada

Experimento de horneado - mini-barra alargada

20 Las mini-barras alargadas se hornearon a partir de 150 gramos de piezas de masa obtenidas al mezclar 200 g de harina (Kolibri™), 4,6 g de levadura comprimida, 4 g de sal, 68 ppm de ácido ascórbico, 1 ppm de Bakezyme® P500 (alfa-amilasa fúngica), 5 ppm de Bakezyme® HSP6000 (hemicelulasa fúngica), y en total 57% de agua (peso de harina establecido como 100%). Los sobrenadantes libres de células (con al menos 2 mg/ml de proteína total) que contienen L01, L02, L03 o L04, respectivamente, se añadieron a 0,5, 1,0 y 2,5 ppm de la proteína Bradford. Como control adicional, el sobrenadante de cultivo libre de células de la cepa hospedante *A. niger* desprovisto de L01 a L04, que contiene 0,3 mg/ml de proteína Bradford, se ensayó a 3 ppm de proteína Bradford.

25 Después de mezclar durante 6 minutos y 15 segundos en un mezclador de pasador, la masa se dividió en dos piezas de 150 g, se redondeó y se levó durante 25 minutos a temperatura ambiente y humedad relativa de 90%. Las piezas de masa se moldearon entonces y se conformaron y levaron durante 100 minutos a 32°C y 85% de humedad relativa. Las piezas de masa completamente levadas se grabaron y hornearon en un horno a 240°C durante 20 minutos con una adición de vapor inicial.

30 Los resultados del horneado de los experimentos de horneado de mini-barras alargadas se compararon con los obtenidos a escala completa, como se describe en el Ejemplo 5.

Lípidos polares

Los lípidos se extrajeron agitando vigorosamente masa completamente levada molida y liofilizada (véase experimento de horneado mini-barra alargada anterior) con butanol saturado con agua. Después de la centrifugación, el sobrenadante claro se analizó en HPLC en LiChrospher 100 DIOL 5 µm (250 x 4,0 mm), los componentes lipóidicos se detectaron mediante Evaporative Light Scatterign (Alltech ELSD 2000ES), a flujo de nitrógeno de 1,5 l/min, temperatura de 80°C, impactador encendido. La elución se realizó utilizando dos fases móviles en un programa de gradiente, a un caudal de 1,0 ml/min:

A: heptano / isopropanol / butanol / tetrahidrofurano / iso-octano / agua (64,5 / 17,5 / 7/5/5/1)

B: isopropanol / butanol / tetrahidrofurano / iso-octano / agua (73 / 7 / 5 / 5 / 10).

A ambas soluciones de elución se añadieron 77 µl de solución de amoniaco y 77 µl de ácido trifluoracético por litro de agua.

Programa de gradiente: linear desde 100% de A hasta 100% de B en 25 min, luego 100% de B durante 5 min, luego un gradiente lineal desde 100% de B a 100% de A durante 0,5 min, y finalmente 100% de A durante 5 min con un volumen de inyección de 20 µl y a una temperatura de columna de 80°C. Las referencias de los galactolípidos, fosfolípidos, por ejemplo monogalactosildiglicérido, monogalactosilmonoglicérido, digalactosildiglicérido, digalactosilmonoglicérido, fosfatidilcolina y lisofosfatidilcolina, se utilizaron para indicar el orden de elución de los diversos compuestos y calcular sus factores de respuesta y las cantidades presentes en la masa.

La composición de lípido de la masa varía entre los tipos de las cosechas de la harina. Aunque se utilizó un tipo de harina para todos los experimentos (Kolibri), los datos presentados en la Tabla 12 se obtuvieron utilizando harina de una cosecha diferente de los datos presentados en las Tablas 13-16.

Las cantidades de los lípidos polares principales en la masa completamente levada que contiene una muestra de control inicial de la cepa hospedante *A. niger* (Tabla 12) o que contiene diversas cantidades de L01 a L04 (Tabla 13-16), respectivamente, se presentan en comparación de las respectivas cantidades de lípido de la masa del blanco.

Los resultados descritos en la Tabla 12 muestran claramente que el sobrenadante de cultivo libre de células de la cepa hospedante *A. niger* (control) no tuvo ninguna influencia significativa sobre la composición de lípido de la masa polar en comparación con el blanco en la dosis alta ensayada.

De los resultados representados en las Tablas 13-16, se puede concluir de manera no ambigua que L01 a L04 convierten eficientemente los galactosildiglicéridos a galactosilmonoglicéridos, ya a la dosis más baja ensayada, con preferencia por los digalactosildiglicéridos en comparación con los monogalactosildiglicéridos, y también en comparación con fosfatidilcolina.

Está adicionalmente claro que el alto nivel de galactosilmonoglicérido en la masa a una dosis de 0,5-2,5 ppm (proteína Bradford) para L01 a L04 se correlaciona con el comportamiento de horneado descrito en el Ejemplo 5.

Tabla 12. Lípidos polares en una masa completamente levada (expresada como g por kg de masa liofilizada) con el sobrenadante libre de células de la cepa hospedante *A. niger* (control) o sin ninguna adición (blanco)

Dosis de proteína [ppm]	MGDG	MGMG	DGDG	DGMG	PC	LPC
0 (Blanco)	1,22	0,09	0,85	0,14	0,52	0,34
3 (Control)	1,19	0,12	0,85	0,10	0,55	0,36

MGDG = monogalactosildiglicérido; MGMG = monogalactosilmonoglicérido; DGDG = digalactosildiglicérido; DGMG = digalactosilmonoglicérido; PC = fosfatidilcolina; LPC = liso-fosfatidilcolina

Tabla 13. Lípidos polares en una masa completamente levada (expresada como g por kg de masa liofilizada) que contiene diversas cantidades de L01 (expresada como mg de proteína Bradford por kg de harina).

Dosis de L01 [ppm]	MGDG	MGMG	DGDG	DGMG	PC	LPC
0 (Blanco)	1,69	0,41	1,15	0,16	0,47	1,30
0,5	0,53	1,16	0,60	0,79	0,24	1,29
1,0	0,46	1,04	0,32	0,85	0,19	1,08

Dosis de L01 [ppm]	MGDG	MGMG	DGDG	DGMG	PC	LPC
2,5	0,54	0,91	0,16	0,99	0,14	1,07

MGDG = monogalactosildiglicérido; MGMG = monogalactosilmonoglicérido; DGDG= digalactosildiglicérido; DGMG = digalactosilmonoglicérido; PC = fosfatidilcolina; LPC = liso-fosfatidilcolina

Tabla 14. Lípidos polares en una masa completamente levada (expresada como g por kg de masa liofilizada) que contiene diversas cantidades de L02 (expresada como mg de proteína Bradford por kg de harina).

Dosis de L02 [ppm]	MGDG	MGMG	DGDG	DGMG	PC	LPC
0 (Blanco)	1,69	0,41	1,15	0,16	0,47	1,3
0,5	0,57	1,15	0,62	0,75	0,24	1,34
1,0	0,52	1,09	0,39	0,87	0,20	1,27
2,5	0,54	0,93	0,19	0,96	0,19	1,13

MGDG = monogalactosildiglicérido; MGMG = monogalactosilmonoglicérido; DGDG = digalactosildiglicérido; DGMG = digalactosilmonoglicérido; PC = fosfatidilcolina; LPC = liso-fosfatidilcolina

5 Tabla 15. Lípidos polares en una masa completamente levada (expresada como g por kg de masa liofilizada) que contiene diversas cantidades de L03 (expresada como mg de proteína Bradford por kg de harina).

Dosis de L03 [ppm]	MGDG	MGMG	DGDG	DGMG	PC	LPC
0 (Blanco)	1,69	0,41	1,15	0,16	0,47	1,3
0,5	0,64	1,14	0,66	0,73	0,26	1,27
1,0	0,52	1,10	0,36	0,87	0,21	1,23
2,5	0,51	0,94	0,16	0,95	0,20	1,11

MGDG = monogalactosildiglicérido; MGMG = monogalactosilmonoglicérido; DGDG = digalactosildiglicérido; DGMG = digalactosilmonoglicérido; PC = fosfatidilcolina; LPC = liso-fosfatidilcolina

Tabla 16. Lípidos polares en una masa completamente levada (expresada como g por kg de masa liofilizada) que contiene diversas cantidades de L04 (expresada como mg de proteína Bradford por kg de harina).

Dosis de L04 [ppm]	MGDG	MGMG	DGDG	DGMG	PC	LPC
0 (Blanco)	1,69	0,41	1,15	0,16	0,47	1,3
0,5	0,69	1,05	0,78	0,61	0,31	1,22
1,0	0,49	1,08	0,40	0,83	0,21	1,17
2,5	0,52	0,95	0,18	0,93	0,21	1,11

MGDG = monogalactosildiglicérido; MGMG monogalactosilmonoglicérido; DGDG digalactosildiglicérido; DGMG = digalactosilmonoglicérido; PC = fosfatidilcolina; LPC = liso-fosfatidilcolina

10

Lípidos apolares

Los lípidos apolares se extraen agitando vigorosamente masa completamente levada molida y liofilizada (véase el experimento de horneado de mini-barra alargada anterior) con heptano que contiene ácido acético al 1%. Después de la centrifugación, el sobrenadante claro se analiza en HPLC sobre Spherisorb S3CN (Phenomenex OOD-0097-EO; 100 x 4,6 mm), se detectan los componentes lipídicos mediante Evaporative Light Scattering (Alltech ELSD 2000ES), a un caudal de nitrógeno de 1,5 l/min, temperatura de 40°C, impactador apagado. La elución se realiza

15

utilizando dos fases móviles (A: heptano y B: terc-butil-metil éter que contiene ácido acético al 1%) en el siguiente programa de gradiente lineal, a un caudal de 1,0 ml/min, volumen de inyección 20 µl y temperatura ambiente de la columna:

Tiempo (mín)	A (%)	B (%)
0	98	2
3	98	2
15	80	20
27	0	100
32	0	100
32,1	98	2
40	98	2

- 5 Las referencias de tri-, di-, monoglicéridos y los ácidos grasos se utilizan para indicar el orden de elución de los varios componentes y calcular sus factores de respuesta y las cantidades presentes en la masa.

Ejemplo 7

Experimento de horneado - sustitución parcial de DATEM en una barra alargada a escala completa

- 10 Para algunas aplicaciones de horneado, puede ser beneficioso sustituir parcialmente DATEM por la enzima lipolítica de acuerdo con la invención, en lugar de sustituir completamente DATEM, como se describe en el Ejemplo 5. En este ejemplo, se analizó el efecto de las composiciones que comprenden DATEM y L01 y de las composiciones que comprenden DATEM y L02 sobre las propiedades de la masa y del producto horneado.

- 15 Con el fin de evaluar la cantidad de enzima lipolítica necesaria para sustituir la mitad del DATEM en una receta con 0,3% de DATEM, se estudió el comportamiento del horneado en la barra alargada a escala completa de las combinaciones de 0,15% de DATEM con diversas cantidades de sobrenadantes libres de células con al menos 2 mg/ml de proteína Bradford total, que contiene L01 o L02, respectivamente.

- 20 Los diversos efectos de las enzimas lipolíticas a diferentes dosis combinadas con 0,15% de DATEM, tanto sobre la masa como sobre el producto horneado final, se compararon con el blanco, es decir, un mendrugo que no contiene DATEM ni enzima lipolítica, y con mendrugos que contienen una concentración de DATEM total de 0,15% o 0,3%, respectivamente, o con mendrugos que contienen 0,25 ppm de L01 o L02.

La composición que comprende DATEM (Lametop 501) y L01 se ensayó utilizando la siguiente receta y proceso de barra alargada a escala completa:

- 25 se mezclaron 2000 g de harina (es decir, 1800 g de Kolibri™ y 200 g de Ibis™), 47 g de levadura comprimida, 40 g de sal, 88 ppm de ácido ascórbico, 3 ppm de Bakezyme® P500 (alfa-amilasa fúngica), 15 ppm de Bakezyme® HSP6000 (hemicelulasa fúngica) y 57% de agua en un mezclador Diosna durante 2 minutos a velocidad 1 y 71 Wh a velocidad 2, hasta una temperatura de masa final de 27°C. La masa se dividió en 6 piezas de 350 g, se redondeó y se levó durante 20 minutos a 32°C y 90% de humedad relativa. Posteriormente, las piezas de masa se moldearon y se conformaron y se levaron durante 90 minutos a 34°C a una humedad relativa del 90%. Las piezas de masa completamente levadas se grabaron y se hornearon en un horno a 240°C durante 30 minutos con adición de vapor inicial. Los lotes de harina utilizados en este ensayo se originaron de una cosecha diferente comparada con los lotes de harina utilizados en los Ejemplos 5 y 6. La mayor concentración de ácido ascórbico en este ensayo se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante para este lote de harina Kolibri.

La composición que comprende DATEM (Lametop) y L02 se ensayó utilizando la siguiente receta y proceso de barra alargada a escala completa:

- 35 se mezclaron 2000 g de harina (es decir, 1800 g de Kolibri™ y 200 g de Ibis™), 47 g de levadura comprimida, 40 g de sal, 68 ppm de ácido ascórbico, 2 ppm de Bakezyme® P500 (alfa-amilasa fúngica), 15 ppm de Bakezyme® HSP6000 (hemicelulasa fúngica) y 57% de agua en un mezclador Diosna durante 2 minutos a velocidad 1 y 71 Wh a velocidad 2, hasta una temperatura de masa final de 27°C. La masa se dividió en 6 piezas de 350 g, se redondeó y se levó durante 20 minutos a 32°C y 90% de humedad relativa. Posteriormente, las piezas de masa se moldearon y se conformaron y se levaron durante 100 minutos a 34°C a una humedad relativa del 90%. Las piezas de masa completamente levadas se grabaron y se hornearon en un horno a 240°C durante 30 minutos con adición de vapor inicial. De nuevo, el lote de harina utilizado en este ensayo se originó de una cosecha

diferente en comparación con los lotes de harina utilizados para la composición que comprende L01 y con los lotes de harina utilizados en los Ejemplos 5 y 6.

5 Los resultados de las composiciones que comprenden DATEM y L01 se dan en la Tabla 17, mientras que los resultados de las composiciones que comprenden DATEM y L02 se dan en la Tabla 18. Las características del pan y la masa se evalúan como se describe en el Ejemplo 5.

Tabla 17. Comportamiento de horneado de las composiciones de la enzima lipolítica L01 (dadas como ppm, es decir, mg de proteína total por kg de harina (determinadas de acuerdo con Bradford)) y DATEM (dado como %, es decir, g DATEM por 100 g de harina)

L01 [ppm]	0	0	0,04	0,08	0,12	0	0,25
DATEM (%)	0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,3	0
Volumen (%)	100	113	124	123	121	120	121
Extensibilidad de la masa	3	3	4	4	4	4	4
Estabilidad de la masa	1	2	2	4	5	4	4
Crecimiento en el horno	1	2	2	4	5	3	4
Estructura de la miga	1	2	3	4	5	4	4
Color de la miga	2	2	3	4	5	4	4

10 Tabla 18. Comportamiento de horneado de las composiciones de la enzima lipolítica L02 (ppm, es decir, mg de proteína total por kg de harina (determinadas de acuerdo con Bradford)) y DATEM (dado como %, es decir, g DATEM por 100 g de harina)

L02 [ppm]	0	0	0,04	0,07	0,10	0	0,25
DATEM (%)	0	0,15	0,15	0,15	0,15	0,3	0
Volumen (%)	100	118	125	123	130	127	124
Extensibilidad de la masa	3	3	4	4	4	3	4
Estabilidad de la masa	1	2	2	4	5	3	4
Crecimiento en el horno	1	2	3	4	5	4	4
Estructura de la miga	1	2	3	4	5	4	4
Color de la miga	2	2	3	4	5	4	4

15 Estos resultados muestran claramente, que una composición que comprende 0,15% de DATEM y 0,08 ppm de L01 o 0,07 ppm de L02, respectivamente, fue efectiva sustituyendo 0,3% de DATEM, conduciendo a una estabilidad de la masa, volumen de mendrugo, crecimiento en el horno, estructura de la miga y color de la miga comparables. Una dosis mínima de 0,25 ppm de L01 o L02, respectivamente, puede ser suficiente para sustituir 0,3% de DATEM, como también se muestra en el Ejemplo 5. De manera sorprendente, una combinación de aproximadamente la mitad de la dosis L01 (0,12 ppm) o la mitad de la dosis L02 (0,10 ppm), respectivamente, con la mitad de la dosis de DATEM (0,15% de DATEM) mostró una mejora de la estabilidad de la masa, estructura de la miga y crecimiento en el horno en comparación con 0,3% de DATEM solo y en comparación con 0,25 ppm de L01 sola o 0,25 ppm de L02 sola, respectivamente. Esto indica que las composiciones que comprenden DATEM y las enzimas lipolíticas L01 y L02 de acuerdo con la invención muestran un efecto sinérgico.

Ejemplo 8

25 Efecto de una enzima lipolítica de la invención en la torta Victoria

Las enzimas lipolíticas se pueden utilizar en recetas de tortas para mejorar por ejemplo la estabilidad de la emulsión de la masa de cocinar. Aquí, se ensayó la L01 para determinar su efecto en la torta Victoria.

Las tortas Victoria se prepararon utilizando un mezclador Hobart provisto de una mezcladora batidora plana, como sigue:

1. mézclase la mantequilla sin sal, 19%, y azúcar, 21%.
2. añádanse los ingredientes secos:
 - 5 - harina de torta tratada con calor (Albatros, Meneba), 30%; levadura en polvo (SAPP 15), 0,4%; bicarbonato de sodio, 0,3%; leche en polvo, 0,4%; sal, 0,13% y L01, como se indicó en la tabla 19
- y mézclase
3. añádanse los ingredientes líquidos durante el mezclamiento:
 - huevos completos, 23% (p/p), agua, 3,6% (p/p), 19% (p/p), glicerina, 2,1% (p/p),
- 10 4. ráspese el tazón y mézclase a la velocidad más alta durante 2 minutos.

Los porcentajes de los ingredientes se dan en % (p/p) en peso de la masa de cocinar final.

Las dosis de L01 se dan en ppm, es decir, la proteína Bradford (mg) con relación a la masa de los huevos líquidos completos (kg) en la receta del blanco.

- 15 Las masas de cocinar, peso final de la masa de cocinar 1496 g, se escalaron hasta 300 gramos de peso de masa de cocinar por bandeja (diámetro 13 cm) y se hornearon hasta 165/170°C durante 45 min.

Los diversos efectos de L01, tanto sobre la masa de cocinar como la torta final, se compararon con un blanco, es decir, una masa de cocinar/torta que no contiene la enzima lipolítica L01.

La densidad específica de la masa de cocinar, es decir, el peso de masa de cocinar por volumen de la masa de cocinar (g/l), se midió determinando el peso de un volumen definido de masa de cocinar (aquí 300 ml).

- 20 Los volúmenes de las tortas se determinaron mediante un analizador de volumen de pan automatizado (BVM-3, TexVol Instruments), la torta se pesó y se calculó el volumen específico de la torta (ml/g). El volumen específico de la torta de la torta del blanco se definió como 100%.

- 25 Las tortas se almacenaron una por una en bolsas de polietileno a temperatura ambiente. La firmeza y elasticidad de la miga, 8 y 18 días después del horneado, se midieron utilizando un analizador de texturas SMS TAX2 (Stable Microsystems), utilizando una sonda cilíndrica de 4 cm. Por torta, se midieron cuatro porciones, tomadas del centro de la torta. La sonda se empujó 10 mm en una porción de torta, y la resistencia se registró directamente después de 30 segundos. Los valores relativos (disminución porcentual) representan la elasticidad, la capacidad del producto a coparse con esfuerzo. El valor absoluto en t=0 representa la firmeza.

- 30 La homogeneidad de poro de la miga se evaluó visualmente por un panadero experimentado sobre una escala relativa de 1 a 10: 1 estructura de la miga irregular, heterogénea, a 10 estructura de la miga uniforme, homogénea.

El diámetro del poro de la miga se evaluó visualmente por un panadero experimentado sobre una escala relativa de 1 a 10: 1 = muy grande (estructura de la miga abierta) a 10 = muy pequeño (estructura de la miga muy fina).

Tabla 19. Comportamiento de la enzima lipolítica L01 en la torta Victoria

	Días después del horneado		
L01 [ppm (mg de proteína / kg de huevo líquido completo)]		0	3,29
Densidad específica de la masa de cocinar [g/l]		963	940
Volumen específico de la torta [%]	1	100	110
Homogeneidad de poro de la miga	1	5	8
Diámetro de poro de la miga	1	5	8
Firmeza de la miga	1	1247	907
	8	1703	1223
	18	2324	1556

Elasticidad de la miga	1	47	46
	8	43	43
	18	42	41

5 La adición de L01 dio como resultado una densidad disminuida de la masa de cocinar, un volumen mayor de la torta, una miga más homogénea con poros más pequeños, y una firmeza de la miga reducida tanto inicialmente como durante el periodo de caducidad con relación a la torta del blanco. No se observaron diferencias significativas en la elasticidad de la miga para las tortas ensayadas.

10 Estos resultados muestran claramente que las enzimas lipolíticas de la invención mejoraron la estabilización de la emulsión de la masa de cocinar de la torta, dando como resultado una calidad de la torta total mejorada. Estos resultados también muestran que las enzimas lipolíticas de la invención no son solamente funcionales a la hora de sustituir los emulsionantes tales como por ejemplo DATEM o SSL/CSL en recetas de pan, sino también en recetas de torta libres de emulsionantes, como la adición de la enzima lipolítica de la invención, que dio como resultado un volumen de torta creciente, un efecto que se puede obtener añadiendo emulsionantes tales como monoestearato de glicerol, y una suavidad de torta creciente, un efecto que se obtiene usualmente añadiendo emulsionantes tales como monoglicéridos.

Ejemplo 9

15 Efecto de una enzima lipolítica de la invención sobre la masa de cocinar y las propiedades de la miga en una torta de esponja con menos huevos

20 La reducción de los huevos en recetas de torta de esponja da como resultado una torta firme y desmigajada con una estructura de la miga pobre, abierta. Se pueden utilizar enzimas lipolíticas para mejorar la calidad total de la torta en tales recetas de torta con menos huevos. Aquí, se ensayó el efecto de L01 sola y en combinación con fosfolipasa A en torta de esponja con menos huevos.

25 Como fosfolipasa, se utilizó Cakezyme™ (DSM Food Specialties, Pises Bajos), una fosfolipasa A2 producida en *A. niger* que contiene 5000 CPU/g. La actividad de fosfolipasa se determinó utilizando rac 1,2-dioctanoilditio fosfatidilcolina como sustrato, la reacción se siguió espectrofotométricamente a 405 nm, y la actividad se expresó en unidades de fosfolipasa cromogénicas: 1 CPU (Unidad de Fosfolipasa Cromogénica) se normalizó a 1 EYU (Unidad de Yema de Huevo), que se definió como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de ácido por minuto de yema de huevo a 40°C y pH 8,0.

Las tortas de esponja se prepararon utilizando un mezclador Hobart provisto de un mezclador con vara de alambre, como sigue:

- ingredientes en % (p/p) en peso de masa de cocinar final:

30 azúcar, 25%; harina de torta tratada con calor (Albatros, Meneba), 21%; levadura en polvo (SAPP 28), 0,6%; almidón de trigo, 8,3%; emulsionante (BV40), 3,3%; bicarbonato de sodio, 0,4%; huevo completo (para una masa de cocinar de referencia con todos los huevos: 30%, para una masa de cocinar con menos huevos: 24%); agua (para una masa de cocinar de referencia con todos los huevos: 11,4%, para una masa de cocinar con menos huevos: 17,4 %)

- 35
1. mézclense todos los ingredientes, incluyendo las cantidades respectivas de L01 y/o fosfolipasa A, como se indica en la tabla 20, durante 1 min a velocidad 1
 2. mézclese durante 5 minutos a velocidad 3
 3. mézclese durante 1 minuto a velocidad 1

40 Las masas de cocinar, peso de masa de cocinar final 848 g, se escaló hasta 400 g de peso de masa de cocinar por bandeja (diámetro 28 cm) y se hornearon a 180/180°C durante 25 min.

Las dosis de L01 se dan en ppm, es decir, proteína Bradford (mg) con relación a la masa del huevo líquido completo (kg) en la masa de cocinar de referencia con todos los huevos, dosis de fosfolipasa A en % Cakezyme™ (producto) en peso con respecto a la masa del huevo líquido completo en la masa de cocinar de referencia con todos los huevos.

45 La estructura de la miga de la torta se evaluó visualmente por un panadero experto sobre una escala relativa de 1 a 10: 1 = estructura de la miga abierta/irregular con unas paredes de celda más gruesas a 10 = estructura de la miga muy fina/uniforme con paredes de celda más delgadas.

Aquí la suavidad de la miga se juzgó visualmente con las calificaciones relativas 1: muy firme a 10: muy suave.

La cohesividad de la miga se juzgó manualmente con calificaciones relativas 1: muy desmigajado a 10: cohesivo.

Tabla 20. Comportamiento de la enzima lipolítica L01, fosfolipasa A y su combinación en una torta de esponja con menos huevos en comparación con la torta de esponja con todos los huevos

	Referencia con todos los huevos	Con menos huevos*			
L01 [ppm (mg de proteína / kg de huevo líquido completo)]	0	0	0,23	0	0,23
Fosfolipasa A [% en peso de Cakezyme / peso de huevos]	0	0	0	0,04	0,04
Estructura de la miga	5	3	7	6	9
Suavidad de la miga (4 días después del horneado)	6	3	5	7	10
Cohesividad de la miga	9	5	8	7	9
*20% menos huevos completos que para la referencia con todos los huevos					

5

La reducción de huevos en 20% y la compensación del peso de masa de cocinar correspondiente por agua dio como resultado una viscosidad disminuida de la masa de cocinar, una suavidad de la miga disminuida, una estructura de la miga más pobre y una cohesividad disminuida de la miga en comparación con la referencia con todos los huevos.

10 Al añadir la fosfolipasa A a la masa de cocinar con huevos reducidos, la viscosidad de la masa de cocinar se restableció al nivel de la masa de cocinar con todos los huevos, la suavidad de la miga y la cohesividad se mejoraron considerablemente en comparación con la torta con menos huevos, y la estructura de la miga se mejoró ligeramente en comparación con la torta con todos los huevos.

15 La adición de L01 a la masa de cocinar con menos huevos dio como resultado una viscosidad de la masa de cocinar ligeramente mejorada y una estructura de la miga más fina en comparación con la referencia con todos los huevos, y se mejoró la suavidad de la miga y, especialmente, se mejoró la cohesividad de la miga en comparación con la referencia con menos huevos.

20 De manera sorprendente, la adición de una composición que comprende L01 y fosfolipasa A a la masa de cocinar de la torta con menos huevos mejoró adicionalmente aún la viscosidad de la masa de cocinar, la estructura de la miga y la suavidad de la miga en comparación con las recetas con todos los huevos y con menos huevos, en las cuales se añadieron L01 o fosfolipasa A, y se restableció la cohesividad de la miga al nivel de la torta con todos los huevos.

De estos resultados está claro que la adición de la enzima lipolítica de la invención sola o en combinación con la fosfolipasa A mejora las propiedades globales de la torta con menos huevos. En una receta con una torta con menos huevos, se puede lograr aún una mejor suavidad y estructura de la miga que en la torta con todos los huevos cuando la enzima lipolítica de la invención se añade sola y especialmente en combinación con fosfolipasa A.

25 **Ejemplo 10**

El efecto de una enzima lipolítica de la invención sobre el tostado de la masa laminada

30 Se obtuvo masa laminada a partir de 1000 g de harina Edellewiss, 430 g de agua, 100 g de huevos, 50 g de levadura, 20 g de sal, 10 g de azúcar, 15 g de mejorador de pan y L01. L01 se dosificó a 0,23 ppm, es decir, mg de la proteína, determinado de acuerdo con Bradford, por kg de harina. La referencia no tuvo enzima. Después de reposar adecuadamente, la masa se desenrolló en una capa. Una capa de margarina laminante (Trio Korst, Unipro, Bergen op Zoom, Países Bajos) se dobló en la lámina de masa. Esta se enrolló entonces en una masa laminada, en un procedimiento estándar. Se cortaron cintas de la masa final y se doblaron en hojaldres en forma de mariposa y se hornearon en un horno a 235°C durante 20 minutos. Los productos se ensayaron después de dos días de almacenamiento en una vitrina semi-cerrada. Los ensayos mecánicos se llevaron a cabo utilizando un analizador de texturas (TA-XT Plus, Stable Micro systems Ltd., Surrey, UK). Al menos 10 hojaldres de la referencia y el producto con L01 añadida se caracterizaron utilizando una sonda de cuña de 25 mm a una velocidad de 1 mm/seg después de 2 días de almacenamiento.

40 Se analizó la curva de fuerza frente a distancia de compresión y se obtuvieron parámetros a partir de la curva de compresión utilizando un macro del Software de Análisis de Textura. De StatGraphics (análisis estadístico y software de modelamiento) se obtuvo una gráfica de dispersión para determinar las diferencias estadísticamente significativas entre los hojaldres de referencia y los hojaldres que contienen L01. Los resultados de los experimentos de

compresión después de 2 días de almacenamiento a condiciones ambiente se presentan en la Tabla 21. Se encontraron diferencias significativas en cinco parámetros de textura entre la referencia y los productos preparados con L01. Además, se encontró que los productos con L01 son más fáciles de moldear que los de la referencia.

Tabla 21. Características de tostado en productos horneados laminados después de 2 días de almacenamiento a condiciones ambiente.

5

	Referencia	L01
Distancia (mm)	14,3 ± 1,6	6,5 ± 1,1
Fuerza de primer pico (g)	1390 ± 273	1273 + 945
Pendiente (g/s)	159 ± 67	998 ± 498
Fuerza del pico más alto (g)	1419 + 285	4207 + 1207
Area (g*s)	1416 ± 3165	23908 ± 8214
Número de eventos de fracción	0	9 ± 5

Esto muestra que los productos horneados laminados preparados con una enzima lipolítica de acuerdo con la invención son más crujientes después de dos días de almacenamiento en condiciones ambiente que los productos preparados sin enzima.

10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DSM IP Assets B.V.

<120> LIPASAS NOVEDOSAS Y USOS DE LOS MISMOS

<130> 24925WO

<160> 8

15 <170> PatentIn versión 3.2

<210> 1

<211> 1038

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> ADN gen de lipasa L01

<400> 1

ES 2 429 492 T3

atgcttctcc tctccctcct ctccattgto accctcctg ttgcttctcc tctgtccggt 60
gaggagtacg ccaaggccct cgaggagcgt gcctgcaccg tctctctcctc cgagctcaac 120
aacttcaagt totacatcca gcacgggtgt gctgcctact gcaactccga gactgctgct 180
ggtgccaacg tcacctgcac tggcaacgct tgccccgaga ttgaggccaa cgggtgcacc 240
gttgttgctt ccttctactg tacciaagact ggtatcgggtg gctacgtctc caccgacaac 300
accaacaagg agatcgtcct ttctttccgt ggcagcatca acatccgcaa ctgggtgacc 360
aacctggact tgggccagga tgactgctct ctgacctccg gctgoggtgt ccactccggt 420
ttccagcgtg cctgggagga gattgcccac aacctgaccg ctgctgttgc caaggccaag 480
actgccaacc ccgactacaa ggttgttgcc actggccaact cctgggtgg tgctgttgcc 540
accctggctg gtgccaacct ccgtgctgct ggtaccccc togacatcta cacctacggc 600
tctccccgtg tgggcaacgc cgagcttctt gaggttcatct ccaaccagac tgggtggtgag 660
ttccgtgtca cccacgggtga tgacctcgtc ccccgctctc ctctctgat ctccggctac 720
cgccacacct cccccgagta ctggctcgat ggcagcgggtg gtgacaagat caactacacc 780
atcaacgaca tcaaggctctg cgagggtgct gccaacctgc agtgcaacgg tggtaacctg 840
ggctctgaca ttgtgtctca cctgcactac tcccaggcca ctgatgctg caacgccggt 900
ggtttcagct ggcgcgcgta ccgctctgct gagagcgttg acaagcgtgc caccatgact 960
gatgctgagc tcgagaagaa gctcaacagc tacgtgcaga tggacaagga gtacgtcaag 1020
aacaaccagg ctgctcc 1038

<210> 2

<211> 346

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína de lipasa L01

<400> 2

ES 2 429 492 T3

Met Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser Ile Val Thr Leu Ala Val Ala Ser
 1 5 10 15

Pro Leu Ser Val Glu Glu Tyr Ala Lys Ala Leu Glu Glu Arg Ala Val
 20 25 30

Thr Val Ser Ser Ser Glu Leu Asn Asn Phe Lys Phe Tyr Ile Gln His
 35 40 45

Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Thr Ala Ala Gly Ala Asn Val
 50 55 60

Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Ile Glu Ala Asn Gly Val Thr
 65 70 75 80

Val Val Ala Ser Phe Thr Gly Thr Lys Thr Gly Ile Gly Gly Tyr Val
 85 90 95

Ser Thr Asp Asn Thr Asn Lys Glu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser
 100 105 110

Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln Asp Asp
 115 120 125

Cys Ser Leu Thr Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln Arg Ala
 130 135 140

Trp Glu Glu Ile Ala Asp Asn Leu Thr Ala Ala Val Ala Lys Ala Lys
 145 150 155 160

Thr Ala Asn Pro Asp Tyr Lys Val Val Ala Thr Gly His Ser Leu Gly
 165 170 175

Gly Ala Val Ala Thr Leu Ala Gly Ala Asn Leu Arg Ala Ala Gly Thr
 180 185 190

ES 2 429 492 T3

Pro Leu Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Ala Glu
 195 200 205

Leu Ala Glu Phe Ile Ser Asn Gln Thr Gly Gly Glu Phe Arg Val Thr
 210 215 220

His Gly Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe Gly Tyr
 225 230 235 240

Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Asp Gly Ser Gly Gly Asp Lys
 245 250 255

Ile Asn Tyr Thr Ile Asn Asp Ile Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Asn
 260 265 270

Leu Gln Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala His Leu
 275 280 285

His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp
 290 295 300

Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr
 305 310 315 320

Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys
 325 330 335

Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser
 340 345

<210> 3

<211> 1038

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN gen de lipasa L02

<400> 3

atgcttctcc tctccctcct ctccattgtc accctogctg ttgcttctcc tetgtccggt 60

gaggagtagc ccaaggccct cgaggagcgt gccgtaccg tctcctcctc cgagctcaac 120

aacttcaagt tctacatcca gcacggtgct gctgcctact gcaactccga gactgtgtct 180

ES 2 429 492 T3

ggtgcccaagg tcacctgctc caacaacggc tgccccgagg ttgaggccaa cgggtgtcacc 240
 gttgttgccct ccttcgtcgg taccaagacc ggtatcgggtg gctacgtggc caccgacaac 300
 gcccgcaagg agatcgtcct ctccctccgt ggcagcatca acatccgcaa ctggctgacc 360
 aacctggact tcggccagga ggactgctct ctgacctccg gctgcggtgt ccactccggt 420
 ttccagcgtg cctgggagga gattgccgac aacttgactg ctgctgttgc caaggccaag 480
 actgccaaacc ccgactacaa ggtcgtcagc actggccaact ctcttggtgg tgctgttgc 540
 accctggctg ctgccaacct ccgtgtcggc ggtactcctc ttgacatcta cacctacggc 600
 tctccccgtg tcggcaacgc cgagctctcc gctttcgtct ccaaccagac tgggtgtgag 660
 ttccgtgtca cccacggtga tgaccccgtc ccccgctctc ctctctgat cctcggtac 720
 cgccacacct cccccgagta ctggctcgat ggcagcgggtg gtgacaaggt cgactacacc 780
 atcaacgaca tcaaggtctg cgagggtgct gccaacctgc agtgcaacgg tggtaacctg 840
 ggtctcgaca ttgctgctca cctgcactac ttccaggcca ctgatgectg caacgccggt 900
 ggtttcagct ggcgcgcta ccgctctgct gagagcgttg acaagcgtgc caccatgact 960
 gatgctgagc tcgagaagaa gctcaacagc tacgtgcaga tggacaagga gtacgtcaag 1020
 aacaaccagg ctcgctcc 1038

<210> 4

<211> 346

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína de lipasa L02

<400> 4

Met Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser Ile Val Thr Leu Ala Val Ala Ser
 1 5 10 15

Pro Leu Ser Val Glu Glu Tyr Ala Lys Ala Leu Glu Glu Arg Ala Val
 20 25 30

Thr Val Ser Ser Ser Glu Leu Asn Asn Phe Lys Phe Tyr Ile Gln His
 35 40 45

Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Thr Ala Ala Gly Ala Lys Val
 50 55 60

ES 2 429 492 T3

Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Glu Val Glu Ala Asn Gly Val Thr
 65 70 75 80
 Val Val Ala Ser Phe Val Gly Thr Lys Thr Gly Ile Gly Gly Tyr Val
 85 90 95
 Ala Thr Asp Asn Ala Arg Lys Glu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser
 100 105 110
 Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln Glu Asp
 115 120 125
 Cys Ser Leu Thr Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln Arg Ala
 130 135 140
 Trp Glu Glu Ile Ala Asp Asn Leu Thr Ala Ala Val Ala Lys Ala Lys
 145 150 155 160
 Thr Ala Asn Pro Asp Tyr Lys Val Val Ser Thr Gly His Ser Leu Gly
 165 170 175
 Gly Ala Val Ala Thr Leu Ala Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly Gly Thr
 180 185 190
 Pro Leu Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Ala Glu
 195 200 205
 Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Thr Gly Gly Glu Phe Arg Val Thr
 210 215 220
 His Gly Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe Gly Tyr
 225 230 235 240
 Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Asp Gly Ser Gly Gly Asp Lys
 245 250 255
 Val Asp Tyr Thr Ile Asn Asp Ile Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Asn
 260 265 270
 Leu Gln Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala His Leu
 275 280 285
 His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp

ES 2 429 492 T3

290	295	300
Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr		
305	310	315
Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys		
	325	330
		335
Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser		
	340	345

<210> 5

<211> 1038

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN gen de lipasa L03

<400> 5

```

atgcttctcc tctccctcct ctccattgtc accctogctg ttgcttctcc tctgtccgtt      60
gaggagtacg ccaaggccct cgaggagcgt gccgtcaccg tctcctcctc cgagctcaac      120
aacttcaagt tctacatcca gcacgggtgt gctgctact gcaactccga gactgctgct      180
ggtgccaagg tcacctgctc tggcaacggc tgcoccgagg ttgaggccaa cgggtgcacc      240
gttggttgcct ccttcaccgg taccaagacc ggtatcgggt gctacgtggc caccgacaac      300
gcccgcaagg agatcgtcct ctcttccgl ggcagcalca acatccgcaa ctggctgacc      360
aacctggact tcggccagga tgactgctct ctgacctcog gctgcgggtgt ccaactccgt      420
ttccagcgtg cctgggagga gattgcgcac aacttgactg ctgctgttgc caaggccaag      480
actgccaacc ccgactacaa ggtcgtcgcc actggccact cctgggtgg tgctgttgcc      540
accctggctg gtgccaacct cgtgtcggg ggtactctc ttgacatcta cacctacggc      600
tctccccgtg tcggcaacgc cgagcttget gctttcgtct ccaaccagac tgggtgtgag      660
ttcctgtgca ccaacgggtga tgaccccgtc ccccgcttc ctctctgat ctccggtac      720
cgccacacct cccccgagta ctggctcgat ggcagcgggt gtgacaagat cgactacacc      780
atcaacgaca tcaaggctct cgagggtgct gccaacctgc agtgcaacgg tggtaacctg      840
ggtctcgaca ttgtgctca cctgcactac ttccaggcca ctgatgctg caacgcgggt      900
ggtttcagct ggcccgcta ccgctctgct gagagcgttg acaagcgtgc caccatgact      960
gatgctgagc tcgagaagaa gctcaacagc tacgtgcaga tggacaagga gtacgtcaag     1020

```

ES 2 429 492 T3

aacaaccagg ctcgctcc

1038

<210> 6

<211> 346

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína de lipasa L03

<400> 6

Met Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser Ile Val Thr Leu Ala Val Ala Ser
1 5 10 15

Pro Leu Ser Val Glu Glu Tyr Ala Lys Ala Leu Glu Glu Arg Ala Val
20 25 30

Thr Val Ser Ser Ser Glu Leu Asn Asn Phe Lys Phe Tyr Ile Gln His
35 40 45

Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Thr Ala Ala Gly Ala Lys Val
50 55 60

Thr Cys Ser Gly Asn Gly Cys Pro Glu Val Glu Ala Asn Gly Val Thr
65 70 75 80

Val Val Ala Ser Phe Thr Gly Thr Lys Thr Gly Ile Gly Gly Tyr Val
85 90 95

Ala Thr Asp Asn Ala Arg Lys Glu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser
100 105 110

Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln Asp Asp
115 120 125

Cys Ser Leu Thr Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln Arg Ala
130 135 140

Trp Glu Glu Ile Ala Asp Asn Leu Thr Ala Ala Val Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Thr Ala Asn Pro Asp Tyr Lys Val Val Ala Thr Gly His Ser Leu Gly
165 170 175

ES 2 429 492 T3

Gly Ala Val Ala Thr Leu Ala Gly Ala Asn Leu Arg Val Gly Gly Thr
 180 185 190

Pro Leu Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Ala Glu
 195 200 205

Leu Ala Ala Phe Val Ser Asn Gln Thr Gly Gly Glu Phe Arg Val Thr
 210 215 220

His Gly Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe Gly Tyr
 225 230 235 240

Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Asp Gly Ser Gly Gly Asp Lys
 245 250 255

Ile Asp Tyr Thr Ile Asn Asp Ile Lys Val Cys Glu Gly Ala Ala Asn
 260 265 270

Leu Gln Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala His Leu
 275 280 285

His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp
 290 295 300

Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr
 305 310 315 320

Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys
 325 330 335

Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser
 340 345

<210> 7

<211> 1038

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> ADN gen de lipasa L04

<400> 7

atgcttctec tctccctcct ctccattgtc accctcgctg ttgcttctcc tctgtccggt 60

gaggagtaag ccaaggccct cgaggagcgt gccgtcaccg tctcctcctc cgagctcaac 120

ES 2 429 492 T3

aacttcaagt tctacatcca gcaacggtgct gctgcctact gcaactccga gactgctgct 180
 ggtgccaaacg tcacctgctc tggcaacggc tggcccagag ttgaggccaa cgggtgcacc 240
 gttggttgct ccttcaccgg taccaagacc ggtatcggtg gctacgtcgc cacogacaac 300
 gcccgaagg agatcgtcct ctcttccgt ggcagcatca acatccgcaa ctggetgacc 360
 aacctggact tcggccagga tgactgctct ctgacctccg gctgcggtgt ccaactccgt 420
 ttccagcgtg cctgggagga gattgccgac aacttgactg ctgctgttgc caaggccaag 480
 actgccaaac cgcactacaa ggttgttggc actggccact ctcttgggtg tgctgttggc 540
 actctggctg gtgccaaact ccgtgtcggg ggtaccccc tcgacatcta cacctacggc 600
 tctctcgtg tcggcaacgc cgagcttct gcttctctt ccaaccaggc tgggtgtgag 660
 ttccgtgtca cccacggtga tgacccctc ccccgcttc ctctctgat ctteggctac 720
 cggcacacct ccccgagta ctggctgat ggcagcggtg gtgacaagat cgaactaccc 780
 atcaacgaca tcaaggtctg cgagggtgct gccaacctgc agtgcaacgg tggaccctg 840
 ggtctcgaca ttgctgtca cctgcactac ttccaggcca ctgatgcctg caacgccggt 900
 ggttctagct ggcgcgcta ccgctctgct gagagcgttg acaagcgtgc caccatgact 960
 gatgctgagc tcgagaagaa gctcaacagc tacgtgcaga tggacaagga gtacgtcaag 1020
 aacaaccagg ctgctcc 1038

<210> 8

<211> 346

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína de lipasa L04

<400> 8

Met Leu Leu Leu Ser Leu Leu Ser Ile Val Thr Leu Ala Val Ala Ser
 1 5 10 15

Pro Leu Ser Val Glu Glu Tyr Ala Lys Ala Leu Glu Glu Arg Ala Val
 20 25 30

Thr Val Ser Ser Ser Glu Leu Asn Asn Phe Lys Phe Tyr Ile Gln His
 35 40 45

Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Thr Ala Ala Gly Ala Asn Val

ES 2 429 492 T3

50																			
Thr	Cys	Ser	Gly	Asn	Gly	Cys	Pro	Glu	Val	Glu	Ala	Asn	Gly	Val	Thr				
65					70					75					80				
Val	Val	Ala	Ser	Phe	Thr	Gly	Thr	Lys	Thr	Gly	Ile	Gly	Gly	Tyr	Val				
				85					90					95					
Ala	Thr	Asp	Asn	Ala	Arg	Lys	Glu	Ile	Val	Leu	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser				
			100					105					110						
Ile	Asn	Ile	Arg	Asn	Trp	Leu	Thr	Asn	Leu	Asp	Phe	Gly	Gln	Asp	Asp				
			115				120					125							
Cys	Ser	Leu	Thr	Ser	Gly	Cys	Gly	Val	His	Ser	Gly	Phe	Gln	Arg	Ala				
	130					135					140								
Trp	Glu	Glu	Ile	Ala	Asp	Asn	Leu	Thr	Ala	Ala	Val	Ala	Lys	Ala	Lys				
145					150					155					160				
Thr	Ala	Asn	Pro	Asp	Tyr	Lys	Val	Val	Ala	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly				
				165					170					175					
Gly	Ala	Val	Ala	Thr	Leu	Ala	Gly	Ala	Asn	Leu	Arg	Val	Gly	Gly	Thr				
			180					185					190						
Pro	Leu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Ala	Glu				
		195					200					205							
Leu	Ala	Ala	Phe	Val	Ser	Asn	Gln	Ala	Gly	Gly	Glu	Phe	Arg	Val	Thr				
	210					215					220								
His	Gly	Asp	Asp	Pro	Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Leu	Ile	Phe	Gly	Tyr				
225					230					235					240				
Arg	His	Thr	Ser	Pro	Glu	Tyr	Trp	Leu	Asp	Gly	Ser	Gly	Gly	Asp	Lys				
				245					250					255					
Ile	Asp	Tyr	Thr	Ile	Asn	Asp	Ile	Lys	Val	Cys	Glu	Gly	Ala	Ala	Asn				
			260					265					270						
Leu	Gln	Cys	Asn	Gly	Gly	Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Ile	Ala	Ala	His	Leu				
		275					280					285							

ES 2 429 492 T3

His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe Ser Trp
290 295 300

Arg Arg Tyr Arg Ser Ala Glu Ser Val Asp Lys Arg Ala Thr Met Thr
305 310 315 320

Asp Ala Glu Leu Glu Lys Lys Leu Asn Ser Tyr Val Gln Met Asp Lys
325 330 335

Glu Tyr Val Lys Asn Asn Gln Ala Arg Ser
340 345

REIVINDICACIONES

1. Un polinucleótido aislado que codifica una enzima lipolítica, que comprende:
 - (a) la secuencia nucleotídica como se establece en la SEC ID NO: 1; o
 - 5 (b) una secuencia nucleotídica que tiene al menos 90% de identidad con la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 1 y en la que la enzima lipolítica codificada por la secuencia nucleotídica tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18; o
 - 10 (c) una secuencia nucleotídica que se hibrida con un polinucleótido que es el complemento de la SEC ID NO: 1 y en la que dicha secuencia nucleotídica es al menos 90% de identidad con la secuencia nucleotídica de la SEC ID NO: 1 y en la que la enzima lipolítica codificada por la secuencia nucleotídica tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18; o
 - 15 (d) una secuencia nucleotídica que codifica los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2; o
 - 20 (e) una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90% de identidad con los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2 que tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18; o
 - 25 (f) una secuencia que es degenerada como resultado de la degeneración del código genético para una secuencia como se define en uno cualquiera de (a) a (e) y en la que la enzima lipolítica codificada por la secuencia nucleotídica tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18.
2. Un polinucleótido aislado que comprende una secuencia nucleotídica que es el complemento de cualquier secuencia nucleotídica como se expone en la reivindicación 1.
3. Un polinucleótido aislado según la reivindicación 1, que se produce sintéticamente.
- 30 4. Un polinucleótido aislado según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, teniendo dicho polinucleótido una secuencia nucleotídica de acuerdo con la SEC ID NO: 3 o de acuerdo con la SEC ID NO: 5 o de acuerdo con la SEC ID NO: 7.
5. Un polinucleótido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 3, que se hibrida bajo condiciones muy restrictivas con una secuencia nucleotídica que es el complemento de la SEC ID NO: 1.
- 35 6. Un vector que comprende una secuencia polinucleotídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Un vector según la reivindicación 6, que es un vector de expresión en el que la secuencia polinucleotídica según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 está operablemente ligada a al menos una secuencia reguladora que permite la expresión de la secuencia polinucleotídica en una célula hospedante adecuada.
8. Un vector según la reivindicación 7, en el que la célula hospedante adecuada es un hongo filamentoso.
- 40 9. Una célula hospedante recombinante, que comprende un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o que comprende un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8.
10. Una célula hospedante recombinante según la reivindicación 9, capaz de expresar o sobreexpresar dicho polinucleótido o vector.
- 45 11. Un método para fabricar un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, que comprende las etapas de cultivar una célula hospedante transformada con dicho polinucleótido o dicho vector y aislar dicho polinucleótido o dicho vector a partir de dicha célula hospedante.
12. Un polipéptido aislado que tiene actividad lipolítica, que comprende:
 - 50 (a) una secuencia de aminoácidos que codifica los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2; o

(b) una secuencia nucleotídica al menos 90% idéntica a los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 2 que tiene una mayor especificidad hacia la liberación de ácidos grasos libres que contienen C4 a C10 a partir de una composición láctea que comprende grasa de leche y/u otra grasa si se compara con la liberación de ácidos grasos libres que contienen C12 a C18.

- 5 13. Un polipéptido aislado según la reivindicación 12, en el que dicho polipéptido es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 4, o es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 6, o es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos de acuerdo con los aminoácidos 34 a 304 en la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEC ID NO: 8.
- 10 14. Un polipéptido aislado según la reivindicación 12 ó 13, obtenible expresando un polinucleótido según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 5, o un vector según una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en tanto que se refieran a una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 5, en una célula hospedante apropiada.
- 15 15. Un método para fabricar un polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 13, que comprende cultivar una célula hospedante recombinante según la reivindicación 9 ó 10 bajo condiciones que permitan la expresión de un polinucleótido según la reivindicación 1, 3 a 5, o un vector según las reivindicaciones 6 a 8, en tanto que se refieran a una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 a 5, y opcionalmente recuperar el polipéptido codificado a partir de la célula o el medio de cultivo.
- 20 16. Uso de un polipéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la fabricación de un alimento.
17. Uso según la reivindicación 16, en la fabricación de un producto lácteo, preferiblemente en la fabricación de un queso, un producto similar a queso, queso modificado con enzimas (EMC) o en la fabricación de mezclas de ácidos grasos libres obtenibles mediante la lipólisis de grasa de mantequilla o nata.
- 25 18. Un método para preparar un producto lácteo, en el que se añade un polipéptido aislado según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 a una composición láctea utilizada en la producción de un producto lácteo, bajo condiciones suficientes para hacer reaccionar la enzima.
19. El uso según la reivindicación 16, 17 o el método según la reivindicación 18, en el que el polipéptido se utiliza en el desarrollo de sabor.
- 30 20. El uso o método según la reivindicación 19, en el que las sensaciones agudas, fuertes, picantes son mayores que las sensaciones jabonosas en el perfil de la harina del producto lácteo.
21. El uso según la reivindicación 16, en la fabricación de un producto horneado.
22. Una composición de enzima de hornear que comprende un polipéptido aislado que tiene actividad lipolítica según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, y una o más enzimas adicionales.
- 35 23. Una composición según la reivindicación 22, en la que la enzima adicional se selecciona del grupo que consiste en una amilasa, una alfa-amilasa, una beta-amilasa, una amilasa maltogénica o una amilasa no maltogénica, una ciclodextrina glucanotrasferasa, una proteasa, una peptidasa, una exopeptidasa, una transglutaminasa, una lipasa, una galactolipasa, una fosfolipasa, preferiblemente una fosfolipasa A, una celulasa, una hemicelulasa, una xilanas, una proteasa, una disulfuro isomerasa de proteína, una glucosiltransferasa, una peroxidasa, una lacasa, una oxidasa, una hexosa oxidasa, una glucosa oxidasa, una aldosa oxidasa, una piranosa oxidasa, una lipoxigenasa y una L-aminoácido oxidasa.
- 40 24. Una composición de hornear que comprende DATEM y un polipéptido aislado que tiene actividad lipolítica según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.
25. Método para preparar una masa, que comprende las etapas de añadir el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 12-14 o una composición según la reivindicación 22 ó 24 a al menos uno de los ingredientes de la masa.
- 45 26. Una masa que comprende el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 12-14 o una composición según la reivindicación 22 ó 24.
27. Una masa según la reivindicación 26, que tiene una estabilidad mejorada de la masa.
- 50 28. Una masa según una cualquiera de las reivindicaciones 26-27, que tiene al menos una de las propiedades mejoradas seleccionadas del grupo que consiste en mayor resistencia, mayor estabilidad, mayor elasticidad, menor pegajosidad, y una extensibilidad mejorada de la masa.

29. Método para preparar un producto horneado, que comprende la etapa de hornear la masa según una cualquiera de las reivindicaciones 26-28.
- 5 30. Método para preparar un producto horneado según la reivindicación 29, en el que el producto horneado tiene al menos una propiedad mejorada seleccionada del grupo que consiste en mayor volumen, mejor sabor, mejor estructura de la miga, mejor suavidad de la miga, mejor tostado, formación reducida de ampollas y mejor anti-añejamiento.
31. Método para preparar un producto horneado según la reivindicación 30, en el que el producto horneado es un pan, una torta o un producto horneado preparado a partir de masa laminada.
- 10 32. Método para preparar un producto horneado según la reivindicación 31, en el que el producto horneado es una torta libre de emulsionante o una torta con menos huevos.
33. Método para producir una masa de cocinar a partir de la cual puede derivar una torta, en el que se usa una enzima lipolítica según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.
34. Método para preparar una torta, que comprende la etapa de hornear la masa de cocinar según la reivindicación 33.
- 15 35. Método para preparar una torta según la reivindicación 34, en el que la torta es una torta en la que se ha reducido la cantidad de huevos y/o grasa.
36. Método para producir una torta según la reivindicación 34 o una masa de cocinar según la reivindicación 33, que comprende las etapas de:
- a. preparar una masa de cocinar de una torta añadiendo al menos:
- 20 azúcar, harina, fosfolipasa A, la enzima lipolítica según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 y huevos; y opcionalmente
- b. hornear la masa de cocinar para producir una torta
- en el que la torta comprende una cantidad reducida de huevos y/o grasa, o en el que no se ha aplicado reducción de huevos y/o grasa de la torta.
- 25 37. Una masa de cocinar de torta que comprende una enzima lipolítica según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14.
38. El uso de una composición que comprende al menos una fosfolipasa A y una enzima lipolítica según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14 para mejorar al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consisten de: (i) viscosidad de la masa de cocinar, (ii) densidad específica de la masa de cocinar, (iii) suavidad de la miga inicial de la torta, (iv) homogeneidad del poro de la miga de la torta, (v) diámetro del poro de la miga de la torta, (vi) suavidad de la miga con el almacenamiento de la torta, (vii) periodo de caducidad de la torta y/o (viii) volumen de la torta.
- 30