

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 451 266**

51 Int. Cl.:

C12N 9/16 (2006.01) **A01H 5/00** (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2007 E 07853585 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2057274**

54 Título: **Fosfolipasas, ácidos nucleicos que las codifican, y métodos para obtenerlas y usarlas**

30 Prioridad:

21.09.2006 US 826512 P

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

26.03.2014

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**O'DONOGHUE, EILEEN y
BARTON, NELSON R.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 451 266 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

Fosfolipasas, ácidos nucleicos que las codifican, y métodos para obtenerlas y usarlas

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO VÍA EFS-WEB

- 5 Esta solicitud se presentó electrónicamente vía el servidor de USPTO EFS-WEB, como se autoriza y se expone en MPEP §1730 II.B.2.(a)(A), y esta presentación electrónica incluye un listado de secuencias (SEC ID) presentado electrónicamente. El listado de secuencias se identifica en el archivo .txt presentado electrónicamente como sigue:

Nombre del archivo	Fecha de creación	Tamaño
564462015940seqlist.txt	20 de septiembre de 2007	422.053 bites

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 Esta invención se refiere generalmente a enzimas fosfolipasas, a polinucleótidos que codifican las enzimas, a métodos para obtener y usar estos polinucleótidos y polipéptidos. En particular, la invención proporciona nuevos polipéptidos que tienen actividad de fosfolipasa, ácidos nucleicos que los codifican y anticuerpos que se unen a ellos. También se proporcionan métodos industriales y productos que comprenden el uso de estas fosfolipasas.

ANTECEDENTES

- 15 Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan los enlaces de éster de los fosfolípidos. Correspondiente a su importancia en el metabolismo de fosfolípidos, estas enzimas están ampliamente extendidas entre procariontes y eucariotas. Las fosfolipasas afectan al metabolismo, construcción y reorganización de las membranas biológicas, y están implicadas en las cascadas de señales. Se conocen varios tipos de fosfolipasas que difieren en su especificidad según la posición del enlace atacada en la molécula fosfolipídica. La fosfolipasa A1 (PLA1) elimina el ácido graso de la posición 1 para producir ácido graso libre y 1-liso-2-acilfosfolípido. La fosfolipasa A2 (PLA2) elimina el ácido graso de la posición 2 para producir ácido graso libre y 1-acil-2-lisofosfolípido. Las enzimas PLA1 y PLA2 pueden ser intra- o extracelulares, unidas a la membrana o solubles. PLA2 intracelular se encuentra en casi cualquier célula de mamífero. La fosfolipasa C (PLC) elimina el resto de fosfato para producir 1,2-diacilglicerol y una éster de fosfato. La fosfolipasa D (PLD) produce 1,2-diacilglicerofosfato y un grupo base. PLC y PLD son importantes en la función celular y en la señalización. PLD ha sido la fosfolipasa dominante en la biocatálisis (véase, por ejemplo, Godfrey, T. y West S. (1996) *Industrial enzymology*, 299-300, Stockton Press, Nueva York). Las patatinas son otro tipo de fosfolipasa, que se piensa que trabajan como una PLA (véase, por ejemplo, Hirschberg HJ, et al., (2001), *Eur J Biochem* 268(19):5037-44).

- 30 Las oleaginosas habituales, tales como habas de soja, colza, semillas de girasol, aceite de salvado de arroz, sésamo y cacahuets, se usan como fuentes de aceites y materias primas. En el proceso de extracción del aceite, las semillas se tratan mecánicamente y térmicamente. El aceite se separa y se divide de la harina mediante un disolvente. Usando destilación, el disolvente se separa entonces del aceite y se recupera. El aceite se "desgoma" y se refina. El contenido de disolvente en la harina se puede evaporar mediante tratamiento térmico en una "tostadora desolventadora", seguido del secado y enfriamiento de la harina. Después de que el disolvente se ha separado por destilación, el aceite bruto producido se procesa en aceite comestible, usando procedimientos de desgomado especiales y refinado físico. También se puede utilizar como materia prima para la producción de ácidos grasos y éster metílico. La harina se puede usar para raciones para animales.

- 40 El desgomado es la primera etapa en el refinado del aceite vegetal, y se diseña para eliminar fosfátidos contaminantes que se extraen con el aceite pero que interfieren con el procesamiento subsiguiente del aceite. Estos fosfátidos son solubles en el aceite vegetal solamente en una forma anhidra, y se pueden precipitar y eliminar si se hidratan simplemente. La hidratación se logra habitualmente mezclando una pequeña proporción de agua continuamente con aceite sustancialmente seco. Típicamente, la cantidad de agua es 75% del contenido de fosfátidos, que es típicamente 1 a 1,5%. La temperatura no es muy crítica, aunque la separación de las gomas hidratadas es mejor si la viscosidad del aceite se reduce a 50°C hasta 80°C.

- 45 Actualmente se usan muchos métodos para el desgomado del aceite. El procedimiento de desgomado del aceite se puede ayudar enzimáticamente usando enzimas fosfolipasas. Las fosfolipasas A1 y A2 se han usado para el desgomado de aceites en diversos procedimientos comerciales, por ejemplo "desgomado ENZYMAX™" (Lurgi Life Science Technologies GmbH, Alemania). La fosfolipasa C (PLC) también se ha considerado para el desgomado de aceites debido a que el resto de fosfato generado por su acción sobre los fosfolípidos es muy soluble en agua y fácil de eliminar, y el diglicérido permanecería con el aceite y reduce pérdidas; véanse, por ejemplo, Godfrey, T. y West S. (1996) *Industrial Enzymology*, p. 299-300, Stockton Press, Nueva York; Dahlke (1998) "An enzymatic process for the physical refining of seed oils", *Chem. Eng. Technol.* 21:278-281; Clausen (2001) "Enzymatic oil degumming by a novel microbial phospholipase", *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103:333-340.

Los aceites con contenido elevado de fosfátidos, tales como soja, cáñola y girasol, se procesan de forma diferente a otros aceites tales como el de palma. A diferencia del procedimiento de vapor o "refinado físico" para aceites con bajo contenido de fosfátidos, estos aceites con un contenido elevado de fósforo requieren tratamientos químicos y mecánicos especiales para eliminar los fosfolípidos que contienen fósforo. Estos aceites se refinan típicamente de forma química en un procedimiento que supone neutralizar los ácidos grasos libres para formar jabón y una fracción de goma insoluble. El proceso de neutralización es muy eficaz a la hora de eliminar los ácidos grasos libres y los fosfolípidos, pero este proceso también da como resultado pérdidas significativas de rendimiento y sacrificios en la calidad. En algunos casos, el aceite bruto con contenido elevado de fosfátidos se desgoma en una etapa anterior a la neutralización cáustica. Este es el caso para aceite de soja utilizado para lecitina, en el que el aceite se desgoma en primer lugar con agua o ácido.

El aceite de haba de soja se usa ampliamente y es una materia alimentaria importante, dando cuenta de ~30% de la producción de aceite a partir de semillas y frutas. Las habas de soja contienen sólo 20% de aceite, y la extracción se realiza habitualmente usando un disolvente tal como hexano a escala comercial. La calidad reconocida de su aceite y el valor nutritivo de la proteína de la harina hacen al haba de soja una oleaginosa principal. Antes de la extracción, las habas de soja se deben limpiar, romper y convertir en copos ya que la extracción eficiente del aceite con disolventes requiere que cada célula de aceite se rompa para mejorar la transferencia de masa. Las paredes celulares compuestas mayoritariamente de celulosa, asociada con hemicelulosas, sustancias pécticas y lignina), también se podrían romper por medios enzimáticos, para lograr una mejora significativa en los rendimientos y velocidades de extracción.

El aceite de diacilglicerol (DAG) es un aceite comestible que contiene una cantidad de 80% o mayor de DAG que los ácidos grasos naturales. Se ha demostrado en seres humanos que la elevación postprandial de triglicérido en quilomicrones es notablemente menor tras la ingestión de una emulsión de aceite de DAG en comparación con un aceite de TAG con una composición de ácidos grasos similar. En estudios que usan hombres japoneses y hombres y mujeres americanos, el consumo a largo plazo de aceite de DAG promovió la pérdida de peso y la reducción de la grasa corporal. Un estudio mostró que la sustitución del aceite habitual de cocinar por aceite de DAG reduce la incidencia de obesidad y otros factores de riesgo.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención proporciona ácidos nucleicos aislados, sintéticos o recombinantes que comprenden una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o una identidad de secuencia completa (100%) con SEC ID NO:177, y que tiene una mutación E41W, E41F o E41Y y preferiblemente una o más mutaciones que codifican E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R a lo largo de una región de al menos alrededor de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850 o más restos consecutivos, y, en un aspecto, el ácido nucleico codifica al menos un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa (PL), por ejemplo una actividad de fosfolipasa A, C o D, o cualquier combinación de actividad de fosfolipasa, por ejemplo una actividad de PL A, PL C y/o PL D – como una actividad multifuncional. Las identidades de secuencia se pueden determinar mediante análisis con un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual.

En aspectos alternativos, el ácido nucleico aislado, sintético o recombinante codifica un polipéptido comprende una secuencia como se expone en SEC ID NO:177, y que tiene una mutación E41W, E41F o E41Y, y preferiblemente una o más mutaciones que codifican E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R. En un aspecto, estos polipéptidos tienen una actividad de fosfolipasa, por ejemplo una actividad de fosfolipasa A, B, C o D, o cualquier combinación de actividad de fosfolipasa, por ejemplo una actividad de PL A, PL C y/o PL D – como una actividad multifuncional.

Como se usa aquí, el algoritmo de comparación de secuencias es un algoritmo BLAST, tal como un algoritmo BLAST versión 2.2.2. El ajuste de filtro se ajusta a blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F, y todas las otras opciones se ajustan por defecto.

En aspectos alternativos, el ácido nucleico aislado, sintético o recombinante codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa pero que carece de: una secuencia señal o secuencia proproteínica, o una secuencia promotora homóloga; un ácido nucleico (polinucleótido) de la invención codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa y que comprende además una secuencia de aminoácidos heteróloga, o el ácido nucleico (polinucleótido) de la invención comprende una secuencia nucleotídica heteróloga; o el ácido nucleico (polinucleótido) de la invención comprende o consiste en una secuencia que codifica una secuencia señal heteróloga (líder), o una etiqueta o un epítipo, o la secuencia nucleotídica heteróloga comprende una secuencia promotora heteróloga; o un ácido nucleico (polinucleótido) de la invención comprende una secuencia nucleotídica heteróloga que codifica una secuencia señal heteróloga (líder) que comprende o consiste en una extensión N-terminal y/o C-terminal para dirigirla hacia un retículo endoplásmico (ER) o endomembrana, o a un retículo endoplásmico (ER) vegetal o sistema endomembránico, o la secuencia heteróloga comprende un sitio de restricción; o el ácido nucleico

(polinucleótido) de la invención comprende una secuencia promotora heteróloga que comprende o consiste en un promotor constitutivo o inducible, o un promotor específico del tipo celular, o un promotor específico de la planta, o un promotor específico de bacterias.

5 Como se describe aquí, la actividad de fosfolipasa comprende catalizar la hidrólisis de un enlace de éster de fosfato de glicerol (es decir, escisión de enlaces de éster de fosfato de glicerol). La actividad de fosfolipasa puede comprender catalizar la hidrólisis de un enlace de éster en un fosfolípido en un aceite vegetal. El fosfolípido del aceite vegetal puede comprender un fosfolípido de oleaginosa. La actividad de fosfolipasa comprende una actividad de fosfolipasa C (PLC); una actividad de fosfolipasa A (PLA), tal como actividad de fosfolipasa A1 o fosfolipasa A2; una actividad de fosfolipasa D (PLD), tal como una actividad de fosfolipasa D1 o una actividad de fosfolipasa D2; 10 una actividad de fosfolipasa B (PLB), por ejemplo una actividad de fosfolipasa y de lisofosfolipasa (LPL), o una actividad de fosfolipasa y de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o una actividad de fosfolipasa y de lisofosfolipasa (LPL) y una actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA); o actividad de patatina, o una combinación de las mismas. La actividad de fosfolipasa puede comprender hidrólisis de una glucoproteína, por ejemplo como una glucoproteína encontrada en un tubérculo de patata. La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad 15 enzimática de patatina. La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de acil hidrolasa de lípido (LAH). Una fosfolipasa puede tener actividad multifuncional, por ejemplo una combinación de una o más de las actividades enzimáticas descritas aquí, por ejemplo una fosfolipasa de la invención puede tener actividad de PLC y PLA; actividad de PLB y PLA; actividad de PLC y PLD; actividad de PLC y PLB; actividad de PLB y patatina; actividad de PLC y patatina; PLD y PLA; actividad de PLD, PLA, PLB y PLC; o actividad de PLD, PLA, PLB, PLC y patatina; o 20 una actividad de fosfolipasa y una actividad de lisofosfolipasa (LPL), o una actividad de fosfolipasa y una actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o una actividad de fosfolipasa y de lisofosfolipasa (LPL) y una actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o cualquier combinación de las mismas.

Por ejemplo, un polipéptido como se describe aquí es enzimáticamente activo, pero carece de una actividad de lipasa, por ejemplo carece de una actividad enzimática que afecta a una fracción de aceite neutro (triglicérido). Puede ser deseable usar tal polipéptido en un procedimiento particular, por ejemplo un procedimiento de desgomado, en el que es importante que la fracción de aceite neutro no sea dañada (disminuida, por ejemplo hidrolizada). 25

El ácido nucleico aislado o recombinante como se describe aquí codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa que es termoestable. Por ejemplo, un polipéptido de la presente descripción, por ejemplo, las enzimas variantes o evolucionadas, por ejemplo las variaciones específicas de SEC ID NO:2, SEC ID NO:175, SEC ID NO:175, SEC ID NO:177 y SEC ID NO:178, como se expone en la Tabla 5 y en los Ejemplos 4 y 7 puede ser termoestable. El polipéptido termoestable como se describe aquí puede retener una actividad de unión y/o 30 enzimática, por ejemplo una actividad de fosfolipasa en condiciones que comprenden un intervalo de temperatura de desde alrededor de -100°C a alrededor de -80°C; de alrededor de -80°C a alrededor de -40°C, de alrededor de -40°C a alrededor de -20°C, de alrededor de -20°C a alrededor de 0°C, de alrededor de 0°C a alrededor de 37°C, de alrededor de 0°C a alrededor de 5°C, de alrededor de 5°C a alrededor de 15°C, de alrededor de 15°C a alrededor de 25°C, de alrededor de 25°C a alrededor de 37°C, de alrededor de 37°C a alrededor de 45°C, de alrededor de 45°C a alrededor de 55°C, de alrededor de 55°C a alrededor de 70°C, de alrededor de 70°C a alrededor de 75°C, de alrededor de 75°C a alrededor de 85°C, de alrededor de 85°C a alrededor de 90°C, de alrededor de 90°C a alrededor de 95°C, de alrededor de 95°C a alrededor de 100°C, de alrededor de 100°C a alrededor de 105°C, de alrededor de 105°C a alrededor de 110°C, de alrededor de 110°C a alrededor de 120°C, o 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C o más. El polipéptido termoestable como se describe aquí retiene actividad, por ejemplo una actividad de fosfolipasa a una temperatura en los intervalos descritos anteriormente, a alrededor de pH 3,0, alrededor de pH 3,5, alrededor de pH 4,0, alrededor de pH 4,5, alrededor de pH 5,0, alrededor de pH 5,5, alrededor de pH 6,0, alrededor de pH 6,5, 45 alrededor de pH 7,0, alrededor de pH 7,5, alrededor de pH 8,0, alrededor de pH 8,5, alrededor de pH 9,0, alrededor de pH 9,5, alrededor de pH 10,0, alrededor de pH 10,5, alrededor de pH 11,0, alrededor de pH 11,5, alrededor de pH 12,0, o más.

El ácido nucleico aislado o recombinante codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa que es termotolerante. Por ejemplo, un polipéptido descrito aquí, por ejemplo, las enzimas variantes o evolucionadas de la invención, por ejemplo las variaciones específicas de SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:175, SEQ ID NO:177 y SEQ ID NO:178, como se exponen en la Tabla 5 y en los Ejemplos 4 y 7, puede ser termotolerante o termoactivo. El polipéptido descrito aquí retiene una actividad de fosfolipasa u otra actividad tras la exposición a una temperatura en el intervalo de mayor que 90°C a alrededor de 95°C a pH 4,5. 50

En un aspecto, el ácido nucleico aislado, sintético o recombinante comprende una secuencia que se hibrida en condiciones restrictivas al complemento de un ácido nucleico que comprende en SEC ID NO:177, que tiene una mutación que codifica E41W, E41F, o E41Y. También se describe un ácido nucleico aislado, sintético o recombinante que comprende una secuencia que se hibrida en condiciones restrictivas a una secuencia como se expone en SEQ ID NO:177 o SEQ ID NO:178 que tiene una o más mutaciones que codifican E41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R, , en el que el ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa. El ácido nucleico puede tener 60

una longitud de al menos alrededor de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850 o restos, o la longitud completa del gen o transcrito, con o sin una secuencia señal, como se describe aquí. Las condiciones restrictivas pueden ser muy restrictivas, moderadamente restrictivas o de baja restricción, como se describe aquí. Las condiciones restrictivas pueden incluir una etapa de lavado, por ejemplo una etapa de lavado que comprende un lavado en 0,2X SSC a una temperatura de alrededor de 65°C durante alrededor de 15 minutos.

La invención proporciona casetes de expresión que comprenden un ácido nucleico de la invención o una subsecuencia del mismo. Por ejemplo, el casete de expresión puede comprender el ácido nucleico que está enlazado operablemente a un promotor. El promotor puede ser un promotor vírico, bacteriano, de mamífero o vegetal. Por ejemplo, el promotor vegetal puede ser un promotor de patata, de arroz, de maíz, de trigo, de tabaco o de cebada. El promotor puede ser un promotor constitutivo. El promotor constitutivo puede comprender CaMV35S. Por ejemplo, el promotor puede ser un promotor inducible. El promotor puede ser un promotor específico de tejido, o un promotor regulado medioambientalmente o un promotor regulado mediante el desarrollo. De este modo, el promotor puede ser, por ejemplo, un promotor específico de semillas, un promotor específico de hojas, un promotor específico de raíces, un promotor específico de tallos o un promotor inducido por escisión. El casete de expresión puede comprender además un vector de expresión vegetal o de virus vegetal.

La invención proporciona vehículos de clonación que comprenden un casete de expresión (por ejemplo, un vector) de la invención o un ácido nucleico de la invención. El vehículo de clonación puede ser un vector vírico, un plásmido, un fago, un fagómido, un cósmido, un fósido, un bacteriófago o un cromosoma artificial. El vector vírico puede comprender un vector adenovírico, un vector retrovírico o un vector vírico adenoasociado. El vehículo de clonación puede comprender un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un plásmido, un vector derivado del bacteriófago P1 (PAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), o un cromosoma artificial de mamífero (MAC).

La invención proporciona una célula transformada que comprende un ácido nucleico de la invención o un casete de expresión (por ejemplo, un vector) de la invención, o un vehículo de clonación de la invención. En un aspecto, la célula transformada puede ser una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal. En un aspecto, la célula vegetal puede ser una célula de patata, de trigo, de arroz, de maíz, de tabaco o de cebada.

La invención proporciona animales no humanos transgénicos que comprenden un ácido nucleico de la invención o un casete de expresión (por ejemplo, un vector) de la invención. En un aspecto, el animal es un ratón, una rata, una cabra, un conejo, una oveja, un cerdo o una vaca, u otro animal.

La invención proporciona plantas transgénicas que comprenden un ácido nucleico de la invención o un casete de expresión (por ejemplo, un vector) de la invención. La planta transgénica puede ser una planta de maíz, una planta de patata, una planta de tomate, una planta de trigo, una planta oleaginosa, una planta de colza, una planta de haba de soja, una planta de arroz, una planta de cebada o una planta de tabaco. La invención proporciona semillas transgénicas que comprenden un ácido nucleico de la invención o un casete de expresión (por ejemplo, un vector) de la invención. La semilla transgénica puede ser una semilla de maíz, una pepita de trigo, una semilla oleaginosa, una colza (una planta de cáñola), una semilla de haba de soja, una pepita de palma, una semilla de girasol, una semilla de sésamo, un cacahuete, arroz, o una semilla de planta de tabaco.

La presente descripción proporciona un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria a o capaz de hibridarse en condiciones restrictivas a un ácido nucleico de la presente descripción. La descripción proporciona métodos para inhibir la traducción de un mensaje de fosfolipasa en una célula comprenden administrar a la célula o expresar a la célula un oligonucleótido antisentido que comprende una secuencia de ácido nucleico complementaria a o capaz de hibridarse en condiciones restrictivas a un ácido nucleico de la invención.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado, sintético o recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos alrededor de 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o una identidad de secuencia completa (100%) con SEC ID NO:176 que tiene al menos una de las mutaciones de aminoácidos de E41W, E41F o E41Y, y preferiblemente que comprende una o más mutaciones que codifican E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171VE41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R.

La invención proporciona polipéptidos aislados, sintéticos o recombinantes codificados por un ácido nucleico de la invención. En aspectos alternativos, el polipéptido puede tener una secuencia como se expone en SEC ID NO:176, y que tiene al menos una de las mutaciones de aminoácidos de E41W, E41F o E41Y, y preferiblemente que comprende una o más mutaciones que codifican E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171VE41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R. El polipéptido puede tener una actividad de

fosfolipasa, por ejemplo una actividad de fosfolipasa A, B, C o D, o cualquier combinación de actividad de fosfolipasa, por ejemplo, una actividad de PL A, PL C y/o PL D – como una actividad multifuncional. Por ejemplo, un polipéptido de la invención es enzimáticamente activo, pero carece de una actividad de lipasa, por ejemplo carece de cualquier actividad enzimática que afecte a una fracción de aceite neutro (triglicérido). La presente descripción proporciona un procedimiento de desgomado que comprende usar un polipéptido de la presente descripción que tiene una actividad de fosfolipasa, pero no una actividad de lipasa, de manera que, en el procedimiento de desgomado, no se daña (disminuye, altera, degrada, por ejemplo hidroliza) cualquier fracción de aceite neutro.

Como alternativa, los polipéptidos de esta invención tienen una actividad de fosfolipasa, pero carecen de: una secuencia señal o una secuencia propeptídica; o tienen una actividad de fosfolipasa y comprenden además una secuencia de aminoácidos heteróloga, o un ácido nucleico (polinucleótido) de la invención comprende una secuencia nucleotídica heteróloga. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos heteróloga comprende o consiste en una secuencia que codifica una secuencia señal heteróloga (líder), o una etiqueta o un epítopo, o la secuencia nucleotídica heteróloga comprende una secuencia promotora heteróloga; la secuencia señal heteróloga (líder) comprende o consiste en una extensión N-terminal y/o C-terminal para dirigirla hacia un retículo endoplásmico (ER) o endomembrana, o a un retículo endoplásmico (ER) vegetal o sistema endomembránico, o la secuencia heteróloga codifica un sitio de restricción.

La invención proporciona polipéptidos aislados, sintéticos o recombinantes que comprenden un polipéptido de la invención que carece de una secuencia señal. Por ejemplo, el polipéptido que carece de una secuencia señal tiene al menos 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más de identidad de secuencia con los restos 30 a 287 de SEQ ID NO:175 o SEQ ID NO:176 que tiene una o más mutaciones que codifican E41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171VE41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R. Las identidades de secuencia se pueden determinar mediante análisis con un algoritmo de comparación de secuencias, o mediante inspección visual.

En un aspecto, el polipéptido aislado, sintético o recombinante de la invención (con o sin una secuencia señal) tiene una actividad de fosfolipasa. La actividad de fosfolipasa puede comprender catalizar la hidrólisis de un enlace de éster de fosfato de glicerol (es decir, escisión de enlaces de éster de fosfato de glicerol). La actividad de fosfolipasa puede comprender catalizar la hidrólisis de un enlace de éster en un fosfolípido en un aceite vegetal. El fosfolípido del aceite vegetal puede comprender un fosfolípido de oleaginosa. La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de fosfolipasa C (PLC); una actividad de fosfolipasa A (PLA), tal como actividad de fosfolipasa A1 o fosfolipasa A2; una actividad de fosfolipasa D (PLD), tal como una actividad de fosfolipasa D1 o de fosfolipasa D2; una actividad de fosfolipasa B (PLB), por ejemplo, una actividad fosfolipasa y de lisofosfolipasa (LPL) o una actividad fosfolipasa y de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o una actividad fosfolipasa y de lisofosfolipasa (LPL) y una actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA); o actividad de patatina, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, una fosfolipasa comprende una combinación de una o más actividades enzimáticas descritas aquí, por ejemplo una fosfolipasa puede tener actividad de PLC y PLA; actividad de PLB y PLA; actividad de PLC y PLD; actividad de PLC y PLB; actividad de PLB y patatina; actividad de PLC y patatina; PLD y PLA; actividad de PLD, PLA, PLB y PLC; o actividad de PLD, PLA, PLB, PLC y patatina; o una actividad de fosfolipasa y una actividad de lisofosfolipasa (LPL), o una actividad fosfolipasa y una actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o una actividad de fosfolipasa y una actividad de lisofosfolipasa (LPL) y actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o cualquier combinación de las mismas.

La actividad de fosfolipasa puede comprender la hidrólisis de una glucoproteína, por ejemplo como una glucoproteína encontrada en un tubérculo de patata. La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad enzimática de patatina. La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de acil hidrolasa de lípido (LAH).

En un aspecto, el polipéptido aislado, sintético o recombinante puede comprender el polipéptido de la invención que carece de una secuencia señal. En un aspecto, el polipéptido aislado, sintético o recombinante puede comprender el polipéptido de la invención que comprende una secuencia señal heteróloga, tal como una secuencia señal heteróloga de fosfolipasa o no de fosfolipasa.

La presente descripción proporciona proteínas quiméricas que comprenden un primer dominio que comprende una secuencia señal como se describe aquí y al menos un segundo dominio. La proteína puede ser una proteína de fusión. El segundo dominio puede comprender una enzima. La enzima puede ser una fosfolipasa.

La descripción proporciona polipéptidos quiméricos que comprenden al menos un primer dominio que comprende un péptido señal (SP) como se describe aquí o un dominio catalítico (CD), o sitio activo, de una fosfolipasa de la presente descripción y al menos un segundo dominio que comprende un polipéptido o péptido heterólogo, en el que el polipéptido o péptido heterólogo no está asociado naturalmente con el péptido señal (SP) o dominio catalítico (CD). El polipéptido o péptido heterólogo puede no ser una fosfolipasa. El polipéptido o péptido heterólogo puede ser aminoterminal a, carboxiterminal a, o puede estar en ambos extremos del péptido señal (SP) o dominio catalítico (CD).

La descripción proporciona ácidos nucleicos aislados, sintéticos o recombinantes que codifican un polipéptido quimérico, en el que el polipéptido quimérico comprende al menos un primer dominio que comprende un péptido señal (SP) o un dominio catalítico (CD), o sitio activo, de un polipéptido como se describe aquí, y al menos un segundo dominio que comprende un polipéptido o péptido heterólogo, en el que el polipéptido o péptido heterólogo no está asociado naturalmente con el péptido señal (SP) o dominio catalítico (CD).

La actividad de fosfolipasa por ejemplo comprende una actividad específica a alrededor de 37°C en el intervalo de alrededor de 10 unidades por miligramo a alrededor de 100 unidades por miligramo de proteína. Como alternativa, la actividad de fosfolipasa comprende una actividad específica de alrededor de 100 unidades por miligramo a alrededor de 1000 unidades por miligramo de proteína, de alrededor de 500 unidades por miligramo a alrededor de 750 unidades por miligramo de proteína. Como alternativa, la actividad de fosfolipasa comprende una actividad específica a 37°C en el intervalo de alrededor de 100 a alrededor de 500 unidades por miligramo de proteína. La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad específica a 37°C en el intervalo de alrededor de 500 a alrededor de 1200 unidades por miligramo de proteína. La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad específica a 37°C en el intervalo de alrededor de 750 a alrededor de 1000 unidades por miligramo de proteína. La termotolerancia puede comprender retención de al menos la mitad de la actividad específica de la fosfolipasa a 37°C después de ser calentada hasta una temperatura elevada. Como alternativa, la termotolerancia puede comprender retención de actividad específica a 37°C en el intervalo de alrededor de 500 a alrededor de 1200 unidades por miligramo de proteína después de ser calentada hasta una temperatura elevada, tal como una temperatura de desde alrededor de 0°C a alrededor de 20°C, de alrededor de 20°C a alrededor de 37°C, de alrededor de 37°C a alrededor de 50°C, de alrededor de 50°C a alrededor de 70°C, de alrededor de 70°C a alrededor de 75°C, de alrededor de 75°C a alrededor de 80°C, de alrededor de 80°C a alrededor de 85°C, de alrededor de 85°C a alrededor de 90°C, de alrededor de 90°C a alrededor de 95°C, de alrededor de 95°C a alrededor de 100°C, de alrededor de 100°C a alrededor de 110°C, o mayor. Como alternativa, la termotolerancia puede comprender retención de actividad específica a 37°C en el intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 1200 unidades por miligramo de proteína, o de alrededor de 500 a alrededor de 1000 unidades por miligramo de proteína después de ser calentada hasta una temperatura elevada. Como alternativa, la termotolerancia puede comprender retención de actividad específica a 37°C en el intervalo de alrededor de 1 a alrededor de 500 unidades por miligramo de proteína después de ser calentada hasta una temperatura elevada, como se describe anteriormente.

La invención proporciona el polipéptido aislado, sintético o recombinante de la invención, en el que el polipéptido comprende al menos un sitio de glucosilación. En una realización, la glucosilación puede ser una glucosilación enlazada mediante N. En una realización, el polipéptido se puede glucosilar después de ser expresado en una *P. pastoris* o una *S. pombe*.

La invención proporciona enzimas fosfolipasas, y los ácidos nucleicos que las codifican, que tienen una secuencia de cualquiera de las fosfolipasas ejemplares de la invención con uno o más o todos los sitios de glucosilación alterados, como se describe anteriormente. De este modo, la invención proporciona métodos para obtener secuencias codificantes de fosfolipasas variantes que tienen una mayor expresión en una célula hospedante, en la que el método comprende modificar una secuencia codificante de fosfolipasa de la invención de manera que se modifiquen uno, varios o todos los motivos codificantes de los sitios de glucosilación enlazados a N a un motivo no glucosilado. La invención también proporciona una secuencia codificante de fosfolipasa obtenida mediante este procedimiento, y las enzimas que codifican.

La descripción proporciona preparaciones proteicas que comprenden un polipéptido de la invención, en las que la preparación proteica comprende un líquido, un sólido o un gel.

La invención proporciona heterodímeros que comprenden un polipéptido como se describe aquí y una segunda proteína o dominio. El segundo miembro del heterodímero puede ser una fosfolipasa diferente, una enzima diferente u otra proteína. Por ejemplo, el segundo dominio puede ser un polipéptido, y el heterodímero puede ser una proteína de fusión. El segundo dominio puede ser un epítipo o una etiqueta. La descripción proporciona homodímeros que comprenden un polipéptido como se describe.

La descripción proporciona polipéptidos inmovilizados que tienen una actividad de fosfolipasa, en los que el polipéptido comprende un polipéptido de la invención, un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la invención, o un polipéptido que comprende un polipéptido de la invención y un segundo dominio (por ejemplo, una proteína de fusión). Por ejemplo, el polipéptido de la invención se inmoviliza sobre una célula, una vesícula, un liposoma, una película, una membrana, un metal, una resina, un polímero, un material cerámico, un vidrio, un microelectrodo, una partícula gráfica, una perla, un gel, una lámina, cristales, un comprimido, una pastilla, una cápsula, un polvo, un aglomerado, una superficie, una estructura porosa, un chip o un tubo capilar. Un polipéptido de la invención se puede inmovilizar sobre materiales tales como granos, cáscaras, corteza, piel, pelo, esmalte, hueso, concha y materiales que derivan de ella, o materiales de alimentación animal, o una combinación de los mismos.

Los polipéptidos de la invención (por ejemplo, fosfolipasas) también pueden estar presentes solos o como mezcla de fosfolipasas o de fosfolipasas y otras enzimas hidrolíticas tales como celulasas, xilanasas, proteasas, lipasas, amilasas, o enzimas redox tales como lacasas, peroxidasas, catalasas, oxidasas, o reductasas. Se pueden formular en forma sólida, tal como un polvo, preparaciones liofilizadas, gránulos, comprimidos, barras, cristales, cápsulas,

pastillas, peletes, o en forma líquida tal como una disolución acuosa, un aerosol, un gel, una pasta, una suspensión, una emulsión acuosa/oleosa, una crema, una cápsula, una vesícula, o una suspensión micelar. Estas formulaciones pueden comprender cualquiera o una combinación de los siguientes ingredientes: polioles tales como polietilenglicoles, polialcoholes vinílicos, glicerol, azúcares tales como sacarosa, sorbitol, trehalosa, glucosa, fructosa, maltosa, agentes gelantes tales como gomas guar, carrageenanos, alginatos, dextranos, derivados celulosícos, pectinas, sales tales como cloruro de sodio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de cinc, sulfato de cinc, sales de ácidos grasos y sus derivados, quelantes metálicos tales como EDTA, EGTA, citrato de sodio, agentes antimicrobianos tales como ácidos grasos, sus derivados, parabenos, sorbatos, benzoatos, adicionalmente compuestos para bloquear el impacto de proteasas sobre las proteínas voluminosas tales como BSA, hidrolizados de trigo, compuestos de borato, emulsionantes tales como detergentes no iónicos e iónicos, usados solos o en combinación, fitosteroles, vitaminas, aminoácidos, agentes reductores, tales como cisteína, o compuestos antioxidantes tales como ácido ascórbico, y asimismo se pueden incluir dispersantes.

La presente descripción se refiere a anticuerpos aislados, sintéticos o recombinantes que se unen específicamente a un polipéptido de la invención o a un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la invención. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o policlonal. La descripción se refiere a hibridomas que comprenden un anticuerpo de la presente descripción.

La presente descripción proporciona métodos para aislar o identificar un polipéptido con una actividad de fosfolipasa, que comprenden las etapas de: (a) proporcionar un anticuerpo como se describe aquí; (b) proporcionar una muestra que comprende polipéptidos; y (c) poner en contacto la muestra de la etapa (b) con el anticuerpo de la etapa (a) en condiciones en las que el anticuerpo se puede unir específicamente al polipéptido, aislando o identificando de ese modo una fosfolipasa. La presente descripción proporciona métodos para obtener un anticuerpo anti-fosfolipasa, que comprenden administrar a un animal no humano un ácido nucleico de la invención, o un polipéptido de la invención, en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmunitaria humoral, obteniendo de ese modo un anticuerpo anti-fosfolipasa.

La invención proporciona métodos para producir un polipéptido recombinante, que comprenden las etapas de: (a) proporcionar un ácido nucleico de la invención enlazado operablemente a un promotor; y (b) expresar el ácido nucleico de la etapa (a) en condiciones que permiten la expresión del polipéptido, produciendo de ese modo un polipéptido recombinante. El ácido nucleico puede comprender una secuencia que tiene al menos 85% de identidad de secuencia con SEC ID NO:175 o SEC ID NO:176 que tiene una o más mutaciones que codifican E41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R a lo largo de una región de al menos alrededor de 100 restos, en el que las identidades de secuencia se determinan mediante análisis con un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. El ácido nucleico puede comprender un ácido nucleico que se hibrida en condiciones restrictivas a un ácido nucleico como se expone en SEC ID NO:177 o SEC ID NO:178, que tiene una o más mutaciones que codifican E41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R. El método puede comprender además transformar una célula hospedante con el ácido nucleico de la etapa (a) seguido de la expresión del ácido nucleico de la etapa (a), produciendo de ese modo un polipéptido recombinante en una célula transformada. El método puede comprender además insertar en un animal hospedante no humano el ácido nucleico de la etapa (a), seguido de la expresión del ácido nucleico de la etapa (a), produciendo de ese modo un polipéptido recombinante en el animal hospedante no humano.

La presente descripción proporciona métodos para identificar un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, que comprenden las siguientes etapas: (a) proporcionar un polipéptido como se describe aquí o un polipéptido codificado por un ácido nucleico se describe aquí, o un fragmento o variante del mismo, (b) proporcionar un sustrato de fosfolipasa; y, (c) poner en contacto el polipéptido o un fragmento o variante del mismo de la etapa (a) con el sustrato de la etapa (b) y detectar un incremento en la cantidad del sustrato o una disminución en la cantidad de producto de reacción, en el que una disminución en la cantidad del sustrato o un incremento en la cantidad del producto de reacción detecta un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa. La presente descripción proporciona sistemas de ordenador que comprenden un procesador y un dispositivo de almacenamiento de datos, en el que dicho dispositivo de almacenamiento de datos tiene almacenada en él una secuencia polipeptídica como se describe aquí o una secuencia de ácido nucleico como se describe aquí.

El sistema de ordenador puede comprender además un algoritmo de comparación de secuencias y un dispositivo de almacenamiento de datos que tiene al menos una secuencia de referencia almacenada en él. El algoritmo de comparación de secuencias puede comprender un programa de ordenador que indica polimorfismos. El sistema de ordenador puede comprender además un identificador que identifica uno o más rasgos en dicha secuencia.

La descripción proporciona medios legibles por ordenador que tienen almacenada en ellos una secuencia que comprende una secuencia polipeptídica descrita aquí o una secuencia de ácido nucleico descrita aquí.

La descripción proporciona métodos para identificar un rasgo en una secuencia que comprende las etapas de: (a) leer la secuencia usando un programa de ordenador que identifica uno o más rasgos en una secuencia, en el que la secuencia comprende una secuencia polipeptídica de la invención o una secuencia de ácido nucleico de la invención; y, (b) identificar uno o más rasgos en la secuencia con el programa de ordenador.

5 La descripción proporciona métodos para comparar una primera secuencia con una segunda secuencia que comprenden las etapas de: (a) leer la primera secuencia y la segunda secuencia mediante el uso de un programa de ordenador que compara las secuencias, en el que la primera secuencia comprende una secuencia polipeptídica de la invención o una secuencia de ácido nucleico de la invención; y, (b) determinar diferencias entre la primera secuencia y la segunda secuencia con el programa de ordenador. La etapa de determinar diferencias entre la
10 primera secuencia y la segunda secuencia comprende además la etapa de identificar polimorfismos. Por ejemplo, el método comprende además un identificador (y el uso del identificador) que identifica uno o más rasgos en una secuencia. El método puede comprender leer la primera secuencia usando un programa de ordenador e identificar uno o más rasgos en la secuencia.

15 La invención proporciona métodos para generar una variante de un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa que comprende las etapas de: (a) proporcionar un ácido nucleico molde que comprende un ácido nucleico de la invención; (b) modificar, suprimir o añadir uno o más nucleótidos en la secuencia molde, o una combinación de los mismos, para generar una variante del ácido nucleico molde.

20 En una alternativa, el método comprende además expresar el ácido nucleico variante para generar un polipéptido de fosfolipasa variante. Como alternativa, las modificaciones, adiciones o supresiones se introducen mediante PCR propensa a errores, transposición de fragmentos, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis de PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis por inserción de un casete, mutagénesis de conjunto
25 recursiva, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica del sitio, reensamblaje génico, mutagénesis saturada de sitio génico (GSSM), reensamblaje de ligación sintética (SLR) y/o una combinación de los mismos. Como alternativa, las modificaciones, adiciones o supresiones se introducen mediante un método seleccionado del grupo que consiste en recombinación, recombinación de secuencia recursiva, mutagénesis de ADN
30 modificado con fosfotoato, mutagénesis de molde que contiene uracilo, mutagénesis de dúplex con saltos, mutagénesis de reparación de desemparejamiento de punto, mutagénesis de hebra de hospedante deficiente en la reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis de supresión, mutagénesis de restricción-selección, mutagénesis de restricción-purificación, síntesis génica artificial, mutagénesis de conjunto, creación de
35 multimeros de ácidos nucleicos quiméricos y/o una combinación de los mismos.

40 En una alternativa, el método se repite iterativamente hasta que se produce una fosfolipasa que tiene una actividad alterada o diferente o una estabilidad alterada o diferente de la de una fosfolipasa codificada por el ácido nucleico molde. Como alternativa, la actividad alterada o diferente es una actividad de fosfolipasa en una condición ácida, en el que la fosfolipasa codificada por el ácido nucleico molde no es activa en la condición ácida. Por ejemplo, la
35 actividad alterada o diferente es una actividad de fosfolipasa a una temperatura elevada, en el que la fosfolipasa codificada por el ácido nucleico molde no es activa a la temperatura elevada. Por ejemplo, el método se repite de forma iterativa hasta que se produce una secuencia codificante de fosfolipasa que tiene un uso de codones alterado con respecto al del ácido nucleico molde. El método se puede repetir de forma iterativa hasta que se produce un gen de fosfolipasa que tiene un nivel mayor o menor de expresión o estabilidad del mensaje con respecto al del ácido
40 nucleico molde.

45 La invención proporciona métodos para modificar codones en un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa, comprendiendo el método (a) proporcionar un ácido nucleico de la invención que codifica una fosfolipasa; y, (b) identificar un codón en el ácido nucleico de la etapa (a) y sustituirlo por un codón diferente que codifica el mismo aminoácido que el codón sustituido, modificando de ese modo codones en un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa.

50 La presente descripción proporciona métodos para modificar codones en un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa para incrementar su expresión en una célula hospedante, comprendiendo el método (a) proporcionar un ácido nucleico como se describe aquí que codifica una fosfolipasa; y, (b) identificar un codón no preferido o menos preferido en el ácido nucleico de la etapa (a) y sustituirlo por un codón preferido o usado de forma neutra que codifica el mismo aminoácido que el codón sustituido, en el que un codón preferido es un codón sobrerrepresentado en secuencias codificantes en genes en la célula hospedante, y un codón no preferido o menos preferido es un
55 codón subrepresentado en secuencias codificantes en genes en la célula hospedante, modificando de ese modo el ácido nucleico para incrementar su expresión en una célula hospedante.

60 La presente descripción proporciona métodos para modificar un codón en un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa para disminuir su expresión en una célula hospedante, comprendiendo el método (a) proporcionar un ácido nucleico de la invención que codifica una fosfolipasa; y, (b) identificar al menos un codón preferido en el ácido nucleico de la etapa (a) y sustituirlo por un codón no preferido o menos preferido que codifica el mismo aminoácido que el codón sustituido, en el que un codón preferido es un codón sobrerrepresentado en secuencias codificantes en genes en una célula hospedante, y un codón no preferido o menos preferido es un codón subrepresentado en secuencias codificantes en genes en la célula hospedante, modificando de ese modo el ácido nucleico para

disminuir su expresión en una célula hospedante. Como alternativa, la célula hospedante es una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de insecto, una célula de levadura, una célula vegetal, una célula de alga (algas), un líquen, o una célula de mamífero.

5 La presente descripción se refiere a métodos para producir una librería de ácidos nucleicos que codifica una pluralidad de sitios activos de fosfolipasa modificados o sitios de unión a sustrato, en el que los sitios activos modificados o sitios de unión a sustrato derivan de un primer ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un primer sitio activo o un primer sitio de unión a sustrato, comprendiendo el método: (a) proporcionar un primer ácido nucleico que codifica un primer sitio activo o un primer sitio de unión a sustrato, en el que la primera secuencia de ácido nucleico comprende un ácido nucleico como se describe aquí; (b) proporcionar un conjunto de oligonucleótidos mutagénicos que codifican variantes de aminoácidos de origen natural en una pluralidad de codones seleccionados como diana en el primer ácido nucleico; y, (c) usar el conjunto de oligonucleótidos mutagénicos para generar un conjunto de ácidos nucleicos variantes que codifican el sitio activo o que codifican el sitio de unión a sustrato que codifican un intervalo de variaciones de aminoácidos en cada codón de aminoácidos que se mutagenizó, produciendo de ese modo una librería de ácidos nucleicos que codifica una pluralidad de sitios activos de fosfolipasa modificados o sitios de unión a sustrato. En aspectos alternativos, el método comprende mutagenizar el primer ácido nucleico de la etapa (a) mediante un método que comprende un sistema de evolución dirigida optimizada, mutagénesis de saturación de sitio génico (GSSM), y reensamblaje de ligación sintética (SLR). El método puede comprender además mutagenizar el primer ácido nucleico de la etapa (a) o variantes mediante un método que comprende PCR propensa a errores, transposición de fragmentos, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis de PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis por inserción de casete, mutagénesis de conjunto recursiva, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica del sitio, reensamblaje génico, mutagénesis saturada de sitio génico (GSSM), reensamblaje de ligación sintética (SLR) y una combinación de los mismos. El método puede comprender además mutagenizar el primer ácido nucleico de la etapa (a) o variantes mediante un método que comprende recombinación, recombinación de secuencias recursiva, mutagénesis de ADN modificado con fosfotioato, mutagénesis de molde que contiene uracilo, mutagénesis de dúplex con saltos, mutagénesis de reparación de desemparejamiento de punto, mutagénesis de hebra de hospedante deficiente en la reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis de supresión, mutagénesis de restricción-selección, mutagénesis de restricción-purificación, síntesis génica artificial, mutagénesis de conjunto, creación de multímeros de ácidos nucleicos quiméricos, y una combinación de los mismos.

30 La invención proporciona métodos para hidrolizar, romper o disgregar una composición que comprende fosfolípidos, que comprenden proporcionar al menos un polipéptido de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa, o un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa codificado por al menos un ácido nucleico de la invención; proporcionar una composición que comprende un fosfolípido; y poner en contacto el polipéptido con la composición en condiciones en las que la fosfolipasa hidroliza, rompe o disgrega la composición que comprende fosfolípidos. Por ejemplo, el método comprende el uso de mezclamiento con alto cizallamiento de la composición, seguido de mezclamiento sin cizallamiento o con cizallamiento bajo con el al menos un polipéptido de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa para permitir la "puesta en contacto" adecuada del sustrato fosfolipídico con la fosfolipasa. El al menos un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa también puede estar presente en la etapa de mezclamiento con cizallamiento elevado. El procedimiento se puede poner en práctica en cualquier escala, por ejemplo una escala que comprende alrededor de 1 gramo (g) a alrededor de 500, 1000, 2000, 2500, 5000 g, o más, o cualquier cantidad en este intervalo.

45 La invención proporciona métodos para el desgomado de aceite, que comprenden las siguientes etapas: (a) proporcionar al menos un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, o el polipéptido es codificado por un ácido nucleico de la invención; (b) proporcionar una composición que comprende un aceite vegetal; y, (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) y el aceite vegetal de la etapa (b) en condiciones en las que el polipéptido puede escindir enlaces de éster en el aceite vegetal, desgomando de ese modo el aceite. En un aspecto, el aceite vegetal comprende oleaginoso. El aceite vegetal puede comprender aceites de salvado de arroz, aceite de palma, aceite de colza, aceite de maíz, aceite de haba de soja, aceite de cáñola, aceite de sésamo, aceite de cacahuete, o aceite de girasol. En un aspecto, el método comprende además la adición de una fosfolipasa de la invención, otra fosfolipasa, o una combinación de las mismas. En un aspecto, se añade al procedimiento más de un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, en el que al menos un polipéptido es una enzima de la invención. Por ejemplo, las enzimas se añaden en un orden específico, por ejemplo, se añaden PLCs con diferentes especificidades en un orden específico, por ejemplo en primer lugar se añade una enzima con actividad de PC y de PE (o se añaden juntas dos enzimas, una con actividad de PC y la otra con actividad de PE), y después se añade una enzima con actividad de PI PLC, o cualquier combinación de las mismas.

60 En un ejemplo del procedimiento de desgomado de aceite, la composición que comprende aceite comprende un aceite o grasa vegetal, un aceite o grasa animal, un aceite o grasa de algas o un aceite o grasa de pescado. El aceite vegetal puede comprender un aceite de salvado de arroz, un aceite de haba de soja, un aceite de colza, un aceite de maíz, un aceite de pepita de palma, un aceite de cáñola, un aceite de girasol, un aceite de sésamo o un aceite de cacahuete. El polipéptido puede hidrolizar un fosfátido de un fosfolípido hidratable y/o no hidratable en la composición que comprende aceite. En un aspecto, el polipéptido hidroliza un fosfátido en un enlace de fosfoéster de glicerilo para generar un diglicérido y un compuesto de fosfato soluble en agua. En un aspecto, el polipéptido

tiene una actividad de fosfolipasa C. Por ejemplo, el polipéptido es una fosfolipasa D, y también se añade una enzima de fosfatasa.

5 En un ejemplo del procedimiento de desgomado de aceite, la puesta en contacto comprende la hidrólisis de un fosfolípido hidratado en un aceite. Las condiciones de hidrólisis pueden comprender condiciones alcalinas, por ejemplo, las condiciones comprenden una temperatura de alrededor de 20°C a 40°C a un pH alcalino. Las condiciones alcalinas pueden comprender un pH de alrededor de pH 8 a pH 10, o más. Las condiciones de hidrólisis pueden volverse alcalinas en cualquier momento del procedimiento, por ejemplo se añade una fosfolipasa, tal como una PLC, antes de volver las condiciones alcalinas (por ejemplo, una "neutralización cáustica" de un aceite que comprende ácido, tal como ácido fosfatídico).

10 En un ejemplo del procedimiento de desgomado de aceite, la base provoca la isomerización de 1,2-DAG, producido por PLC, en 1,3-DAG, que proporciona un beneficio de salud nutricional con respecto a 1,2-DAG, por ejemplo el 1,3-DAG se quema como energía en lugar de ser almacenado como grasa (como lo es 1,2-DAG). De este modo, la descripción proporciona un procedimiento de refinado cáustico del aceite en el que se añade "inicialmente", es decir, antes de añadir cualquier ácido y cáustico, una fosfolipasa, por ejemplo una enzima de la invención, incluyendo una PLC, por ejemplo como se ilustra en el procedimiento ejemplar de la Figura 13. Una de las consecuencias de añadir la PLC al inicio del procedimiento de refinado cáustico de la invención (véase la discusión adicional, más abajo), y añadir el ácido y la sustancia cáustica subsiguientemente, es la generación de un nivel elevado de 1,3-DAG (no 1,2-DAG). Esto puede ser una consecuencia de la migración del acilo catalizada por ácidos o bases. Nutricionalmente, 1,3-DAG es mejor que 1,2-DAG. De este modo, la invención comprende un procedimiento de desgomado de aceite que usa una PLC de la invención, con lo que el producto oleoso desgomado final contiene no menos de alrededor de 20 0,5%, 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0% o 5,0% de 1,3-DAG.

25 En un ejemplo del procedimiento de desgomado de aceite, las condiciones de hidrólisis pueden comprender un tiempo de reacción de alrededor de 3 a 10 o más minutos. Las condiciones de hidrólisis pueden comprender la hidrólisis de fosfolípidos hidratables y no hidratables en aceite a una temperatura de entre alrededor de 50°C a 60°C, a un pH de alrededor de pH 5 a pH 6,5, o de alrededor de pH 5 a pH 7,5, o entre alrededor de pH 5 a pH 8,0, usando un tiempo de reacción de alrededor de 30 a 60 minutos.

En un ejemplo del procedimiento de desgomado de aceite, el polipéptido se une a un filtro, y la grasa o aceite que contiene fosfolípido se hace pasar a través del filtro. El polipéptido se puede añadir a una disolución que comprende la grasa o aceite que contiene fosfolípido, y después la disolución se hace pasar a través de un filtro.

30 En un ejemplo, el método de desgomado de aceite comprende además la retirada física de la goma producida mediante el procedimiento de desgomado añadiendo una sustancia de endurecimiento, por ejemplo talco o equivalente. Esto puede incrementar la ganancia de aceite.

35 La invención también proporciona métodos para convertir un fosfolípido no hidratable en una forma hidratable, que comprenden las siguientes etapas: (a) proporcionar un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, en el que el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de la invención, o el polipéptido está codificado por un ácido nucleico de la invención; (b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido no hidratable; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) y el polipéptido no hidratable de la etapa (b) en condiciones en las que el polipéptido puede escindir los enlaces de éster en el fosfolípido no hidratable, convirtiendo de ese modo un fosfolípido no hidratable en una forma hidratable.

40 La invención proporciona métodos para desgomar un aceite, que comprenden las siguientes etapas: (a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa o un polipéptido codificado con un ácido nucleico de la invención; (b) proporcionar una composición que comprende una grasa o un aceite que comprende un fosfolípido; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) y la composición de la etapa (b) en condiciones en las que el polipéptido puede desgomar la composición que comprende fosfolípido (en condiciones en las que el polipéptido de la invención puede catalizar la hidrólisis de un fosfolípido). Por ejemplo, la composición que comprende aceite comprende un aceite vegetal, un aceite animal, un aceite de algas o un aceite de pescado. El aceite vegetal puede comprender un aceite de salvado de arroz, un aceite de haba de soja, un aceite de colza, un aceite de maíz, un aceite de pepita de palma, un aceite de cáñola, un aceite de girasol, un aceite de sésamo o un aceite de cacahuete. El polipéptido puede hidrolizar un fosfátido de un fosfolípido hidratable y/o no hidratable en la composición que comprende aceite. El polipéptido puede hidrolizar un fosfátido en un enlace de fosfoéster de glicerilo para generar un diglicérido y un compuesto de fosfato soluble en agua. El polipéptido tiene una actividad de fosfolipasa C, B, A o D. Por ejemplo, se añaden una actividad de fosfolipasa D y una enzima de fosfatasa. La puesta en contacto puede comprender la hidrólisis de un fosfolípido hidratado en un aceite. Las condiciones de hidrólisis pueden comprender una temperatura de alrededor de 20°C a 40°C a un pH alcalino. Las condiciones alcalinas pueden comprender un pH de alrededor de pH 8 a pH 10. Las condiciones de hidrólisis pueden comprender un tiempo de reacción de alrededor de 3 a 10 minutos. Las condiciones de hidrólisis pueden comprender la hidrólisis de fosfolípidos hidratables y no hidratables en aceite a una temperatura de alrededor de 50°C a 60°C, a un pH de alrededor de pH 5 a pH 6,5 usando un tiempo de reacción de 55 alrededor de 30 a 60 minutos. El polipéptido puede estar unido a un filtro, y la grasa o aceite que contiene fosfolípido

se hace pasar a través del filtro. El polipéptido se puede añadir a una disolución que comprende la grasa o aceite que contiene fosfolípido, y después la disolución se hace pasar a través de un filtro.

5 La invención proporciona métodos para convertir un fosfolípido no hidratable en una forma hidratable, que comprenden las siguientes etapas: (a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa de la invención, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la invención; (b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido no hidratable; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) y la composición de la etapa (b) en condiciones en las que el polipéptido convierte el fosfolípido no hidratable en una forma hidratable. El polipéptido tiene una actividad de fosfolipasa C. El polipéptido tiene una actividad de fosfolipasa D, y también se añade una enzima de fosfatasa.

10 La invención proporciona métodos para refinar de forma cáustica una composición que contiene un fosfolípido, que comprenden las siguientes etapas: (a) proporcionar una composición que comprende una fosfolipasa, que puede ser un polipéptido de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la invención como se describe aquí; (b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) antes, durante o después del refinado cáustico. El polipéptido puede tener una actividad de fosfolipasa, por ejemplo, actividad PLC, PLB, PLD y/o PLA. El polipéptido se puede añadir antes del refinado cáustico, es decir, al "principio" del procedimiento, antes de añadir el ácido o material cáustico, como se ilustra en la Figura 13.

15 La composición que comprende el fosfolípido puede comprender una planta. El polipéptido se puede expresar transgénicamente en la planta. El polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa se puede añadir durante la trituración de una semilla u otra parte vegetal, o, el polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa se añade tras la trituración o antes del refinado.

20 También se proporciona un procedimiento de refinado cáustico para hidrolizar fosfolípidos en aceite (por ejemplo, aceite vegetal) usando un polipéptido como se describe aquí para generar diacilglicerol (DAG) y éster de fosfato soluble en agua. Por ejemplo, la enzima como se describe aquí debe operar en un procedimiento de refinado cáustico, incluyendo opcionalmente poco agua y/o en un intervalo de temperaturas de alrededor de 55°C a alrededor de 70°C. El uso de un procedimiento de refinado cáustico con poco agua en este intervalo de temperaturas maximizará el rendimiento al incrementar DAG y reducir el aceite arrastrado. Por ejemplo, la enzima usada en este procedimiento de refinado cáustico tiene actividad muy buena tanto sobre fosfatidilcolina (PC) como sobre fosfatidiletanolamina (PE), es activa entre un pH de alrededor de pH 6 a pH 9, es activa hasta 75°C, es activa en poco agua en aceite, por ejemplo alrededor de 2% a 5% de agua, por ejemplo la enzima codificada por la secuencia de SEC ID NO:177 o SEC ID NO:178 que tiene una o más mutaciones que codifican E41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R.

25 En otro ejemplo de procedimiento de refinado cáustico para hidrolizar fosfolípidos en aceites, se usan dos enzimas: una PLC específica de PI (hidroliza PI), y una PC-PLC que hidroliza PC, PE y PA. Esto genera aceite adecuado para el refinado químico o físico, y maximiza el incremento de rendimiento de DAG y menos aceite arrastrado.

30 La invención proporciona métodos para refinar un aceite bruto, que comprenden las siguientes etapas: (a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la invención; (b) proporcionar una composición que comprende un aceite que comprende un fosfolípido; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) en condiciones en las que el polipéptido puede catalizar la hidrólisis de un fosfolípido en la composición. El polipéptido puede tener una actividad de fosfolipasa C. El polipéptido que puede tener una actividad de fosfolipasa está en una disolución acuosa que se añade a la composición. El nivel de agua puede estar entre alrededor de 0,5 y 5%. El tiempo del proceso puede ser menor que alrededor de 2 horas, menor que alrededor de 60 minutos, menor que alrededor de 30 minutos, menor que 15 minutos, o menor que 5 minutos. Las condiciones de hidrólisis pueden comprender una temperatura de entre alrededor de 25°C-70°C. Las condiciones de hidrólisis pueden comprender el uso de materiales cáusticos. Se pueden usar disoluciones concentradas de material cáustico, por ejemplo más concentrada que el estándar industrial de 11%, para disminuir la masa de goma. Como alternativa, la disolución concentrada de material cáustico está entre alrededor de 12% y 50% concentrada, por ejemplo alrededor de 20%, 30%, 40%, 50%, o 60% o más concentrada.

35 Las condiciones de hidrólisis pueden comprender un pH de entre alrededor de pH 3 y pH 10, entre alrededor de pH 4 y pH 9, o entre alrededor de pH 5 y pH 8. Las condiciones de hidrólisis pueden comprender la adición de emulsionantes y/o el mezclamiento después de la puesta en contacto de la etapa (c). Los métodos pueden comprender la adición de un interruptor de la emulsión y/o calor o enfriamiento (por ejemplo, a entre alrededor de 4°C hasta alrededor de -20°C, o menor) para promover la separación de una fase acuosa. Los métodos pueden comprender desgomar antes de la etapa de puesta en contacto, para recoger la lecitina mediante centrifugación, y después añadir una PLC, una PLC y/o una PLA para eliminar fosfolípidos no hidratables. Los métodos pueden comprender el desgomado con agua de aceite bruto hasta menos de 10 ppm de fósforo para aceites comestibles, y el refinado físico subsiguiente hasta menos de alrededor de 50 ppm de fósforo para aceites de biodiésel. Los

métodos pueden comprender la adición de ácido para promover la hidratación de fosfolípidos no hidratables. Por ejemplo, la adición de ácido promueve la reducción del contenido de calcio y magnesio metálicos.

5 La descripción proporciona métodos para expresar fosfolipasa C que comprende proporcionar una cepa de *Pichia* con un fenotipo Mut⁺; insertar en la cepa de *Pichia* un ácido nucleico heterólogo que codifica fosfolipasa C; y cultivar la cepa de *Pichia* en condiciones en las que se exprese la fosfolipasa C. El método puede comprender adicionalmente suplementar las condiciones de cultivo con cinc. La invención también proporciona sistemas celulares, células aisladas y estirpes celulares para expresar fosfolipasa C que comprenden una cepa de *Pichia* de fenotipo Mut⁺ que comprende un ácido nucleico heterólogo que codifica fosfolipasa C enlazado operablemente a un promotor operable en la cepa de *Pichia*.

10 La descripción proporciona sistemas celulares de levadura resistentes a zeocina (por ejemplo, células de levadura, estirpes celulares, células individuales) para expresar una proteína heteróloga que comprende las etapas de proporcionar una célula de *Pichia* sp. (por ejemplo, *P. pastoris*) que comprende un ácido nucleico heterólogo capaz de expresar una proteína heteróloga; cultivar la célula en condiciones que comprenden zeocina a una concentración inicial; seleccionar células resistentes a la concentración inicial de zeocina, y volver a cultivar en condiciones que
15 comprenden una mayor concentración de zeocina; y seleccionar las células cultivadas en la etapa (c) resistentes a la mayor concentración de zeocina. Por ejemplo, la proteína heteróloga es una enzima, u opcionalmente una fosfolipasa, u opcionalmente una fosfolipasa C (PLC), por ejemplo una enzima de la invención.

La invención proporciona métodos para obtener un biocombustible, que comprende: (A) (a) proporcionar una enzima de fosfolipasa de la descripción, o una enzima de fosfolipasa codificada por una secuencia de ácido nucleico (polinucleotídica) de la descripción, o una enzima de fosfolipasa obtenida mediante un método de la presente descripción; (b) proporcionar una composición de biomasa que comprende un lípido o un éster de alquilo; (c) poner en contacto la enzima de fosfolipasa de (a) con la composición de biomasa de (b) para generar un biocombustible, o para transesterificar el lípido o éster de alquilo; (B) el método de (A), en el que el biocombustible es o comprende un biodiésel; (C) el método de (A) o (B), en el que la composición de biomasa que comprende un lípido o un éster de alquilo es o comprende un aceite vegetal y/o una grasa animal; (D) el método de cualquiera de (A) a (C), en el que la composición de biomasa que comprende un lípido o un éster de alquilo es, o comprende, un alga, un aceite vegetal, un aceite vegetal puro, un aceite vegetal virgen, un aceite vegetal residual, una grasa animal, una grasa, un sebo, una manteca o una grasa amarilla; o (E) el método de cualquiera de (A) a (D), en el que la enzima de fosfolipasa es, o comprende, un polipéptido que tiene una secuencia como se expone en cualquiera de SEC ID NO:1 a SEC ID NO:178, o cualquier combinación de los mismos.
20
25
30

La invención proporciona métodos para obtener biocombustibles:

(a) que comprenden:

(A)

35 (a) proporcionar la enzima de fosfolipasa de la invención, o la enzima de fosfolipasa codificada por la secuencia de ácido nucleico (polinucleótido) de la invención;

(b) proporcionar una composición de biomasa;

(c) poner en contacto la enzima de fosfolipasa de (a) con la composición de biomasa de (b) para generar un biocombustible, o para transesterificar el lípido o éster de alquilo;

(B) el método de (A), en el que el biocombustible es o comprende un biodiésel;

40 (C) el método de (A) o (B), en el que la composición de biomasa comprende un alga, un aceite vegetal, un aceite vegetal puro, un aceite vegetal virgen, un aceite vegetal residual, una grasa animal, una grasa, un sebo, una manteca o una grasa amarilla

un lípido o un éster de alquilo es, o comprende, un aceite vegetal y/o una grasa animal.

45 (b) que comprenden (i) una enzima de fosfolipasa de la invención, o una enzima de fosfolipasa codificada por una secuencia de ácido nucleico (polinucleótido) de la invención, o una enzima de fosfolipasa obtenida mediante un método de esta invención.

La invención proporciona una composición que comprende una biomasa que comprende: una enzima de fosfolipasa de la invención, o una enzima de fosfolipasa codificada por una secuencia de ácido nucleico (polinucleótido) de la invención. Por ejemplo, la biomasa es, o comprende, una biomasa animal, de algas y/o vegetal, o una biomasa que comprende lípido o lignocelulósica, o un material de desecho. Como alternativa, la biomasa es, o comprende, un bioetanol, biopropanol, biobutanol, biopropanol o un biometanol, o cualquier combinación de los mismos.
50

La invención proporciona una composición que comprende un producto a base de petróleo que comprende: una enzima de fosfolipasa de la invención, o una enzima de fosfolipasa codificada por una secuencia de ácido nucleico (polinucleótido) de la invención. Por ejemplo, el producto a base de petróleo comprende un aceite, un biodiésel o

una gasolina, o un bioetanol, biopropanol, biobutanol, biopropanol o un biometanol; o una mezcla de bioetanol, biopropanol, biobutanol, biopropanol, biometanol y/o biodiésel y gasolina.

5 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en los dibujos que se acompañan y la descripción más abajo. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán manifiestos a partir de la descripción y dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Se citan aquí todas las publicaciones, patentes, publicaciones de patentes, secuencias de GenBank y depósitos de ATCC.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos son ilustrativos de realizaciones de la invención.

10 La Figura 1 es un diagrama de bloques de un sistema de ordenador, como se describe con detalle, más abajo.

15 La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra un aspecto de un proceso 200 para comparar una nueva secuencia nucleotídica o proteica con una base de datos de secuencias a fin de determinar los niveles de homología entre la nueva secuencia y las secuencias en la base de datos, como se describe con detalle, más abajo.

La Figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un proceso en un ordenador para determinar si las secuencias son homólogas, como se describe con detalle, más abajo.

La Figura 4 es un diagrama de flujo que ilustra un aspecto de un proceso identificador para detectar la presencia de un rasgo en una secuencia, como se describe con detalle, más abajo.

20 Las Figuras 5A, 5B y 5C ilustran esquemáticamente un sistema modelo de dos fases para la simulación del desgomado mediado por PLC, como se describe con detalle en el Ejemplo 2, más abajo.

La Figura 6 ilustra esquemáticamente un proceso de refinado de aceite vegetal ejemplar usando las fosfolipasas de la invención.

25 La Figura 7 ilustra esquemáticamente un proceso de desgomado ejemplar de la invención para aceites físicamente refinados, como se explica con detalle, más abajo.

La Figura 8 ilustra esquemáticamente la hidrólisis de fosfátido con una fosfolipasa C de la invención, como se explica con detalle, más abajo.

30 La Figura 9 ilustra esquemáticamente un procedimiento de refinado cáustico ejemplar de la invención, e ilustra una realización alternativa que comprende la aplicación de una fosfolipasa C de la invención como un "Auxiliar del Refinado Cáustico" (Refinado Cáustico de Mezcla Larga), como se explica con detalle, más abajo.

La Figura 10 ilustra esquemáticamente la aplicación de una fosfolipasa C de la invención como un auxiliar del desgomado, como se explica con detalle, más abajo.

35 La Figura 11 es una gráfica que describe características seleccionadas de ácidos nucleicos y polipéptidos ejemplares de la invención, como se describe con mayor detalle, más abajo.

La Figura 12 ilustra esquemáticamente datos de un sistema de dos enzimas de la invención, como se describe en el Ejemplo 3, más abajo.

40 La Figura 13 ilustra esquemáticamente un procedimiento de refinado cáustico ejemplar de la invención, e ilustra una realización alternativa que comprende la aplicación de una fosfolipasa C de la invención como un "Auxiliar del Refinado Cáustico" (Refinado Cáustico de Mezclamiento Prolongado), como se explica con detalle, más abajo.

La Figura 14 ilustra otra variación de métodos de la invención en la que se usan dos etapas de centrifugación en el procedimiento, como se discute con detalle, más abajo.

45 La Figura 15 ilustra otra variación de métodos de la invención en la que se usan tres etapas de centrifugación en el procedimiento, como se discute con detalle, más abajo.

La Figura 16 ilustra otra variación ejemplar de este procedimiento que usa tratamiento ácido y que tiene una etapa de centrifugación antes de una etapa de desgomado, como se discute con detalle, más abajo.

La Figura 17 ilustra los resultados de los experimentos de digestión *in vitro*, en los que las variantes de fosfolipasa C de la invención, como se discute con detalle en el Ejemplo 4, más abajo.

- La Figura 18 ilustra los resultados de un cultivo de fermentador discontinuo usando una enzima ejemplar de la invención, como se discute con detalle en el Ejemplo 5, más abajo.
- 5 La Figura 19 ilustra los resultados de comparaciones de Velocidad de Captación de Oxígeno (“OUR”) de cultivos de cepas MutS de *P. pastoris* de la invención, como se discute con detalle en el Ejemplo 5, más abajo.
- La Figura 20 ilustra una comparación de perfil de consumo de metanol en cepas MutS de *P. pastoris* de la invención, como se discute con detalle en el Ejemplo 5, más abajo.
- La Figura 21 ilustra un perfil de “OUR” de un cultivo de una forma recombinante de la enzima PLC ejemplar de la invención SEC ID NO:2, como se discute con detalle en el Ejemplo 5, más abajo.
- 10 La Figura 22 ilustra resultados de un SDS-PAGE que muestra la calidad de la proteína PLC producida en un cultivo, y un perfil de OUR correspondiente, de un cultivo de una forma recombinante de la enzima PLC ejemplar de la invención SEC ID NO:2, como se discute con detalle en el Ejemplo 5, más abajo.
- La Figura 23 ilustra resultados de un SDS-PAGE que muestra la cantidad de PLC activa situada intracelularmente en un cultivo de una forma recombinante de la enzima PLC ejemplar de la invención SEC ID NO:2, como se discute con detalle en el Ejemplo 5 más abajo.
- 15 La Figura 24 ilustra una visualización de los cambios morfológicos en células de levadura asociados con PLC activa – una forma recombinante de la enzima PLC ejemplar de la invención SEC ID NO:2, como se discute con detalle en el Ejemplo 5, más abajo.
- La Figura 25 resume gráficamente datos que muestran el estado del comportamiento de la producción de PLC a TFT (tiempo de fermentación total) de 95 h en *Pichia* usando una enzima PLC ejemplar de la invención SEC ID NO:2, como se discute con detalle en el Ejemplo 5 más abajo.
- 20 La Figura 26 es un sumario de datos en forma de tabla a partir del cribado de expresión de colonias celulares adaptadas a zeocina ejemplares de la invención, como se discute con detalle en el Ejemplo 5, más abajo.
- La Figura 27 ilustra datos que muestran que los niveles de la proteína PLC fueron mayores en cultivos que comprenden colonias celulares ejemplares adaptadas a zeocina de la invención, como se discute con detalle en el Ejemplo 5, más abajo.
- 25 La Figura 28 ilustra datos que muestran una comparación del crecimiento de colonias adaptadas a zeo de la invención frente a control, como se discute con detalle en el Ejemplo 5, más abajo.
- La Figura 29 ilustra los resultados de un experimento de calentamiento que demuestra la termoestabilidad de la enzima ejemplar de la invención SEC ID NO:2, con las condiciones indicadas en la figura, como se discute con detalle en el Ejemplo 6, más abajo.
- 30 La Figura 30 ilustra datos de RMN que resumen el experimento de calentamiento que demuestra la termoestabilidad de la enzima ejemplar de la invención SEC ID NO:2, como se discute con detalle en el Ejemplo 6, más abajo.
- 35 Las Figuras 31, 32 y 33 ilustran datos que demuestran la estabilidad térmica de SEC ID NO:2 usando p-NPPC, en las condiciones mostradas en la figura, como se discute con detalle en el Ejemplo 6, más abajo.
- La Figura 34 ilustra datos que demuestran la estabilidad térmica de SEC ID NO:2 usando análisis de DSC, como se discute con detalle en el Ejemplo 6, más abajo.
- 40 La Figura 35 ilustra la fracción en peso de las especies de fosfolípidos (PL) individuales (PA, PE, PI y PC) con respecto al PL total que queda tras el tratamiento con las fosfolipasas mutantes de la invención.
- La Figura 36 ilustra los mutantes GSSM seleccionados para inclusión en la Librería GeneReassembly, que incluye fosfolipasas ejemplares de la invención.
- La Figura 37 ilustra un procedimiento de alcohol ejemplar que puede incorporar el uso de enzimas de esta invención.

45 Símbolos de referencia similares en los diversos dibujos indican elementos similares.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona fosfolipasas, por ejemplo polipéptidos que tienen una actividad fosfolipasa A, B, C, D, de patatina, de fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP) y/o de acil hidrolasa de lípido (LAH), o actividad equivalente, polinucleótidos que las codifican, y métodos para obtenerlas y usarlas. La invención proporciona 50 enzimas que escinden eficientemente el enlace de éster de fosfato de glicerol en aceites, tales como aceites

vegetales, por ejemplo fosfolípidos de oleaginosas, para generar una base fosforilada extraíble con agua y un diglicérido. Por ejemplo, las fosfolipasas de la invención tienen una actividad de acil hidrolasa de lípido (LAH). Como alternativa, las fosfolipasas de la invención pueden escindir enlaces de éster de glicerolfosfato en fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico, y/o esfingomielina, o una combinación de los mismos. Por ejemplo, una fosfolipasa de la invención es específica para uno o más sustratos específicos; por ejemplo, una enzima de la invención puede tener una especificidad de acción para PE y PC; PE y PI; PE y PS; PS y PE; PS y PI; PI y PE; PS, PI y PC; PE, PI y PC; o, PE, PS, PI y PC.

Una fosfolipasa de la invención (por ejemplo, polipéptidos que tienen una actividad de fosfolipasa A, B, C, D, de patatina, de fosfatasa de ácido fosfatídico (PAP) y/o de acil hidrolasa de lípido (LAH), o actividad equivalente) se puede usar para desgomar enzimáticamente aceites vegetales, debido a que el resto de fosfato es soluble en agua y fácil de eliminar. El producto diglicérido permanecerá en el aceite, y por lo tanto reducirá las pérdidas. Las PLCs de la invención se pueden usar además de o en lugar de las PLA1s y PLA2s en el desgomado de aceites comerciales, tales como en el proceso ENZYMAX®, en el que los fosfolípidos se hidrolizan mediante PLA1 y PLA2.

Por ejemplo, las fosfolipasas como se describen aquí son activas a una temperatura elevada y/o a una temperatura baja, o a lo largo de un amplio intervalo de temperaturas, por ejemplo pueden ser activas en las temperaturas que oscilan entre 20°C y 90°C, entre 30°C y 80°C, o entre 40°C y 70°C. La descripción también proporciona fosfolipasas que tienen actividad a pHs alcalinos o a pHs ácidos, por ejemplo acidez baja del agua. Las fosfolipasas pueden tener actividad a pHs ácidos tan bajos como pH 6,5, pH 6,0, pH 5,5, pH 5,0, pH 4,5, pH 4,0 y pH 3,5 o más ácidos (es decir, < pH 3,5). Las fosfolipasas pueden tener actividad a pHs alcalinos tan elevados como pH 7,5, pH 8,0, pH 8,5, pH 9,0, pH 9,5, pH 10 o más alcalinos (es decir, > pH 10). Por ejemplo, las fosfolipasas de la invención son activas en el intervalo de temperatura entre alrededor de 40°C y alrededor de 70°C, 75°C, u 80°C o más, en condiciones de baja actividad del agua (bajo contenido de agua).

La descripción también proporciona métodos para modificar adicionalmente las fosfolipasas ejemplares descritas aquí para generar enzimas con propiedades deseables. Por ejemplo, las fosfolipasas generadas por los métodos de la presente descripción pueden tener especificidades alteradas por sustratos, especificidades de unión a sustratos, patrones de escisión de sustratos, estabilidad térmica, perfil de pH/actividad, perfil de pH/estabilidad (tal como estabilidad incrementada a valores de pH bajos, por ejemplo pH < 6 o pH < 5, o elevados, por ejemplo pH > 9), estabilidad frente a la oxidación, dependencia de Ca²⁺, actividad específica, y similar. La descripción proporciona alterar cualquier propiedad de interés. Por ejemplo, la alteración puede dar como resultado una variante que, en comparación con una fosfolipasa progenitora, tiene un perfil de actividad a pH y temperatura alterados.

Por ejemplo, las fosfolipasas descritas aquí se usan en diversas etapas del procesamiento de aceites vegetales, tales como la extracción de aceites vegetales, particularmente en la eliminación de “gomas fosfolípicas” en un proceso denominado “desgomado de aceites”, como se describe aquí. La invención proporciona composiciones (por ejemplo, que comprenden enzimas de la invención) y procedimientos para la producción de aceites vegetales a partir de diversas fuentes, tales como aceite de salvado de arroz, habas de soja, colza, cacahuete, sésamo, girasol y maíz. Las enzimas fosfolipasa de la invención se pueden usar en lugar de PLA, por ejemplo fosfolipasa A2, en cualquier etapa de procesamiento de aceites vegetales.

El término “fosfolipasa” engloba enzimas que tienen cualquier actividad de fosfolipasa, por ejemplo que escinden un enlace de éster de fosfato de glicerol (que cataliza la hidrólisis de un enlace de éster de fosfato de glicerol), por ejemplo, en un aceite, tal como un aceite vegetal. La actividad de fosfolipasa de la invención puede generar una base fosforilada extraíble con agua y un diglicérido. La actividad de fosfolipasa descrita aquí también incluye la hidrólisis de enlaces de éster de fosfato de glicerol a temperaturas elevadas, temperaturas bajas, pHs alcalinos y a pHs ácidos. La expresión “una actividad de fosfolipasa” también incluye escindir un éster de fosfato de glicerol para generar una base fosforilada extraíble con agua y un diglicérido. La expresión “una actividad de fosfolipasa” también incluye cortar enlaces de éster entre glicerina y ácido fosfórico en fosfolípidos. La expresión “una actividad de fosfolipasa” también incluye otras actividades, tales como la capacidad para unirse a e hidrolizar un sustrato, tal como un aceite, por ejemplo un aceite vegetal, sustrato que también incluye fosfatidilcolinas vegetales y animales, fosfatidil-etanolaminas, fosfatidilserinas y esfingomielinas. La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de fosfolipasa C (PLC), una actividad de fosfolipasa A (PLA), tal como una actividad de fosfolipasa A1 o fosfolipasa A2; una actividad de fosfolipasa B (PLB), tal como una actividad de fosfolipasa B1 o fosfolipasa B2, incluyendo una actividad de lisofosfolipasa (LPL) y/o una actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA); una actividad de fosfolipasa D (PLD), tal como una actividad de fosfolipasa D1 o fosfolipasa D2; y/o una actividad de patatina, o cualquier combinación de las mismas. La actividad de fosfolipasa puede comprender la hidrólisis de una glucoproteína, por ejemplo como una glucoproteína encontrada en un tubérculo de patata o cualquier planta del género *Solanum*, por ejemplo *Solanum tuberosum*. La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad enzimática de patatina, tal como una actividad de esterasa de patatina (véase, por ejemplo, Jimenez (2002) Biotechnol. Prog. 18:635-640). La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de acil hidrolasa de lípido (LAH). La actividad de fosfolipasa puede ser específica para uno o más sustratos específicos; por ejemplo, una enzima de la invención puede tener una especificidad de acción para PE y PC; PE y PI; PE y PS; PS y PE; PS y PI; PI y PE; PS, PI y PC; PE, PI y PC; o, PE, PS, PI y PC, o cualquier combinación de las mismas.

- 5 Por ejemplo, una fosfolipasa de la invención puede tener actividad multifuncional, por ejemplo una combinación de una o más de las actividades enzimáticas descritas aquí. Por ejemplo, un polipéptido de la invención es enzimáticamente activo, pero carece de una actividad de lipasa o carece de cualquier actividad enzimática que afecta a una fracción de aceite neutro (triglicérido). Puede ser deseable usar tal polipéptido en un procedimiento particular, por ejemplo en un procedimiento de desgomado en el que es importante que la fracción de aceite neutro no sea dañada (disminuida, degradada, por ejemplo hidrolizada). De este modo, la descripción proporciona, por ejemplo, un procedimiento de desgomado que comprende usar un polipéptido como se describe, que tiene una actividad de fosfolipasa pero ninguna actividad de lipasa.
- 10 Las fosfolipasas PLC descritas aquí utilizan (por ejemplo, catalizan la hidrólisis de) una variedad de sustratos fosfolipídicos, incluyendo fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), y/o ácido fosfatídico o una combinación de los mismos. Además, estas enzimas pueden tener grados variables de actividad en las formas lisofosfolipídicas de estos fosfolípidos. Por ejemplo, las enzimas PLC pueden mostrar una preferencia por fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina como sustratos.
- 15 Las fosfolipasas PLC de fosfatidilinositol pueden utilizar una variedad de sustratos fosfolipídicos, incluyendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico, o una combinación de los mismos. Además, estas enzimas pueden tener grados variables de actividad sobre las formas lisofosfolipídicas de estos fosfolípidos. Las enzimas PLC de fosfatidilinositol descritas aquí pueden mostrar una preferencia por fosfatidilinositol como sustrato.
- 20 Las fosfolipasas PLD descritas aquí utilizan una variedad de sustratos fosfolipídicos, incluyendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico, o una combinación de los mismos. Además, estas enzimas pueden tener grados variables de actividad sobre las formas lisofosfolipídicas de estos fosfolípidos. Estas enzimas son útiles para llevar a cabo reacciones de transesterificación para producir fosfolípidos estructurados.
- 25 Una "secuencia codificante de" o una "secuencia codifica" un polipéptido o proteína particular es una secuencia de ácido nucleico que es transcrita y traducida en un polipéptido o proteína cuando se coloca bajo el control de secuencias reguladoras apropiadas.
- 30 La expresión "casete de expresión", como se usa aquí, se refiere a una secuencia nucleotídica que es capaz de efectuar la expresión de un gen estructural (es decir, una secuencia codificante proteica, tal como una fosfolipasa de la invención) en un hospedante compatible con tales secuencias. Un "vector" comprende un ácido nucleico que puede infectar, transfectar, transducir transitoria o permanentemente una célula (por ejemplo, plásmidos, virus, y similares; véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 5.217.879).
- 35 El término "gen" significa el segmento de ADN implicado en producir una cadena polipeptídica, incluyendo, *entre otras*, regiones que preceden y que siguen a la región codificante, tales como líderes y tráiler, promotores y potenciadores, así como, cuando sea aplicable, secuencias interventoras (intrones) entre segmentos codificantes individuales (exones).
- Las frases "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico", como se usan aquí, se refieren a un oligonucleótido, nucleótido, polinucleótido, o a un fragmento de cualquiera de estos, a ADN o ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, ARNi) de origen genómico o sintético.
- 40 Los términos "polipéptido" y "proteína", como se usan aquí, se refieren a aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos modificados distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. El término "polipéptido" también incluye péptidos y fragmentos polipeptídicos, motivos y similares. La expresión también incluye polipéptidos glucosilados. Los péptidos y polipéptidos de la invención también incluyen todas las formas "miméticas" y "peptidomiméticas".
- 45 Como se usa aquí, el término "aislado" significa que el material se elimina de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es de origen natural).
- 50 Como se usa aquí, el término "recombinante" significa que el ácido nucleico está adyacente a un ácido nucleico "de cadena principal" al que no está adyacente en su entorno natural. Por ejemplo, los ácidos nucleicos representan 5% o más del número de insertos de ácidos nucleicos en una población de "moléculas de cadena principal" de ácido nucleico. "Moléculas de cadena principal", como se usa aquí, incluyen ácidos nucleicos tales como vectores de expresión, ácidos nucleicos autorreplicantes, virus, ácidos nucleicos integrantes, y otros vectores o ácidos nucleicos usados para mantener o manipular un inserto de ácido nucleico de interés. Por ejemplo, los ácidos nucleicos enriquecidos representan 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más del número de insertos de ácidos nucleicos en la población de moléculas de cadena principal recombinantes. Polipéptidos o proteínas "recombinantes" se refiere a polipéptidos o proteínas producidos mediante técnicas de ADN recombinante; por ejemplo, producidos a partir de células transformadas mediante un constructo de ADN exógeno que codifica el polipéptido o proteína deseado. Polipéptidos o proteínas "sintéticos" son aquellos preparados mediante síntesis química, como se describe con más detalle, más abajo.
- 55

La expresión “sustancialmente idénticos”, en el contexto de dos ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias que tienen al menos 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99% de identidad de restos nucleotídicos o de aminoácidos (de secuencia), cuando se comparan y alinean en busca de la máxima correspondencia, como se mide usando uno cualquiera de un algoritmo de comparación de secuencias conocido, como se explica con detalle más abajo, o mediante inspección visual. Como alternativa, se proporcionan secuencias de ácido nucleico y polipeptídicas que tienen identidad sustancial con una secuencia ejemplar de la descripción, por ejemplo SEC ID NO:175 o SEC ID NO:176, que tienen una o más mutaciones que codifican E41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R, etc., a lo largo de una región de al menos alrededor de 100 restos, 150 restos, 200 restos, 300 restos, 400 restos, o una región que oscila entre alrededor de 50 restos hasta la longitud completa del ácido nucleico o polipéptido. Las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden ser sustancialmente idénticas a lo largo de toda la longitud de una región codificante polipeptídica.

Adicionalmente, una secuencia de aminoácidos “sustancialmente idéntica” es una secuencia que difiere de una secuencia de referencia en una o más sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, particularmente cuando tal sustitución se produce en un sitio que no es el sitio activo de la molécula, y con la condición de que el polipéptido retenga esencialmente sus propiedades funcionales. Una sustitución de aminoácidos conservativa, por ejemplo, sustituye un aminoácido por otro de la misma clase (por ejemplo, sustitución de un aminoácido hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina, o metionina, por otro, o sustitución de un aminoácido polar por otro, tal como una sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina). Uno o más aminoácidos se pueden suprimir, por ejemplo, de un polipéptido de fosfolipasa, dando como resultado la modificación de la estructura del polipéptido, sin alterar significativamente su actividad biológica. Por ejemplo, se pueden eliminar los aminoácidos amino- o carboxiterminales que no son necesarios para la actividad biológica de fosfolipasa. Las secuencias polipeptídicas modificadas como se describen se pueden ensayar en busca de la actividad biológica de fosfolipasa mediante cualquier número de métodos, incluyendo la puesta en contacto de la secuencia polipeptídica modificada con un sustrato de fosfolipasa y determinando si el polipéptido modificado disminuye la cantidad de sustrato específico en el ensayo o incrementa los bioproductos de la reacción enzimática de una fosfolipasa funcional con el sustrato, como se explica adicionalmente, más abajo.

Adicionalmente, una secuencia de aminoácidos “sustancialmente idéntica” es una secuencia que difiere de una secuencia de referencia en una o más sustituciones, supresiones o inserciones de aminoácidos conservativas o no conservativas, particularmente cuando tal sustitución se produce en un sitio que no es el sitio activo de la molécula, y con la condición de que el polipéptido retenga esencialmente sus propiedades funcionales. Una sustitución de aminoácidos conservativa, por ejemplo, sustituye un aminoácido por otro de la misma clase (por ejemplo, sustitución de un aminoácido hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina, o metionina, por otro, o sustitución de un aminoácido polar por otro, tal como una sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico, o glutamina por asparagina). Uno o más aminoácidos se pueden suprimir, por ejemplo, de un polipéptido de fosfolipasa, dando como resultado la modificación de la estructura del polipéptido, sin alterar significativamente su actividad biológica. Por ejemplo, se pueden eliminar los aminoácidos amino- o carboxiterminales que no son necesarios para la actividad biológica de fosfolipasa. Las secuencias polipeptídicas modificadas como se describen se pueden ensayar en busca de la actividad biológica de fosfolipasa mediante cualquier número de métodos, incluyendo la puesta en contacto de la secuencia polipeptídica modificada con un sustrato de fosfolipasa y determinando si el polipéptido modificado disminuye la cantidad de sustrato específico en el ensayo o incrementa los bioproductos de la reacción enzimática de una fosfolipasa funcional con el sustrato, como se explica adicionalmente, más abajo.

El término “variante” se refiere a polinucleótidos o polipéptidos de la invención modificados en uno o más pares de bases, codones, intrones, exones, o restos de aminoácidos (respectivamente) pero que todavía retienen la actividad biológica de una fosfolipasa de la invención. Las variantes se pueden producir mediante cualquier número de medios. Se incluyen aquí técnicas para producir fosfolipasas variantes que tienen actividad a un pH o temperatura, por ejemplo, que es diferente de una fosfolipasa de tipo salvaje.

La expresión “mutagénesis de saturación”, Gene Site Saturation Mutagenesis™ (GSSM) o “GSSM” incluye un método que usa cebadores oligonucleotídicos degenerados para introducir mutaciones de punto en un polinucleótido, como se describe con detalle, más abajo.

La expresión “sistema de evolución dirigida optimizada” o “evolución dirigida optimizada” incluye un método para reensamblar fragmentos de secuencias de ácidos nucleicos relacionadas, por ejemplo genes relacionados, y se explica con detalle, más abajo.

La expresión “reensamblaje de ligación sintética” o “SLR” incluye un método para ligar fragmentos oligonucleotídicos de una manera no estocástica, y se explica con detalle, más abajo.

Generación y manipulación de ácidos nucleicos

5 La invención proporciona ácidos nucleicos aislados y recombinantes (por ejemplo, las SEC ID NO:177 o SEC ID NO:178 ejemplares que tienen una mutación que codifica E41W, E41F o E41Y, y, preferiblemente, una o más mutaciones que codifican E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R), incluyendo casetes de expresión tales como vectores de expresión, que codifican los polipéptidos y fosfolipasas de la invención. La descripción también incluye métodos para descubrir nuevas secuencias de fosfolipasas usando los ácidos nucleicos de la invención. También se proporcionan métodos para modificar los ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, mediante reensamblaje de ligación sintético, sistema de evolución dirigida optimizada y/o mutagénesis de saturación.

10 Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener, aislar y/o manipular, por ejemplo, mediante clonación y expresión de librerías de ADNc, amplificación de ADN mensajero o genómico mediante PCR, y similar. Al poner en práctica los métodos de la invención, los genes homólogos se pueden modificar manipulando un ácido nucleico molde, como se describe aquí. La invención se puede poner en práctica conjuntamente con cualquier método o protocolo o dispositivo conocido en la técnica, que se describen bien en la bibliografía científica y de patentes.

15 Técnicas generales

Los ácidos nucleicos usados para practicar esta invención, ya sea ARN, ARNi, ácido nucleico antisentido, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o sus híbridos, se pueden aislar de una variedad de fuentes, se pueden manipular genéticamente, se pueden amplificar, y/o se pueden expresar/generar recombinantemente. Los polipéptidos recombinantes generados a partir de estos ácidos nucleicos se pueden aislar o clonar individualmente y se pueden ensayar para determinar una actividad deseada. Se puede usar cualquier sistema de expresión recombinante, incluyendo sistemas de expresión de células bacterianas, de mamíferos, de levaduras, de insectos o de plantas.

20 Como alternativa, estos ácidos nucleicos se pueden sintetizar *in vitro* mediante técnicas de síntesis química bien conocidas, como se describe, por ejemplo, en Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; patente U.S. n° 4.458.066.

30 Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes; véanse, por ejemplo, Sambrook, ed., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ª ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Parte I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

35 Otros medios útiles para obtener y manipular ácidos nucleicos usados para poner en práctica los métodos de la invención es la clonación a partir de muestras genómicas, y, si se desea, identificar y volver a clonar insertos aislados o amplificados a partir de, por ejemplo, clones genómicos o clones de ADNc. Las fuentes de ácido nucleico usadas en los métodos de la invención incluyen librerías de ADN genómico o de ADNc contenidas en, por ejemplo, cromosomas artificiales de mamíferos (MACs), véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n°s 5.721.118; 6.025.155; cromosomas artificiales humanos, véase, por ejemplo, Rosenfeld (1997) Nat. Genet. 15:333-335; cromosomas artificiales de levaduras (YAC); cromosomas artificiales bacterianos (BAC); cromosomas artificiales P1, véase, por ejemplo, Woon (1998) Genomics 50:306-316; vectores derivados de P1 (PACs), véase, por ejemplo, Kern (1997) Biotechniques 23:120-124; cósmidos, virus recombinantes, fagos o plásmidos.

Secuencias de control transcripcionales y traduccionales

45 La invención proporciona secuencias de ácido nucleico (por ejemplo, ADN) operablemente enlazadas a secuencia o secuencias de control de la expresión (por ejemplo, transcripcionales o traduccionales), por ejemplo promotores o potenciadores, para dirigir o modular la síntesis/expresión del ARN. La secuencia de control de la expresión puede estar en un vector de expresión. Los promotores bacterianos ejemplares incluyen *lacI*, *lacZ*, T3, T7, *gpt*, *lambda PR*, *PL* y *trp*. Los promotores eucariotas ejemplares incluyen CMV inmediato temprano, HSV timidina cinasa, SV40 temprano y tardío, LTRs de retrovirus, y metalotioneína I de ratón.

50 Los promotores adecuados para expresar un polipéptido en bacterias incluyen los promotores *lac* o *trp* de *E. coli*, el promotor *lacI*, el promotor *lacZ*, el promotor T3, el promotor T7, el promotor *gpt*, el promotor *lambda PR*, el promotor *lambda PL*, promotores de operones que codifican enzimas glucolíticas tales como 3-fosfoglicerato cinasa (PGK), y el promotor de fosfatasa ácida. Los promotores eucariotas incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de HSV timidina cinasa, promotores de choque térmico, el promotor de SV40 temprano y tardío, LTRs de retrovirus, y el promotor de metalotioneína I de ratón. También se pueden usar otros promotores conocidos que controlan la expresión de genes en células procariotas o eucariotas, o sus virus.

Vectores de expresión y vehículos de clonación

La invención proporciona vectores de expresión y vehículos de clonación que comprenden ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo secuencias que codifican las fosfatasa de la invención. Los vectores de expresión y los vehículos de clonación de la invención pueden comprender partículas víricas, baculovirus, fago, plásmidos, fagómidos, cósmidos, fósidos, cromosomas artificiales bacterianos, ADN vírico (por ejemplo de la vacuna, adenovirus, virus de la viruela, pseudorrabia y derivados de SV40), cromosomas artificiales a base de P1, plásmidos de levadura, cromosomas artificiales de levadura, y cualesquiera otros vectores específicos para hospedantes específicos de interés (tales como *Bacillus*, *Aspergillus* y levadura). Los vectores de la invención pueden incluir secuencias de ADN sintéticas, cromosómicas y no cromosómicas. Un gran número de vectores adecuados son conocidos por los expertos en la técnica, y están comercialmente disponibles.

10 Células hospedantes y células transformadas

La invención también proporciona una célula transformada que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención, por ejemplo una secuencia que codifica una fosfolipasa de la invención, un vector de la invención. La célula hospedante puede ser cualquiera de las células hospedantes familiares para los expertos en la técnica, incluyendo células procariotas, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células de mamífero, células de insecto, o células vegetales. Las enzimas de la invención se pueden expresar en cualquier célula hospedante, por ejemplo cualquier célula bacteriana, cualquier célula de levadura, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células bacterianas ejemplares incluyen cualquier especie dentro de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, incluyendo, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Las células fúngicas ejemplares incluyen cualquier especie de *Aspergillus*. Las células de levadura ejemplares incluyen cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Schwanniomyces*, incluyendo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de insecto ejemplares incluyen cualquier especie de *Drosophila*, incluyendo *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Las células de animales ejemplares incluyen CHO, COS o melanoma de Bowes, o cualquier estirpe celular de ratón o humana. La selección de un hospedante apropiado está dentro de las capacidades de aquellos expertos en la técnica.

El vector se puede introducir en las células hospedantes usando cualquiera de una variedad de técnicas, incluyendo transformación, transfección, transducción, infección vírica, pistolas génicas, o transferencia de genes mediada por Ti. Los métodos particulares incluyen transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, o electroporación (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)).

También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamíferos para expresar proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las estirpes COS-7 de fibroblastos de riñón de mono y otras estirpes celulares capaces de expresar proteínas a partir de un vector compatible, tales como las estirpes celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK.

35 Amplificación de ácidos nucleicos

En la práctica de la invención, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención, o ácidos nucleicos modificados, se pueden reproducir, por ejemplo, mediante amplificación. La descripción proporciona pares de secuencias cebadoras de amplificación para amplificar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos con una actividad de fosfolipasa. Por ejemplo, los pares de cebadores son capaces de amplificar secuencias de ácidos nucleicos de la invención. Un experto en la técnica puede diseñar pares de secuencias cebadoras de amplificación para cualquier parte de o para la longitud completa de estas secuencias.

Los métodos de amplificación también son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa PCR (véanse, por ejemplo, PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) y PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y., reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véanse, por ejemplo, Wu (1989) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117); amplificación de transcripción (véase, por ejemplo, Kwoh (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173); y replicación de secuencia autosostenida (véase, por ejemplo, Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874); amplificación mediante Q Beta replicasa (véase, por ejemplo, Smith (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491), ensayo de amplificación de Q-beta replicasa automatizado (véase, por ejemplo, Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271) y otras técnicas mediadas por ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véanse también Berger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; patente U.S. n^{os} 4.683.195 y 4.683.202; Sookninan (1995) Biotechnology 13:563-564.

Determinación del grado de identidad de secuencia

El grado de identidad de secuencia (homología) se puede determinar usando cualquier programa de ordenador y parámetros asociados, incluyendo aquellos descritos aquí, tales como BLAST 2.2.2. o FASTA versión 3.0t78, con los parámetros por defecto. En realizaciones alternativas, la identidad de secuencia puede ser a lo largo de una región de al menos alrededor de 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 restos consecutivos, o la longitud completa del ácido nucleico o polipéptido. El grado de identidad de secuencia (homología) se puede determinar

usando cualquier programa de ordenador y parámetros asociados, incluyendo los descritos aquí, tales como BLAST 2.2.2. o FASTA versión 3.0t78, con los parámetros por defecto.

La Figura 11 es una gráfica que describe características seleccionadas de ácidos nucleicos y fosfolípidos ejemplares de la invención, incluyendo la comparación de identidad de secuencia de las secuencias ejemplares con bases de datos públicas. Todas las secuencias descritas en la Figura 11 se han sometido a una búsqueda BLAST (como se describe con detalle, más abajo) frente a dos conjuntos de bases de datos. El primer conjunto de bases de datos está disponible de NCBI (National Center for Biotechnology Information). Todos los resultados de las búsquedas frente a estas bases de datos se encuentran en las columnas tituladas "Descripción NR", "Código de Acceso NR", "Valor NR" u "Organismo NR". "NR" se refiere a la base de datos nucleotídica no redundante mantenida por NCBI. Esta base de datos está compuesta de GenBank, actualizaciones de GenBank, y actualizaciones de EMBL. Las entradas en la columna "Descripción NR" se refieren a la línea de definición en cualquier registro NCBI, que incluye una descripción de la secuencia, tal como el organismo fuente, nombre del gen/nombre de la proteína, o alguna descripción de la función de la secuencia. Las entradas en la columna "Código de Acceso NR" se refieren al identificador único dado a un registro de secuencia. Las entradas en la columna "Valor NR" se refieren al valor esperado (Valor), que representa la probabilidad de que una puntuación de alineamiento tan buena como la encontrada entre la secuencia de consulta (las secuencias de la invención) y una secuencia de la base de datos se encontrase en el mismo número de comparaciones entre secuencias al azar como se realizó en la búsqueda BLAST presente. Las entradas en la columna "Organismo NR" se refieren al organismo fuente de la secuencia identificado como el resultado BLAST más próximo. El segundo conjunto de bases de datos se conoce colectivamente como la base de datos Geneseq™, que está disponible de Thomson Derwent (Philadelphia, PA). Todos los resultados de búsquedas frente a esta base de datos se encuentran en las columnas tituladas "Descripción de Proteína Geneseq", "Código de Acceso de Proteína Geneseq", "Valor de Proteína Geneseq", "Descripción de ADN Geneseq", "Código de Acceso ADN Geneseq" o "Valor ADN Geneseq". La información encontrada en estas columnas es comparable a la información encontrada en las columnas NR descritas anteriormente, excepto que se derivó de búsquedas BLAST frente a la base de datos Geneseq™ en lugar de las bases de datos de NCBI. Además, esta tabla incluye la columna "Número EC Predicho". Un número EC es el número asignado a un tipo de enzima según un esquema de nomenclatura enzimática estandarizada desarrollada por la Enzyme Commission of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB). Los resultados en la columna "Número EC Predicho" se determinan mediante una búsqueda BLAST frente a la base de datos Kegg (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Si el emparejamiento BLAST superior tiene un Valor igual o menor que e^{-6} , el número EC asignado al emparejamiento superior se introduce en la tabla. El número EC del resultado superior se usa como una guía para lo que puede ser el número EC de la secuencia de la invención. Las columnas "Longitud ADN Consulta" y "Longitud Proteína Consulta" se refieren al número de nucleótidos o al número de aminoácidos, respectivamente, en la secuencia de la invención que se buscó o consultó frente a cualquiera de las bases de datos NCBI o Geneseq. Las columnas "Longitud ADN Geneseq o NR" y "Longitud Proteína Geneseq o NR" se refieren a los nucleótidos o el número de aminoácidos, respectivamente, en la secuencia del emparejamiento superior de la búsqueda BLAST. Los resultados proporcionados en esta columna proceden de la búsqueda que devolvió el Valor más bajo, ya sea de las bases de datos de NCBI o de la base de datos de Geneseq. Las columnas "%ID Proteína Geneseq o NR" y "%ID ADN Geneseq o NR" se refieren al porcentaje de identidad de secuencia entre la secuencia de la invención y la secuencia del emparejamiento BLAST superior. Los resultados proporcionados en esta columna proceden de la búsqueda que devolvió el Valor más bajo, ya sea de las bases de datos de NCBI o de la base de datos de Geneseq.

Las secuencias homólogas también incluyen secuencias de ARN en las cuales las uridinas sustituyen a las timidinas en las secuencias de ácidos nucleicos. Las secuencias homólogas se pueden obtener usando cualquiera de los procedimientos descritos aquí, o pueden resultar de la corrección de un error de secuenciación. Se apreciará que las secuencias de ácidos nucleicos como se exponen aquí se pueden representar en el formato de un solo carácter tradicional (por ejemplo, véase Stryer, Lubert. Biochemistry, 3ª Ed., W. H Freeman & Co., Nueva York) o en cualquier otro formato que registre la identidad de los nucleótidos en una secuencia.

Se usan diversos programas de comparación de secuencias identificados aquí. Las identidades de las secuencias proteicas y/o de ácidos nucleicos (homologías) se pueden evaluar usando cualquiera de la variedad de los algoritmos y programas de comparación de secuencias conocidos en la técnica. Tales algoritmos y programas incluyen, pero no se limitan a, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, y CLUSTALW (Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448, 1988; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680, 1994; Higgins et al., Methods Enzymol. 266:383-402, 1996; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., Nature Genetics 3:266-272, 1993).

La homología o identidad se puede medir usando el software de análisis de secuencias (por ejemplo, Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, Universidad de Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Tal software empareja secuencias similares asignando grados de homología a diversas supresiones, sustituciones y otras modificaciones. Los términos "homología" e "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales cuando se comparan y alinean en busca de la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación o región designada según se mide usando cualquier número de algoritmos de comparación de

secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Para la comparación de las secuencias, una secuencia puede actuar como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Se pueden usar los parámetros por defecto del programa, o se pueden diseñar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", como se usa aquí, incluye la referencia a un segmento de uno cualquiera del número de restos contiguos. Por ejemplo, restos contiguos que oscilan entre cualquiera de 20 a la longitud completa de una secuencia ejemplar de la invención se comparan con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén óptimamente alineadas. Si la secuencia de referencia tiene la identidad de secuencia requerida con una secuencia ejemplar de la invención, por ejemplo, una identidad de secuencia de 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más con una secuencia de la invención, esa secuencia está dentro del alcance de la invención. Como alternativa, subsecuencias que oscilan desde alrededor de 20 hasta 600, alrededor de 50 hasta 200, y alrededor de 100 hasta 150 se comparan con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén óptimamente alineadas. Los métodos de alineamiento de secuencia para la comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede realizar, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual. Otros algoritmos para determinar homología o identidad incluyen, por ejemplo, además de un programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool en el National Center for Biological Information), ALIGN, AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences), AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment), ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node), BLIMPS (Blocks IMProved Searcher), FASTA, Intervals & Points, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, el algoritmo de Smith-Waterman, DARWIN, algoritmo de Las Vegas, FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool), Framealign, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package), GAP (Global Alignment Program), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Sensitive Sequence Comparison), LALIGN (Local Sequence Alignment), LCP (Local Content Program), MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench), MAP (Multiple Alignment Program), MBLKP, MBLKN, PIMA (Pattern-Induced Multi-sequence Alignment), SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) y WHAT-IF. Tales programas de alineamiento se pueden usar también para cribar bases de datos genómicas para identificar secuencias polinucleotídicas que tienen secuencias sustancialmente idénticas. Está disponible un gran número de bases de datos genómicas, por ejemplo una porción sustancial del genoma humano que está disponible como parte del Human Genome Sequencing Project (Gibbs, 1995). Se han secuenciado varios genomas, por ejemplo *M. genitalium* (Fraser et al., 1995), *M. jannaschii* (Bult et al., 1996), *H. influenzae* (Fleischmann et al., 1995), *E. coli* (Blattner et al., 1997), y levadura (*S. cerevisiae*) (Mewes et al., 1997), y *D. melanogaster* (Adams et al., 2000). También se ha hecho un progreso significativo a la hora de secuenciar el genoma de organismos modelo, tales como el ratón, *C. elegans*, y *Arabidopsis sp.* Las bases de datos que contienen información genómica anotadas con cierta información funcional están mantenidas por diversas organizaciones, y son accesibles vía internet.

Los algoritmos BLAST, BLAST 2.0 y BLAST 2.2.2 también se usan para la práctica de la invención. Se describen, por ejemplo, en Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. El software para llevar a cabo los análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica identificar en primer lugar pares de secuencias de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que coinciden o satisfacen cierta puntuación umbral T de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de datos. T se define como el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul (1990) más arriba). Estos resultados de palabra vecina iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largos que los contienen. Los resultados de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como se pueda incrementar la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias nucleotídicas, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los resultados de palabra en cada dirección se detiene cuando la puntuación de alineamiento acumulativo cae en la cantidad X desde su valor máximo logrado; la puntuación acumulativa va hasta cero o por debajo, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cada secuencia. Los parámetros W , T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) usa como defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de

ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defecto una longitud de palabra de 3, y expectativas (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$, y una comparación de ambas hebras. El algoritmo BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual se produciría por casualidad un emparejamiento entre dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que alrededor de 0,2, más preferiblemente menor que alrededor de 0,01, y lo más preferible menor que alrededor de 0,001. Las homologías de secuencia proteica y de ácido nucleico se evalúan usando el Basic Local Alignment Search Tool ("BLAST"). Por ejemplo, se pueden usar cinco programas BLAST específicos para llevar a cabo la siguiente tarea: (1) BLASTP y BLAST3 comparan una secuencia de búsqueda de aminoácidos frente a una base de datos de secuencias proteicas; (2) BLASTN compara una secuencia de búsqueda nucleotídica frente a una base de datos de secuencias nucleotídicas; (3) BLASTX compara los productos de traducción conceptual de seis marcos de una secuencia nucleotídica de búsqueda (ambas hebras) frente a una base de datos de secuencias proteicas; (4) TBLASTN compara una secuencia proteica de búsqueda frente a una base de datos de secuencias nucleotídicas traducida en los seis marcos de lectura (ambas hebras); y (5) TBLASTX compara las traducciones de seis marcos de una secuencia de búsqueda nucleotídica frente a las traducciones de seis marcos de una base de datos de secuencias nucleotídicas. Los programas BLAST identifican secuencias homólogas identificando segmentos similares, que se denominan aquí como "pares de segmentos de puntuación elevada", entre una secuencia de búsqueda de aminoácidos o de ácido nucleico y una secuencia de ensayo que se obtiene preferiblemente de una base de datos de secuencias proteicas o de ácidos nucleicos. Los pares de segmentos de puntuación elevada se identifican preferiblemente (es decir, se alinean) por medio de una matriz de puntuación, muchas de las cuales son conocidas en la técnica. Preferiblemente, la matriz de puntuación usada es la matriz BLOSUM62 (Gonnet et al., Science 256:1443-1445, 1992; Henikoff y Henikoff, Proteins 17:49-61, 1993). Menos preferiblemente, también se usan las matrices PAM o PAM250 (véase, por ejemplo, Schwartz y Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation).

Para determinar si un ácido nucleico tiene la identidad de secuencia requerida para que esté dentro del alcance de la invención, se usan los programas de NCBI BLAST 2.2.2, opciones por defecto frente a blastp. Hay alrededor de 38 opciones de ajuste en el problema BLAST 2.2.2. Por ejemplo, se usan todos los valores por defecto, excepto para el ajuste de filtro por defecto (es decir, todos los parámetros se ajustan por defecto excepto el filtrado, que se ajusta a OFF); en su lugar, se usa un ajuste "-F", que deshabilita el filtrado. El uso del filtrado por defecto da a menudo como resultado violaciones de Karlin-Altschul, debido a la longitud corta de la secuencia.

Los valores por defecto usados en esta descripción ejemplar, y para determinar los valores en la Figura 11, como se explica anteriormente, incluyen:

"Filtro para baja complejidad: ON

> Tamaño de palabra: 3

> Matriz: Blosum62

> Costes de salto: Existencia: 11

> Extensión: 1"

Otros ajustes por defecto son: ajuste para baja complejidad OFF, tamaño de palabra de 3 para proteína, matriz BLOSUM62, penalización de existencia de salto de -11 y penalización de extensión de salto de -1.

En el Ejemplo 1, más abajo, se expone un programa ejemplar de NCBI BLAST 2.2.2. Obsérvese que la opción "-W" está por defecto en 0. Esto significa que, si no se ajusta, el tamaño de palabra está por defecto en 3 para proteína y 11 para nucleótidos.

Sistemas de ordenador y productos de programas de ordenador

Para determinar e identificar identidades de secuencia, homologías estructurales, motivos y similar *in silico*, una secuencia polipeptídica o de ácido nucleico de la invención se puede almacenar, registrar y manipular en cualquier medio que se pueda leer y acceder mediante un ordenador. En consecuencia, se proporcionan ordenadores, sistemas de ordenador, medios legibles por ordenador, productos de programa de ordenador, y similares, registrados o almacenados en ellos, las secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención, por ejemplo una secuencia ejemplar de la invención,. Como se usa aquí, las palabras "registrados" y "almacenados" se refieren a un proceso de almacenar información en un medio de ordenador. Un experto puede adoptar fácilmente cualesquiera métodos conocidos para registrar información en un medio legible por ordenador para generar productos que comprenden una o más de las secuencias de ácidos nucleicos y/o polipeptídicas de la invención.

Los medios legibles por ordenador pueden ser un disco duro, un disco flexible, una cinta magnética, una memoria ultrarrápida, CD-ROM, Disco Versátil Digital (DVD), Memoria de Acceso Aleatorio (RAM), o Memoria Sólo de Lectura (ROM), o cualquier tipo de medio conocido por los expertos en la técnica.

5 Se proporcionan sistemas (por ejemplo, sistemas a base de internet), particularmente sistemas de ordenador, que pueden almacenar y manipular las secuencias y la información de secuencia descritas aquí. Un ejemplo de un sistema **100** de ordenador se ilustra en forma de diagrama de bloques en la Figura 1. Como se usa aquí, “un sistema de ordenador” se refiere a los componentes de hardware, componentes de software, y componentes de almacenamiento de datos usados para analizar una secuencia nucleotídica o polipeptídica de la invención. El sistema **100** de ordenador puede incluir un procesador para procesar, acceder y manipular los datos de secuencia. El procesador **105** puede ser cualquier tipo bien conocido de unidad procesadora central, tal como, por ejemplo, la Pentium III de Intel Corporation, o procesador similar de Sun, Motorola, Compaq, AMD o International Business Machines. El sistema **100** de ordenador es un sistema de fines generales que comprende el procesador **105** y uno o más componentes **110** de almacenamiento de datos interno para almacenar datos, y uno o más dispositivos de recuperación de datos para recuperar los datos almacenados en los componentes de almacenamiento de datos. Un experto puede apreciar fácilmente que son adecuados cualquiera de los sistemas de ordenador actualmente disponibles.

El sistema **100** de ordenador incluye un procesador **105** conectado a un bus que está conectado a una memoria principal **115** (preferiblemente implementada como RAM) y uno o más dispositivos **110** de almacenamiento de datos internos, tales como un disco duro y/u otro medio legible por ordenador que tiene los datos registrados en él. El sistema **100** de ordenador puede incluir además uno o más dispositivos **118** de recuperación de datos para leer los datos almacenados en los dispositivos **110** de almacenamiento de datos internos.

El dispositivo **118** de recuperación de datos puede representar, por ejemplo, una unidad de disco flexible, una unidad de disco compacto, una unidad de cinta magnética, o un módem capaz de conectarse a un sistema de almacenamiento de datos remoto (por ejemplo, vía internet), etc. En algunas realizaciones, el dispositivo **110** de almacenamiento de datos interno es un medio legible por ordenador retirable tal como un disco flexible, un disco compacto, una cinta magnética, etc., que contiene la lógica de control y/o datos registrados en ellos. El sistema **100** de ordenador puede incluir ventajosamente o se puede programar mediante software apropiado para leer la lógica de control y/o los datos a partir del componente de almacenamiento de datos una vez insertado en el dispositivo de recuperación de datos.

El sistema **100** de ordenador incluye una pantalla **120** que se usa para presentar el resultado a un usuario de ordenador. También se debería observar que el sistema **100** de ordenador se puede enlazar a otros sistemas **125a-c** de ordenador en una red o red de área amplia, para proporcionar un acceso centralizado al sistema **100** de ordenador. El software para acceder y procesar las secuencias nucleotídicas o de aminoácidos de la invención puede residir en la memoria principal **115** durante la ejecución.

El sistema **100** de ordenador puede comprender además un algoritmo de comparación de secuencias para comparar una secuencia de ácido nucleico de la invención. El algoritmo y la secuencia o secuencias se pueden almacenar en un medio legible por ordenador. Un “algoritmo de comparación de secuencias” se refiere a uno o más programas que se implementan (local o remotamente) en el sistema **100** de ordenador para comparar una secuencia nucleotídica con otras secuencias nucleotídicas y/o compuestos almacenados en un medio de almacenamiento de datos. Por ejemplo, el algoritmo de comparación de secuencias puede comparar las secuencias nucleotídicas de una secuencia ejemplar almacenadas en un medio legible por ordenador, con secuencias de referencia almacenadas en un medio legible por ordenador, para identificar homologías o motivos estructurales.

Los parámetros usados con los algoritmos anteriores se pueden adaptar dependiendo de la longitud de la secuencia y el grado de homología estudiada. Los parámetros pueden ser los parámetros por defecto usados por los algoritmos en ausencia de instrucciones por parte del usuario. La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra un aspecto de un proceso **200** para comparar una nueva secuencia nucleotídica o proteica con una base de datos de secuencias a fin de determinar los niveles de homología entre la nueva secuencia y las secuencias en la base de datos. La base de datos de secuencias puede ser una base de datos privada almacenada en el sistema **100** de ordenador, o una base de datos pública tal como GENBANK que está disponible a través de Internet. El proceso **200** comienza en el estado **201** de partida y después continúa a un estado **202**, en el que la nueva secuencia a comparar se almacena en una memoria en un sistema **100** de ordenador. Como se explica anteriormente, la memoria podría ser cualquier tipo de memoria, incluyendo RAM o un dispositivo de almacenamiento interno.

El proceso **200** continúa entonces a un estado **204** en el que una base de datos de secuencias se abre para el análisis y comparación. El proceso **200** continúa entonces a un estado **206** en el que la primera secuencia almacenada en la base de datos se lee en una memoria en el ordenador. Después se lleva a cabo una comparación en un estado **210** para determinar si la primera secuencia es la misma que la segunda secuencia. Es importante observar que esta etapa no está limitada a llevar a cabo una comparación exacta entre la nueva secuencia y la primera secuencia en la base de datos. Aquellos expertos en la técnica conocen métodos bien conocidos para comparar dos secuencias nucleotídicas o proteicas, incluso si no son idénticas. Por ejemplo, se pueden introducir saltos en una secuencia a fin de elevar el nivel de homología entre las dos secuencias ensayadas. Los parámetros

que controlan si se introducen saltos u otras características en una secuencia durante la comparación son introducidos normalmente por el usuario del sistema de ordenador.

Una vez que se ha llevado a cabo una comparación de las dos secuencias en el estado **210**, se realiza una determinación en un estado **210** de decisión sobre si las dos secuencias son iguales. Por supuesto, el término "iguales" no está limitado a secuencias que son absolutamente idénticas. Las secuencias que están dentro de los parámetros de homología introducidos por el usuario se marcarán como "iguales" en el proceso **200**. Si se realiza una determinación de que las dos secuencias son iguales, el proceso **200** continúa hasta un estado **214**, en el que se presenta al usuario el nombre de la secuencia de la base de datos. Este estado notifica al usuario que la secuencia con el nombre presentado cumple las restricciones de homología que se introdujeron. Una vez que se presenta al usuario el nombre de la secuencia almacenada, el proceso **200** continúa a un estado **218** de decisión, en el que se realiza una determinación sobre si existen más secuencias en la base de datos. Si no existen más secuencias en la base de datos, entonces el proceso **200** termina en el estado **220** final. Sin embargo, si existen más secuencias en la base de datos, entonces el proceso **200** continúa a un estado **224**, en el que un puntero se mueve a la siguiente secuencia en la base de datos de manera que se puede comparar con la nueva secuencia. De esta manera, la nueva secuencia se alinea y compara con cada secuencia en la base de datos.

Se debería señalar que si se ha hecho una determinación en el estado **212** de decisión de que las secuencias no fueron homólogas, entonces el proceso **200** continuaría inmediatamente al estado **218** de decisión a fin de determinar si cualesquiera otras secuencias estaban disponibles en la base de datos para comparación. En consecuencia, se proporciona un sistema de ordenador que comprende un procesador, un dispositivo de almacenamiento de datos que tiene almacenado en él una secuencia de ácido nucleico de la invención, y un comparador de secuencias para llevar a cabo la comparación. El comparador de secuencias puede indicar un nivel de homología entre las secuencias comparadas o identificar motivos estructurales, o puede identificar motivos estructurales en secuencias que se comparan con estos códigos de ácido nucleico y códigos polipeptídicos.

La Figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un proceso **250** en un ordenador para determinar si dos secuencias son homólogas. El proceso **250** comienza en un estado **252** de partida y continúa entonces hacia un estado **254**, en el que una primera secuencia a comparar se almacena en una memoria. La segunda secuencia a comparar se almacena entonces en una memoria en un estado **256**. El proceso **250** continúa entonces hacia un estado **260**, en el que el primer carácter en la primera secuencia se lee, y después hacia un estado **262**, en el que se lee el primer carácter de la segunda secuencia. Se debería entender que si la secuencia es una secuencia nucleotídica, entonces el carácter sería normalmente A, T, C, G o U. Si la secuencia es una secuencia proteica, entonces puede ser un código de aminoácido de una sola letra, de manera que las secuencias primera y segunda se pueden comparar fácilmente. Entonces se realiza una determinación en un estado **264** de decisión sobre si los dos caracteres son iguales. Si son iguales, entonces el proceso **250** continúa hacia un estado **268**, en el que se leen los siguientes caracteres en las secuencias primera y segunda. Entonces se realiza una determinación sobre si los siguientes caracteres son iguales. Si lo son, entonces el proceso **250** continúa este bucle hasta que dos caracteres no son iguales. Si se realiza una determinación de que los siguientes dos caracteres no son iguales, el proceso **250** continúa hacia un estado **274** de decisión para determinar si hay más caracteres en cualquier secuencia a leer. Si no hay más caracteres a leer, entonces el proceso **250** continúa hacia un estado **276**, en el que se presenta al usuario el nivel de homología entre las secuencias primera y segunda. El nivel de homología se determina calculando la proporción de caracteres entre las secuencias que fueron las mismas del número total de secuencias en la primera secuencia. De este modo, si cada carácter en una primera secuencia de 100 nucleótidos se alinea con cada carácter en una segunda secuencia, el nivel de homología sería 100%.

Como alternativa, el programa de ordenador puede comparar una secuencia de referencia con una secuencia de la invención para determinar si las secuencias difieren en una o más posiciones. El programa puede registrar la longitud e identidad de nucleótidos o restos de aminoácidos insertados, suprimidos o sustituidos, con respecto a la secuencia de la referencia o de la invención. El programa de ordenador puede ser un programa que determine si una secuencia de referencia contiene un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con respecto a una secuencia de la invención, o si una secuencia de la invención comprende un SNP de una secuencia conocida. De este modo, el programa de ordenador es un programa que identifica SNPs. El método se puede implementar mediante los sistemas de ordenador descritos anteriormente y el método ilustrado en la Figura 3. El método se puede llevar a cabo leyendo una secuencia de la invención y las secuencias de referencia a través del uso del programa de ordenador, e identificando diferencias con el programa de ordenador.

El sistema a base de ordenador puede comprender un identificador para identificar características en un ácido nucleico o polipéptido de la invención. Un "identificador" se refiere a uno o más programas que identifica ciertas características en una secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un identificador puede comprender un programa que identifica un marco de lectura abierto (ORF) en una secuencia de ácido nucleico. La Figura 4 es un diagrama de flujo que ilustra un aspecto de un proceso **300** identificador para detectar la presencia de una característica en una secuencia. El proceso **300** comienza en un estado **302** de partida y continúa entonces hacia un estado **304** en el que una primera secuencia que se va a comprobar en busca de características se almacena en una memoria **115** en el sistema **100** de ordenador. El proceso **300** continúa entonces hacia un estado **306**, en el que se abre una base de datos de características de secuencias. Tal base de datos incluye una lista de cada atributo de la característica junto con el nombre de la característica. Por ejemplo, un nombre característico podría ser "Codón de Iniciación", y el

atributo sería "ATG". Otro ejemplo sería el nombre característico "Caja TAATAA", y el atributo de la característica sería "TAATAA". Un ejemplo de tal base de datos se produce por el University of Wisconsin Genetics Computer Group. Como alternativa, las características pueden ser motivos polipeptídicos estructurales tales como hélices alfa, láminas beta, o motivos polipeptídicos funcionales tales como sitios activos enzimáticos, motivos de hélice-vuelta-hélice u otros motivos conocidos por los expertos en la técnica. Una vez que la base de datos de las características se abre en el estado **306**, el proceso **300** continúa hacia un estado **308** en el que la primera característica se lee de la base de datos. Entonces se lleva a cabo en un estado **310** una comparación del atributo de la primera característica con la primera secuencia. Entonces se realiza una determinación en un estado **316** de decisión sobre si el atributo de la característica se encontró en la primera secuencia. Si se encontró el atributo, entonces el proceso **300** continúa hacia un estado **318**, en el que se presenta al usuario el nombre de la característica encontrada. El proceso **300** continúa entonces hacia un estado **320** de decisión, en el que se realiza una determinación sobre si existen más características en la base de datos. Si no existen características, entonces el proceso **300** termina en un estado final **324**. Sin embargo, si existen más características en la base de datos, entonces el proceso **300** lee la siguiente característica de secuencia en una etapa **326** y vuelve nuevamente al estado **310**, en el que el atributo de la siguiente característica se compara frente a la primera secuencia. Si no se encuentra el atributo de la característica en la primera secuencia en el estado **316** de decisión, el proceso **300** continúa directamente al estado **320** de decisión a fin de determinar si existen más características en la base de datos. De este modo, se proporciona un programa de ordenador que identifica marcos de lectura abiertos (ORFs).

Una secuencia polipeptídica o de ácido nucleico de la invención se puede almacenar y manipular en una variedad de programas procesadores de datos en una variedad de formatos. Por ejemplo, una secuencia se puede almacenar como texto en un archivo de procesamiento de palabras, tal como MicrosoftWORD o WORDPERFECT, o como un archivo ASCII en una variedad de programas de bases de datos familiares para los expertos en la técnica, tales como DB2, SYBASE, u ORACLE. Además, muchos programas de ordenador y bases de datos se pueden usar como algoritmos de comparación de secuencias, identificadores, o fuentes de secuencias nucleotídicas o secuencias polipeptídicas de referencia a comparar con una secuencia de ácido nucleico de la invención. Los programas y bases de datos usados para la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a: MacPattern (EMBL), DiscoveryBase (Molecular Applications Group), GeneMine (Molecular Applications Group), Look (Molecular Applications Group), MacLook (Molecular Applications Group), BLAST y BLAST2 (NCBI), BLASTN y BLASTX (Altschul et al, J. Mol. Biol. 215: 403, 1990), FASTA (Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444, 1988), FASTDB (Brutlag et al. Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990), Catalyst (Molecular Simulations Inc.), Catalyst/SHAPE (Molecular Simulations Inc.), Cerius2.DBAccess (Molecular Simulations Inc.), HypoGen (Molecular Simulations Inc.), Insight II, (Molecular Simulations Inc.), Discover (Molecular Simulations Inc.), CHARMm (Molecular Simulations Inc.), Felix (Molecular Simulations Inc.), DelPhi, (Molecular Simulations Inc.), QuanteMM, (Molecular Simulations Inc.), Homology (Molecular Simulations Inc.), Modeler (Molecular Simulations Inc.), ISIS (Molecular Simulations Inc.), Quanta/Protein Design (Molecular Simulations Inc.), WebLab (Molecular Simulations Inc.), WebLab Diversity Explorer (Molecular Simulations Inc.), Gene Explorer (Molecular Simulations Inc.), SeqFold (Molecular Simulations Inc.), la base de datos del MDL Available Chemicals Directory, la base de datos del MDL Drug Data Report, la base de datos de Comprehensive Medicinal Chemistry, la base de datos de Derwent's World Drug Index, la base de datos de BioByteMasterFile, la base de datos Genbank, y la base de datos Genseqn. Muchos otros programas y bases de datos serán manifiestos para un experto en la técnica dada la presente descripción.

Los motivos que se pueden detectar usando los programas anteriores incluyen secuencias que codifican cremalleras de leucina, motivos de hélice-vuelta-hélice, sitios de glucosilación, sitios de ubiquitinación, hélices alfa, y láminas beta, secuencias señal que codifican péptidos señal que dirigen la secreción de las proteínas codificadas, secuencias implicadas en la regulación de la transcripción tales como homeocajas, tramos ácidos, sitios activos enzimáticos, sitios de unión a sustrato, y sitios de escisión enzimática.

Hibridación de ácidos nucleicos

La descripción proporciona ácidos nucleicos aislados, sintéticos o recombinantes que se hibridan en condiciones restrictivas a la secuencia ejemplar de la invención, por ejemplo una secuencia expuesta en SEC ID NO:177 o SEC ID NO:178, que tiene una o más mutaciones que codifican E41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia como se expone en SEC ID NO:175 o SEC ID NO:178, que tiene una o más mutaciones que codifican E41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R. Las condiciones restrictivas pueden ser condiciones muy restrictivas, condiciones restrictivas medias, condiciones restrictivas bajas, incluyendo las condiciones de elevada restricción y de restricción reducida descritas aquí. Como alternativas, los ácidos nucleicos de la invención como se definen por su capacidad para hibridarse en condiciones restrictivas pueden tener entre alrededor de cinco restos y la longitud completa de la molécula, por ejemplo un ácido nucleico ejemplar de la invención. Por ejemplo, pueden tener al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o más restos de longitud. También están incluidos los ácidos nucleicos más cortos que la longitud completa. Estos ácidos nucleicos son útiles como, por ejemplo, sondas de hibridación, sondas de marcaje, sondas oligonucleotídicas de PCR, ARNi (mono- o

bicatenario), antisentido o secuencias que codifican péptidos que se unen a anticuerpos (epítomos), motivos, sitios activos, dominios de unión, dominios reguladores y similares.

5 Los ácidos nucleicos de la presente descripción se definen por su capacidad para hibridarse en condiciones de restricción elevada que comprenden alrededor de 50% de formamida a alrededor de 37°C a 42°C. Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su capacidad para hibridarse en condiciones de restricción reducida que comprenden de alrededor de 35% a 25% de formamida a alrededor de 30°C a 35°C. Como alternativa, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su capacidad para hibridarse en condiciones de restricción elevada que comprenden a 42°C en 50% de formamida, 5X SSPE, 0,3% de SDS, y un ácido nucleico de bloqueo de secuencia repetitiva, tal como cot-1 o ADN de esperma de salmón (por ejemplo, 200 ug/ml de ADN de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado). Por ejemplo, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su capacidad para hibridarse en condiciones de restricción reducida que comprenden 35% de formamida a una temperatura reducida de 35°C.

15 Tras la hibridación, el filtro se puede lavar con 6X SSC, 0,5% de SDS a 50°C. Estas condiciones se consideran condiciones "moderadas" por encima de 25% de formamida, y condiciones "bajas" por debajo de 25% de formamida. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación "moderadas" es cuando la hibridación anterior se lleva a cabo a 30% de formamida. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación de "baja restricción" es cuando la hibridación anterior se realiza a 10% de formamida.

20 El intervalo de temperatura que corresponde a un nivel particular de restricción se puede estrechar adicionalmente calculando la relación de purina a pirimidina del ácido nucleico de interés y ajustando la temperatura en consecuencia. Los ácidos nucleicos de la presente descripción también se definen por su capacidad para hibridarse en condiciones de restricción elevadas, medias y bajas como se expone en Ausubel y Sambrook. Las variaciones en los intervalos y condiciones anteriores que se pueden usar en la práctica de la presente descripción son bien conocidas en la técnica. Las condiciones de hibridación se explican adicionalmente, más abajo.

Inhibición de la expresión de fosfolipasas

25 La descripción proporciona además ácidos nucleicos complementarios a (por ejemplo, secuencias antisentido a) los ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo ácidos nucleicos que codifican fosfolipasas. Las secuencias antisentido son capaces de inhibir el transporte, ajuste o transcripción de genes que codifican fosfolipasa.

Oligonucleótidos antisentido

30 La descripción proporciona oligonucleótidos antisentido capaces de unirse a un mensaje de fosfolipasa que pueden inhibir la actividad de fosfolipasa seleccionando como diana a ARNm. Las estrategias para diseñar oligonucleótidos antisentido están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes, y el experto puede diseñar tales oligonucleótidos de fosfolipasas usando los nuevos reactivos como se describen. Véase, por ejemplo, Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183, que describe un ensayo de cartografiado de ARN, que se basa en técnicas moleculares estándar para proporcionar un método fácil y fiable para una selección potente de las secuencias antisentido. Véase también Smith (2000) *Eur. J. Pharm. Sci.* 11:191-198.

35 Documentos WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 144:189-197; *Antisense Therapeutics*, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996).

Ribozimas inhibidoras

40 La presente descripción proporciona ribozimas capaces de unirse a un mensaje de fosfolipasa que pueden inhibir la actividad de la enzima de fosfolipasa seleccionando como dianas a ARNm. Las estrategias para diseñar ribozimas y seleccionar la secuencia antisentido específica de fosfolipasa para la selección como diana están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes, y el experto puede diseñar tales ribozimas usando los nuevos reactivos de la presente descripción.

ARN de interferencia (ARNi)

45 La presente descripción proporciona una molécula inhibidora de ARN, una molécula denominada "ARNi", que comprende una secuencia de fosfolipasa de la invención. La molécula de ARNi comprende una molécula de ARN bicatenario (ARNbc). El ARNi puede inhibir la expresión de un gen de fosfolipasa. Los métodos para obtener y usar moléculas de ARNi para degradar selectivamente ARN son bien conocidos en la técnica, véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n^{os} 6.506.559; 6.511.824; 6.515.109; 6.489.127.

50 Modificación de ácidos nucleicos

La invención proporciona métodos para generar variantes de los ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo aquellos que codifican una enzima de fosfolipasa. En una realización alternativa, la descripción proporciona métodos para modificar una enzima de la invención, por ejemplo mediante mutación de su secuencia codificante por métodos aleatorios o estocásticos, o no estocásticos, o "evolución dirigida", tal como Gene Site Saturation Mutagenesis™

(GSSM), para alterar el intervalo de pH de actividad de las enzimas o el intervalo de actividad óptima, el intervalo de temperaturas de la actividad o el intervalo de actividad óptima, especificidad, actividad (cinética); el uso por parte de una enzima de glucosilación, fosforilación o metales (por ejemplo, Ca, Mg, Zn, Fe, Na), por ejemplo, para impactar sobre la estabilidad del pH/temperatura. La descripción proporciona métodos para modificar una enzima de la invención, por ejemplo mediante mutación de su secuencia codificante, por ejemplo mediante GSSM, para incrementar su resistencia a actividad de proteasas. La descripción proporciona métodos para modificar una enzima, por ejemplo mediante mutación de su secuencia codificante, por ejemplo mediante GSSM, para modificar el uso enzimático de queladores metálicos específicos para Ca, Mg, Na que no quelarían Zn. La descripción proporciona métodos para modificar una enzima, por ejemplo mediante mutación de su secuencia codificante, por ejemplo mediante GSSM, que tendría una combinación deseada de actividades, por ejemplo, PLCs específicas de PI, de PA y de PC/PE.

Estos métodos se pueden repetir o usar en diversas combinaciones para generar enzimas de fosfolipasa que tienen una actividad alterada o diferente o una estabilidad alterada o diferente con respecto a la de una fosfolipasa codificada por el ácido nucleico molde. Estos métodos también se pueden repetir o usar en diversas combinaciones, por ejemplo, para generar variaciones en la expresión génica/del mensaje, traducción del mensaje o estabilidad del mensaje. La composición genética de una célula se puede alterar, por ejemplo, mediante modificación de un gen homólogo *ex vivo*, seguido de su re inserción en la célula.

Un ácido nucleico de la invención se puede alterar por cualquier medio. Por ejemplo, métodos al azar o estocásticos, o métodos no estocásticos o de "evolución dirigida".

Los métodos para la mutación al azar de genes son bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, la patente U.S. n° 5.830.696. Por ejemplo, se pueden usar mutágenos para mutar de forma aleatoria un gen. Los mutágenos incluyen, por ejemplo, irradiación con luz ultravioleta o con rayos gamma, o un mutágeno químico, por ejemplo mitomicina, ácido nitroso, psoralenos fotoactivados, solos o en combinación, para inducir rupturas del ADN susceptibles de reparación mediante recombinación. Se puede usar cualquier técnica en biología molecular, por ejemplo mutagénesis por PCR al azar, véase, por ejemplo, Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471; o mutagénesis de múltiples casetes combinatoria, por ejemplo véase Crameri (1995) Biotechniques 18:194-196. Como alternativa, los ácidos nucleicos, por ejemplo genes, se pueden reensamblar tras la fragmentación al azar, o "estocástica", véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n°s 6.291.242; 6.287.862; 6.287.861; 5.955.358; 5.830.721; 5.824.514; 5.811.238; 5.605.793. Como alternativa, se introducen modificaciones, adiciones o supresiones mediante PCR propensa a error, transposición de fragmentos, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis de PCR sexual, mutagénesis *in vivo*, mutagénesis de inserción de casete, mutagénesis de conjunto recursiva, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica del sitio, reensamblaje génico, mutagénesis saturada de sitio génico (GSSM), reensamblaje de ligación sintética (SLR), recombinación, recombinación de secuencia recursiva, mutagénesis de ADN modificado con fosfotioato, mutagénesis de molde que contiene uracilo, mutagénesis de dúplex con saltos, mutagénesis de reparación de desemparejamientos de punto, mutagénesis de cepa hospedante deficiente en la reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis de supresión, mutagénesis de restricción-selección, mutagénesis de restricción-purificación, síntesis de genes artificiales, mutagénesis de conjunto, creación de multímeros de ácidos nucleicos quiméricos, y/o una combinación de estos y otros métodos que son bien conocidos en la técnica.

Los métodos no estocásticos, o "de evolución dirigida", incluyen, por ejemplo, mutagénesis de saturación (por ejemplo, GSSM), reensamblaje de ligación sintética (SLR), o una combinación de los mismos, que se usan para modificar los ácidos nucleicos de la invención para generar fosfolipasas con propiedades nuevas o alteradas (por ejemplo, actividad en condiciones muy ácidas o alcalinas, temperaturas elevadas, y similares). Los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos modificados se pueden cribar en busca de una actividad antes de ensayar para determinar una actividad de fosfolipasa u otra actividad. Se puede usar cualquier modalidad o protocolo de ensayo, por ejemplo usando una plataforma de matriz capilar. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n°s 6.280.926; 5.939.250.

Mutagénesis de saturación, o GSSM

La modificación génica no estocástica, un "proceso de evolución dirigida", se usa para generar fosfolipasas con propiedades nuevas o alteradas. Las variaciones de este método se han denominado "mutagénesis de sitio génico", "mutagénesis de saturación de sitio", "mutagénesis de saturación de sitio génico" o simplemente "GSSM". Se puede usar en combinación con otros procesos de mutagenización. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n°s 6.171.820; 6.238.884.

Se puede usar mutagénesis de saturación de sitio junto con otros medios estocásticos o no estocásticos para variar la secuencia, por ejemplo reensamblaje de ligación sintética (véase más abajo), transposición de partículas, quimerización, recombinación y otros procesos de mutagenización y agentes mutagenizantes. Esta descripción proporciona el uso de cualquier proceso o procesos mutagenizantes, incluyendo mutagénesis de saturación, de una manera repetitiva.

Reensamblaje de ligación sintética (SLR)

La invención proporciona un sistema de modificación génica no estocástico denominado “reensamblaje de ligación sintética”, o simplemente “SLR”, un “proceso de evolución dirigida”, para generar fosfolipasas con propiedades nuevas o alteradas. SLR es un método de ligar fragmentos oligonucleotídicos juntos de forma no estocástica. Este método difiere del barajado oligonucleotídico estocástico por cuanto los bloques de construcción de ácido nucleico no se barajan, concatenan o quimerizan aleatoriamente, sino más bien se ensamblan de forma no estocástica. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente U.S. Serie nº (USSN) 09/332.835 titulada “Synthetic Ligation Reassembly in Directed Evolution” y presentada el 14 de junio de 1999 (“USSN 09/332.835”).

Sistema de evolución dirigida optimizada

La invención proporciona un sistema de modificación génica no estocástico denominado “sistema de evolución dirigida optimizada” para generar fosfolipasas con propiedades nuevas o alteradas. La evolución dirigida optimizada se refiere al uso de ciclos repetidos de reclasificación reductiva, recombinación y selección que permite la evolución molecular dirigida de ácidos nucleicos a través de recombinación. La evolución dirigida optimizada permite la generación de una gran población de secuencias quiméricas evolucionadas, en el que la población generada está significativamente enriquecida en secuencias que tienen un número predeterminado de sucesos de cruzamiento.

Determinación de sucesos de cruzamiento

Se incluyen un sistema y un software que recibe una función de densidad de probabilidad (PDF) de cruzamiento deseado, el número de genes progenitores a reensamblar, y el número de fragmentos en el reensamblaje, como entradas. La salida de este programa es una “PDF de fragmentos” que se puede usar para determinar una receta para producir genes reensamblados, y la PDF de cruzamiento estimada de esos genes. El procesamiento descrito aquí se lleva a cabo preferiblemente en MATLAB® (The Mathworks, Natick, Massachusetts), un lenguaje de programación y entorno de desarrollo para computación técnica.

Procesos iterativos

En la práctica de la invención, estos procesos se pueden repetir iterativamente. Por ejemplo, un ácido nucleico (o el ácido nucleico) responsable de un fenotipo de fosfolipasa alterado se identifica, se vuelve a aislar, se modifica nuevamente, se vuelve a ensayar en busca de su actividad. Este proceso se puede repetir iterativamente hasta que se manipule un fenotipo deseado. Por ejemplo, se puede manipular en una célula una ruta completa anabólica o catabólica bioquímica, incluyendo la actividad de fosfolipasa.

De forma similar, si se determina que un oligonucleótido particular no tiene efecto en absoluto sobre el rasgo deseado (por ejemplo, un nuevo fenotipo de fosfolipasa), se puede eliminar como una variable sintetizando oligonucleótidos parentales más grandes que incluyen la secuencia a eliminar. Puesto que la incorporación de la secuencia en una secuencia más grande evita cualesquiera sucesos de cruzamiento, ya no habrá ninguna variación de esta secuencia en los polinucleótidos progenie. Esta práctica iterativa de determinar qué oligonucleótidos están más relacionados con el rasgo deseado, y cuáles no están relacionados, permite una exploración más eficiente de todas las variantes proteicas posibles que pueden proporcionar un rasgo o actividad particular.

Barajado *in vivo*

El barajado *in vivo* de moléculas es uso en métodos de la presente descripción que proporcionan variantes de polipéptidos de la invención, por ejemplo anticuerpos, enzimas de fosfolipasa, y similares. El barajado *in vivo* se puede llevar a cabo utilizando la propiedad natural de las células para recombinar multímeros. Aunque la recombinación *in vivo* ha proporcionado la ruta natural principal para la diversidad molecular, la recombinación genética sigue siendo un proceso relativamente complejo que implica 1) el reconocimiento de homologías, 2) escisión de las hebras, invasión de las hebras, y etapas metabólicas que conducen a la producción de quiasma recombinante; y finalmente 3) la resolución de quiasma en moléculas recombinadas discretas. La formación de quiasma requiere el reconocimiento de secuencias homólogas.

Producción de variantes de secuencias

La invención también proporciona métodos para obtener variantes de secuencias del ácido nucleico y secuencias de fosfolipasas de la invención o aislar enzima de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa, variantes de secuencias que usan los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención. Por ejemplo, la descripción proporciona variantes de un gen de fosfolipasa de la invención, que se pueden alterar por cualquier medio, incluyendo, por ejemplo, métodos aleatorios o estocásticos, o métodos no estocásticos o de “evolución dirigida”, como se describe anteriormente.

Las variantes aisladas pueden ser de origen natural. La variante también se puede crear *in vitro*. Las variantes se pueden crear usando técnicas de ingeniería genética tales como mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis química al azar, procedimientos de supresión con exonucleasas III, y técnicas de clonación estándar. Como alternativa, tales variantes, fragmentos, análogos, o derivados se pueden crear usando procedimientos de síntesis o modificación química. Otros métodos para obtener variantes también son familiares para los expertos en la técnica.

La PCR propensa a error se describe, por ejemplo, en Leung, D.W., et al., *Technique*, 1:11-15, 1989) y en Caldwell, R. C. y Joyce G.F., *PCR Methods Applic.*, 2:28-33, 1992. De forma breve, en tales procedimientos, los ácidos nucleicos a mutagenizar se mezclan con cebadores de PCR, tampón de reacción, MgCl₂, MnCl₂, Taq polimerasa y una concentración apropiada de dNTPs para lograr una tasa elevada de mutación de punto a lo largo de toda la longitud del producto de PCR. Por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo usando 20 fmoles de ácido nucleico a mutagenizar, 30 pmoles de cada cebador de PCR, un tampón de reacción que comprende 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl (pH 8,3) y 0,01% de gelatina, 7 mM de MgCl₂, 0,5 mM de MnCl₂, 5 unidades de Taq polimerasa, 0,2 mM de dGTP, 0,2 mM de dATP, 1 mM de dCTP, y 1 mM de dTTP. La PCR se puede llevar a cabo durante 30 ciclos de 94°C durante 1 min., 45°C durante 1 min., y 72°C durante 1 min. Sin embargo, se apreciará que estos parámetros se pueden variar según sea apropiado. Los ácidos nucleicos mutagenizados se clonan en un vector apropiado, y se evalúan las actividades de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos mutagenizados.

También se pueden crear variantes usando mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, para generar mutaciones específicas del sitio en cualquier ADN clonado de interés. La mutagénesis oligonucleotídica se describe, por ejemplo, en Reidhaar-Olson (1988) *Science* 241:53-57. De forma breve, en tales procedimientos, se sintetiza una pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios que poseen una o más mutaciones a introducir en el ADN clonado, y se inserta en el ADN clonado a mutagenizar. Los clones que contienen el ADN mutagenizado se recuperan, y se evalúan las actividades de los polipéptidos que codifican.

Otro método para generar variantes es PCR de ensamblaje. La PCR de ensamblaje implica el ensamblaje de un producto de PCR a partir de una mezcla de fragmentos pequeños de ADN. Se produce paralelamente en el mismo vial un gran número de reacciones de PCR diferentes, cebando los productos de una reacción a los productos de otra reacción. La PCR de ensamblaje se describe en, por ejemplo, la patente U.S. n° 5.965.408.

Todavía otro método para generar variantes es mutagénesis de PCR sexual. En la mutagénesis de PCR sexual, se produce *in vitro* la recombinación homóloga forzada entre moléculas de ADN de una secuencia de ADN diferente pero muy relacionada, como resultado de la fragmentación al azar de la molécula de ADN basado en la homología de secuencia, seguido de la fijación del cruzamiento mediante extensión del cebador en una reacción de PCR. La mutagénesis de PCR sexual se describe, por ejemplo, en Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751. De forma breve, en tales procedimientos, una pluralidad de ácidos nucleicos a recombinar se digiere con ADNasa para generar fragmentos que tienen un tamaño medio de 50-200 nucleótidos. Los fragmentos del tamaño medio deseado se purifican y resuspenden en una mezcla de PCR. La PCR se lleva a cabo en condiciones que facilitan la recombinación entre los fragmentos de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la PCR se puede llevar a cabo resuspendiendo los fragmentos purificados a una concentración de 10-30 ng/μl en una disolución de 0,2 mM de cada dNTP, 2,2 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 10 mM de Tris HCl, pH 9,0, y 0,1% de Triton X-100. Se añaden 2,5 unidades de Taq polimerasa por 100:1 de mezcla de reacción, y la PCR se lleva a cabo usando el siguiente régimen: 94°C durante 60 segundos, 94°C durante 30 segundos, 50-55°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos (30-45 veces) y 72°C durante 5 minutos. Sin embargo, se apreciará que estos parámetros se pueden variar según sea apropiado. Se pueden incluir oligonucleótidos en las reacciones de PCR. Se puede usar el fragmento de Klenow de ADN polimerasa I en un primer conjunto de reacciones de PCR, y se puede usar Taq polimerasa en un conjunto subsiguiente de reacciones de PCR. Las secuencias recombinantes se aíslan, y se evalúan las actividades de los polipéptidos que codifican.

Las variantes también se pueden crear mediante mutagénesis *in vivo*. En algunas realizaciones, las mutaciones al azar en una secuencia de interés se generan propagando la secuencia de interés en una cepa bacteriana, tal como una cepa de *E. coli*, que posee mutaciones en una o más de las rutas de reparación del ADN. Tales cepas "mutadoras" tienen una tasa de mutación al azar mayor que la de un progenitor de tipo salvaje. La propagación del ADN en una de estas cepas generará eventualmente mutaciones al azar dentro del ADN. Las cepas mutadoras adecuadas para uso para mutagénesis *in vivo* se describen, por ejemplo, en la Publicación PCT n° WO 91/16427.

Las variantes también se pueden generar usando mutagénesis por inserción de casete. En la mutagénesis por inserción de casete, una pequeña región de una molécula de ADN bicatenaria se sustituye por un "casete" oligonucleotídico sintético que difiere de la secuencia nativa. El oligonucleótido contiene a menudo secuencia nativa completa y/o parcialmente aleatorizada.

También se puede usar la mutagénesis de conjunto recursiva para generar variantes. La mutagénesis de conjunto recursiva es un algoritmo para la manipulación de proteínas (mutagénesis proteica) desarrollado para producir diversas poblaciones de mutantes fenotípicamente relacionados cuyos miembros difieren en la secuencia de aminoácidos. Este método usa un mecanismo de retroalimentación para controlar rondas sucesivas de mutagénesis por inserción de casete combinatoria. La mutagénesis de conjunto recursiva se describe, por ejemplo, en Arkin (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815.

En algunas realizaciones, se crean variantes usando mutagénesis de conjunto exponencial. La mutagénesis de conjunto exponencial es un proceso para generar librerías combinatorias con un porcentaje elevado de mutantes únicos y funcionales, en el que pequeños grupos de restos se distribuyen al azar en paralelo para identificar, en cada posición alterada, aminoácidos que conducen a proteínas funcionales. La mutagénesis de conjunto

exponencial se describe, por ejemplo, en Delegrave (1993) *Biotechnology Res.* 11:1548-1552. Las mutagénesis al azar y dirigida al sitio se describen, por ejemplo, en Arnold (1993) *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455.

5 En algunas realizaciones, las variantes se crean usando procedimientos de barajado en los que porciones de una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican polipéptidos distintos se fusionan juntas para crear secuencias de ácidos nucleicos quiméricas que codifican polipéptidos quiméricos, como se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. n^{os} 5.965.408; 5.939.250.

10 La descripción también proporciona variantes de polipéptidos de la invención que comprenden secuencias en las que uno o más de los restos de aminoácidos (por ejemplo, de un polipéptido ejemplar de la invención) se sustituyen por un resto de aminoácido conservado o no conservado (por ejemplo, un resto de aminoácido conservado), y tal resto de aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético. Las sustituciones conservativas son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares. De este modo, los polipéptidos de la invención incluyen aquellos con sustituciones conservativas de secuencias de la invención, incluyendo pero sin limitarse a las siguientes sustituciones: sustituciones de un aminoácido alifático tal como alanina, valina, leucina e isoleucina por otro aminoácido alifático; la sustitución de una serina por una treonina o viceversa; la sustitución de un resto ácido tal como ácido aspártico y ácido glutámico por otro resto ácido; la sustitución de un resto que posee un grupo amida, tal como asparagina y glutamina, por otro resto que posee un grupo amida; la sustitución de un resto básico tal como lisina y arginina por otro resto básico; y la sustitución de un resto aromático tal como fenilalanina, tirosina por otro resto aromático. Otras variantes son aquellas en las que uno o más de los restos de aminoácidos de los polipéptidos de la invención incluyen un grupo sustituyente.

20 Otras variantes dentro del alcance de la invención son aquellas en las que el polipéptido está asociado con otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la semivida del polipéptido, por ejemplo polietilenglicol.

Variantes adicionales dentro del alcance de la invención son aquellas en las que aminoácidos adicionales se fusionan al polipéptido, tal como una secuencia líder, una secuencia secretora, una secuencia proproteínica o una secuencia que facilita la purificación, enriquecimiento o estabilización del polipéptido.

25 Las variantes, fragmentos, derivados y análogos de los polipéptidos de la presente descripción retienen la misma función o actividad biológica que los polipéptidos ejemplares, por ejemplo una actividad de fosfolipasa, como se describe aquí. Por ejemplo, la variante, fragmento, derivado, o análogo, incluye una proproteína, de manera que la variante, fragmento, derivado, o análogo se puede activar mediante escisión de la porción proproteínica para producir un polipéptido activo.

30 Optimización de los codones para lograr niveles elevados de expresión proteica en células hospedantes

La invención proporciona métodos para modificar ácidos nucleicos que codifican fosfolipasa para modificar el uso de codones. Por ejemplo, se proporcionan métodos para modificar codones en un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa para incrementar o disminuir su expresión en una célula hospedante. La descripción también proporciona ácidos nucleicos que codifican una fosfolipasa modificada para incrementar su expresión en una célula hospedante, 35 enzimas de fosfolipasa así modificadas, y métodos para obtener las enzimas de fosfolipasa modificadas. El método comprende identificar un codón "no preferido" o un codón "menos preferido" en ácido nucleico que codifica fosfolipasa, y sustituir uno o más de estos codones no preferidos o menos preferidos por un "codón preferido" que codifica el mismo aminoácido que el codón sustituido, y al menos un codón no preferido o menos preferido en el ácido nucleico se ha sustituido por un codón preferido que codifica el mismo aminoácido. Un codón preferido es un 40 codón sobrerrepresentado en secuencias codificantes en genes en la célula hospedante, y un codón no preferido o menos preferido es un codón subrepresentado en secuencias codificantes en genes en la célula hospedante.

Las células hospedantes para expresar los ácidos nucleicos, casetes de expresión y vectores de la invención incluyen bacterias, levaduras, hongos, células vegetales, células de insecto y células de mamífero. De este modo, la descripción proporciona métodos para optimizar el uso de codones en todas estas células, ácidos nucleicos alterados en los codones y polipéptidos obtenidos mediante los ácidos nucleicos alterados en codones. Las células 45 hospedantes ejemplares incluyen bacterias gramnegativas, tales como *Escherichia coli*; bacterias grampositivas, tales como algunos *Bacillus* (por ejemplo, *B. cereus*) o *Streptomyces*, *Lactobacillus gasserii*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Bacillus subtilis*. Las células hospedantes ejemplares también incluyen organismos eucariotas, por ejemplo diversas levaduras, tales como *Saccharomyces* sp., que incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, y *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus niger*, y células y estirpes celulares de mamíferos y células y estirpes celulares de insectos. De este modo, la invención también incluye ácidos nucleicos y polipéptidos optimizados para la expresión en estos organismos y especies.

55 Por ejemplo, los codones de un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa aislada de una célula bacteriana se modifican de manera que el ácido nucleico se exprese óptimamente en una célula bacteriana diferente de la bacteria a partir de la cual derivó la fosfolipasa, una levadura, un hongo, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula de mamífero. Los métodos para optimizar codones son bien conocidos en la técnica; véanse, por ejemplo, la patente U.S. n^o 5.795.737; Baca (2000) *Int. J. Parasitol.* 30:113-118; Hale (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:185-188;

Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253. Véase también Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253, que describe la optimización de codones en sistemas de ratón; Outchkourov (2002) *Protein Expr. Purif.* 24:18-24, que describe la optimización de codones en levadura; Feng (2000) *Biochemistry* 39:15399-15409, que describe la optimización de codones en *E. coli*; Humphreys (2000) *Protein Expr. Purif.* 20:252-264, que describe la optimización del uso de codones que afecta a la secreción en *E. coli*.

Animales no humanos transgénicos

La invención proporciona animales no humanos transgénicos que comprenden un ácido nucleico, un polipéptido, un casete de expresión o vector o una célula transfectada o transformada de la invención. Los animales no humanos transgénicos pueden ser, por ejemplo, cabras, conejos, ovejas, cerdos, vacas, ratas y ratones, que comprenden los ácidos nucleicos de la invención. Estos animales se pueden usar, por ejemplo, como modelos *in vivo* para estudiar la actividad de fosfolipasa, o como modelos para cribar moduladores de actividad de fosfolipasa *in vivo*. Las secuencias codificantes para los polipéptidos a expresar en los animales no humanos transgénicos se pueden diseñar para ser constitutivas, o bajo el control de factores reguladores transcripcionales específicos de tejidos, específicos del desarrollo, o inducibles. Los animales no humanos transgénicos se pueden diseñar y generar usando cualquier método conocido en la técnica; véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n^{os} 6.211.428; 6.187.992; 6.156.952; 6.118.044; 6.111.166; 6.107.541; 5.959.171; 5.922.854; 5.892.070; 5.880.327; 5.891.698; 5.639.940; 5.573.933; 5.387.742; 5.087.571, que describen la obtención y uso de células transformadas y huevos y ratones transgénicos, ratas, conejos, ovejas, cerdos y vacas. Véase también, por ejemplo, Pollock (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147-157, que describe la producción de proteínas recombinantes en la leche de animales productores de leche transgénicos; Baguisi (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:456-461, que demuestra la producción de cabras transgénicas. La patente U.S. n^o 6.211.428 describe la obtención y uso de mamíferos no humanos transgénicos que expresan en sus cerebros un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN. La patente U.S. n^o 5.387.742 describe la inyección de secuencias de ADN recombinantes o sintéticas clonadas en huevos de ratón fertilizados, implantando los huevos inyectados en hembras falsamente preñadas, y haciéndolos crecer hasta ratones transgénicos cuyas células expresan proteínas relacionadas con la patología de la enfermedad de Alzheimer. La patente U.S. n^o 6.187.992 describe la obtención y uso de un ratón transgénico cuyo genoma comprende una interrupción del gen que codifica la proteína precursora de amiloide (APP).

“Animales a los que se les ha suprimido un gen” también se puede usar para la práctica de los métodos de la invención. Por ejemplo, los animales transgénicos o modificados de la invención comprenden un “animal al que se le ha suprimido un gen”, por ejemplo un “ratón al que se le ha suprimido un gen”, manipulado para no expresar o para ser incapaz de expresar una fosfolipasa.

Plantas y semillas transgénicas

La invención proporciona plantas y semillas transgénicas que comprenden un ácido nucleico, un polipéptido (por ejemplo, una fosfolipasa), un casete o vector de expresión, o una célula transfectada o transformada de la invención. También proporciona productos vegetales, por ejemplo aceites, semillas, hojas, extractos y similares, que comprenden un ácido nucleico y/o un polipéptido (por ejemplo, una fosfolipasa) de la invención. La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot). La descripción también proporciona métodos para obtener y usar estas plantas y semillas transgénicas. La planta o célula vegetal transgénica que expresa un polipéptido de la invención se puede construir según cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente U.S. n^o 6.309.872.

Los ácidos nucleicos y constructos de expresión de la invención se pueden introducir en una célula vegetal por cualquier medio. Por ejemplo, los ácidos nucleicos o constructos de expresión se pueden introducir en el genoma de un hospedante vegetal deseado, o los ácidos nucleicos o constructos de expresión pueden ser episomas. La introducción en el genoma de una planta deseada puede ser tal que la producción de fosfolipasa del hospedante esté regulada por elementos de control transcripcionales o traduccionales endógenos. La descripción también proporciona “plantas a las que se les ha suprimido un gen”, en las que la inserción de una secuencia génica mediante, por ejemplo, recombinación homóloga ha interrumpido la expresión del gen endógeno. Los medios para generar plantas “a las que se les ha suprimido un gen” son bien conocidos en la técnica; véanse, por ejemplo, Strepp (1998) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95:4368-4373; Miao (1995) *Plant J* 7:359-365. Véase la discusión sobre plantas transgénicas, más abajo.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar para conferir rasgos deseados en esencialmente cualquier planta, por ejemplo plantas que contienen semillas oleaginosas, tales como arroz, habas de soja, colza, semillas de girasol, sésamo y cacahuetes. Los ácidos nucleicos de la invención se pueden usar para manipular rutas metabólicas de una planta a fin de optimizar o alterar la expresión de fosfolipasa del hospedante. Pueden cambiar la actividad de fosfolipasa en una planta. Como alternativa, una fosfolipasa de la invención se puede usar en la producción de una planta transgénica para producir un compuesto no producido naturalmente por esa planta. Esto puede reducir los costes de producción o crear un nuevo producto.

Se puede añadir un gen marcador seleccionable al constructo génico a fin de identificar células o tejidos vegetales que han integrado con éxito el transgén. Esto puede ser necesario debido a que el logro de la incorporación y

expresión de genes en células vegetales es un suceso raro, que se produce en sólo un pequeño porcentaje de los tejidos o células seleccionados como dianas. Los genes marcadores seleccionables codifican proteínas que proporcionan resistencia a agentes que son normalmente tóxicos para las plantas, tales como antibióticos o herbicidas. Sólo las células vegetales que tienen integrado el gen marcador seleccionable sobrevivirán cuando se hagan crecer en un medio que contiene el antibiótico o herbicida apropiado. En cuanto a otros genes insertados, los genes marcadores también requieren secuencias promotoras y de terminación para el funcionamiento apropiado.

La obtención de plantas o semillas transgénicas según la presente descripción comprende incorporar secuencias de la invención y, opcionalmente, genes marcadores en un constructo de expresión diana (por ejemplo, un plásmido), junto con el posicionamiento de las secuencias promotoras y terminadoras. Esto puede implicar transferir el gen modificado a la planta a través de un método adecuado. Por ejemplo, un constructo se puede introducir directamente en el ADN genómico de la célula vegetal usando técnicas tales como electroporación y microinyección de protoplastos de células vegetales, o los constructos se pueden introducir directamente al tejido vegetal usando métodos balísticos, tal como bombardeo de partículas de ADN. Por ejemplo, véase, por ejemplo, Christou (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:197-203; Pawlowski (1996) *Mol. Biotechnol.* 6:17-30; Klein (1987) *Nature* 327:70-73; Takumi (1997) *Genes Genet. Syst.* 72:63-69, que explican el uso del bombardeo de partículas para introducir transgenes en trigo; y Adam (1997) más arriba, para el uso de bombardeo de partículas para introducir YACs en células vegetales. Por ejemplo, Rinehart (1997) más arriba, usó bombardeo de partículas para generar plantas de algodón transgénicas. El aparato para acelerar partículas se describe en la patente U.S. n° 5.015.580; y el instrumento de aceleración de partículas comercialmente disponible de BioRad (Biolistics) PDS-2000; véase también John, patente U.S. n° 5.608.148; y Ellis, patente U.S. n° 5.681.730, que describen la transformación de gimnospermas mediada por partículas.

Los ácidos nucleicos, por ejemplo constructos de expresión, también se pueden introducir en células vegetales usando virus recombinantes. Las células vegetales se pueden transformar usando vectores víricos, tales como, por ejemplo, vectores derivados del virus del mosaico del tabaco (Rouwendal (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:989-999), véase Porta (1996) "Use of viral replicons for the expression of genes in plants", *Mol. Biotechnol.* 5:209-221.

Como alternativa, los ácidos nucleicos, por ejemplo un constructo de expresión, se puede combinar con regiones de flanqueo de T-DNA adecuadas y se pueden introducir en un vector hospedante de *Agrobacterium tumefaciens* convencional. Las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, incluyendo el desarme y uso de vectores binarios, están bien descritas en la bibliografía científica. Véase, por ejemplo, Horsch (1984) *Science* 233:496-498; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803 (1983); *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlín 1995).

La descripción proporciona la transformación de plantas monocotiledóneas usando los ácidos nucleicos de la invención, incluyendo cereales importantes; véase Hiei (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:205-218. Véanse también, por ejemplo, Horsch, *Science* (1984) 233:496; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803; Thykjaer (1997) más arriba; Park (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1135-1148, que explican la integración de T-DNA en ADN genómico. Véase también D'Halluin, patente U.S. n° 5.712.135, que describe un proceso para la integración estable de un ADN que comprende un gen que es funcional en una célula de un cereal, u otra planta monocotiledónea.

La tercera etapa puede implicar la selección y regeneración de plantas completas capaces de transmitir el gen diana incorporado a la siguiente generación. Tales técnicas de regeneración se basan en la manipulación de ciertas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo tisular, que se basa típicamente en un marcador biocida y/o herbicida que se ha introducido junto con las secuencias nucleotídicas deseadas. La regeneración vegetal a partir de los protoplastos cultivados se describe en Evans et al., *Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture*, p. 124-176, MacMillan Publishing Company, Nueva York, 1983; y Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, p. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. La regeneración también se puede obtener a partir de callo vegetal, explantes, órganos, o sus partes. Tales técnicas de regeneración se describen generalmente en Klee (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486. Para obtener plantas completas a partir de tejidos transgénicos tales como embriones inmaduros, se pueden hacer crecer en condiciones medioambientales controladas en una serie de medios que contienen nutrientes y hormonas, un proceso conocido como cultivo de tejidos. Una vez que se generan plantas completas y se producen semillas, comienza la evaluación de la progenie.

Después de que el casete de expresión se incorpora de forma estable en plantas transgénicas, se puede introducir en otras plantas mediante cruzamiento sexual. Se puede usar cualquiera de un número de técnicas de reproducción estándar, dependiendo de la especie a cruzar. Puesto que la expresión transgénica de los ácidos nucleicos de la invención conduce a cambios fenotípicos, las plantas que comprenden los ácidos nucleicos recombinantes de la invención se pueden cruzar sexualmente con una segunda planta para obtener un producto final. De este modo, la semilla de la descripción se puede derivar de un cruce entre dos plantas transgénicas de la invención, o un cruce entre una planta de la invención y otra planta. Los efectos deseados (por ejemplo, expresión de los polipéptidos de la invención para producir una planta en la que está alterado el comportamiento de la floración) se pueden potenciar cuando ambas plantas parentales expresan los polipéptidos (por ejemplo, una fosfolipasa) de la invención. Los efectos deseados se pueden pasar a las futuras generaciones de plantas por medios de propagación estándar.

Los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención se expresan o insertan en cualquier planta o semilla. Las plantas transgénicas de la invención pueden ser dicotiledóneas o monocotiledóneas. Los ejemplos de plantas transgénicas monocotiledóneas de la invención son hierbas tales como poa común (hierva azul, *Poa*), hierba forrajera tal como festuca, lolio, hierba templada, tal como *Agrostis*, y cereales, por ejemplo trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo, y maíz (maíz). Los ejemplos de plantas transgénicas dicotiledóneas de la invención son tabaco, legumbres, tales como lupinos, patata, remolacha, guisante, haba y haba de soja, y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tal como coliflor, colza, y el organismo modelo estrechamente relacionado *Arabidopsis thaliana*. De este modo, las plantas y semillas transgénicas de la invención incluyen un amplio intervalo de plantas, incluyendo, pero sin limitarse a, especies de los géneros *Anacardium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vitis*, *Vigna*, y *Zea*.

En realizaciones alternativas, los ácidos nucleicos de la invención se expresan en plantas (por ejemplo, plantas transgénicas), tales como plantas que contienen oleaginosas, por ejemplo arroz, habas de soja, colza, semillas de girasol, sésamo y cacahuetes. Los ácidos nucleicos de la invención se pueden expresar en plantas que contienen células de fibras, incluyendo, por ejemplo, algodón, árbol de algodón de seda (Kapok, Ceiba pentandra), *Chilopsis linearis*, árbol de creosota, *Krascheninnikovia lanata*, balsa, *Boehmeria nivea*, *Hibiscus cannabinus*, *Cannabis sativa*, *Hibiscus sabdariffa*, yute, sisal, abacá y lino. Las plantas transgénicas de la invención pueden ser miembros del género *Gossypium*, incluyendo miembros de cualquier especie de *Gossypium*, tales como *G. arboreum*, *G. herbaceum*, *G. barbadense*, y *G. hirsutum*.

La descripción también proporciona plantas transgénicas a usar para producir grandes cantidades de los polipéptidos (por ejemplo, una fosfolipasa o anticuerpo) de la invención. Por ejemplo, véanse Palmgren (1997) *Trends Genet.* 13:348; Chong (1997) *Transgenic Res.* 6:289-296 (que producen la proteína de leche human beta-caseína en plantas de patata transgénicas usando un promotor de manopina sintasa (mas1',2') bidireccional, inducible con auxina, con métodos de transformación de disco de hoja mediada por *Agrobacterium tumefaciens*).

Usando procedimientos conocidos, el experto puede cribar plantas de la invención para detectar el incremento o disminución de ARNm o proteína transgénica en plantas transgénicas. Los medios para detectar y cuantificar ARNm o proteínas son bien conocidos en la técnica.

Polipéptidos y péptidos

La invención proporciona polipéptidos aislados, sintéticos o recombinantes que tienen una identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o completa (100%) de identidad de secuencia) con SEC ID NO: 176 que tiene al menos una de las mutaciones de aminoácidos E41W, E41F, o E41Y, y, preferiblemente, una o más mutaciones que codifican E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R. Como se expone anteriormente, la identidad puede ser a lo largo de la longitud completa del polipéptido, o la identidad puede ser a lo largo de una subsecuencia del mismo, por ejemplo una región de al menos alrededor de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o más restos. Los polipéptidos de la invención también pueden ser más cortos que la longitud completa de polipéptidos ejemplares. En una realización alternativa, la invención proporciona polipéptidos (péptidos, fragmentos) que oscilan en tamaño entre alrededor de 5 y la longitud completa de un polipéptido, por ejemplo una enzima, tal como una fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa; siendo los tamaños ejemplares de alrededor de 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400 o más restos, por ejemplo restos contiguos de las fosfolipasas ejemplares. Los péptidos de la invención pueden ser útiles, por ejemplo, como sondas de marcaje, antígenos, tolerágenos, motivos, sitios activos de fosfolipasa, dominios de unión, dominios reguladores, y similares.

Preferiblemente, el polipéptido tiene una actividad de fosfolipasa, por ejemplo escisión de un enlace éster de glicerolfosfato, la capacidad para hidrolizar enlaces de éster de fosfato, incluyendo actividad de patatina, de acil hidrolasa de lípido (LAH), de fosfolipasa A, B, C y/o fosfolipasa D, o cualquier combinación de las mismas.

Los polipéptidos ejemplares de la invención tienen una actividad de fosfolipasa, localización de secuencia señal, y una fuente inicial, como se expone en la siguiente Tabla 1, a continuación. Para ayudar a leer la tabla, por ejemplo, en la primera fila, en la que SEC ID NO:143, 144, significa el polipéptido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID NO:144, y codificado por, por ejemplo, SEC ID NO:143, que tiene una actividad de PLA específica de PLA, aislado inicialmente de una fuente desconocida; otro ejemplo en la fila de SEC ID NO:167, 168 en la que 167, 168 significa el polipéptido que tiene una secuencia como se expone en SEC ID NO:168, y codificado por, por ejemplo, SEC ID NO:167, que tiene una actividad de fosfatasa para ácido fosfatídico, una secuencia señal en los restos 1 a 30 ("AA1-30" significa restos de aminoácidos 1 a 30, etc.), es decir, MARSWKWRPLLSSFLLVSLAPFSTSVPCFK, y aislado inicialmente de una fuente desconocida. La invención

ES 2 451 266 T3

también proporciona péptidos que comprenden secuencias señal, y polipéptidos quiméricos, en la que los péptidos o quiméricos comprenden secuencias señal como se exponen en la Tabla 1, y como se describen más abajo.

Tabla 1

SEC n°:	ID Tipo de enzima	Localización de sec. señal (AA = aminoácido)	Señal (AA)	Fuente
143, 144	PLA específica de PA			Desconocida
25, 26	Patatina			Desconocida
77, 78	Patatina			Desconocida
35, 36	Patatina			Desconocida
125, 126	Patatina			Desconocida
135, 136	Patatina			Desconocida
99, 100	Patatina			Desconocida
65, 66	Patatina			Desconocida
87, 88	Patatina			Desconocida
86, 87	Patatina			Desconocida
45, 46	Patatina			Desconocida
59, 60	Patatina			Desconocida
13, 14	Patatina			Desconocida
71, 72	Patatina			Desconocida
55, 56	Patatina			Desconocida
33, 34	Patatina			Desconocida
91, 92	Patatina			Desconocida
103, 104	Patatina			Desconocida
11, 12	Patatina			Desconocida
17, 18	Patatina			Desconocida
95, 96	Patatina			Desconocida
43, 44	Patatina			Desconocida
27, 28	Patatina			Desconocida
131, 132	Patatina			Desconocida
127, 128	Patatina			Desconocida
133, 134	Patatina			Desconocida
137, 138	Patatina			Desconocida
165, 166	Patatina			Desconocida

ES 2 451 266 T3

SEC n°:	ID Tipo de enzima	Localización de sec. señal (AA = aminoácido)	Señal (AA)	Fuente
167, 168	Fosfatasas de ácido fosfatídico	AA1-30	MARSWKWRPLLSSFLLVSLAPFSTSVPCFK	Desconocida
169, 170	Fosfatasas de ácido fosfatídico			Desconocida
171, 172	Fosfatasas de ácido fosfatídico			Desconocida
173, 174	Fosfatasas de ácido fosfatídico			Desconocida
111, 112	Fosfatidilinositol PLC	AA1-16	MGAGAILLTGAPTASA	Bacteria
107, 108	Fosfatidilinositol PLC	AA1-23	MSNKKFILKLFICSTILSTFVFA	Desconocida
109, 110	Fosfatidilinositol PLC	AA1-23	MSNKKFILKLFICSTILSTFVFA	Desconocida
113, 114	Fosfatidilinositol PLC	AA1-23	MSNKKFILKLFICSTILSTFVFA	Desconocida
117, 118	Fosfatidilinositol PLC	AA1-23	MNNKKFILKLFICSMVLSAFVFA	Desconocida
119, 120	Fosfatidilinositol PLC	AA1-23	MNNKKFILKLFICSMVLSAFVFA	Desconocida
115, 116	Fosfatidilinositol PLC	AA1-23	MNNKKFILKLFICSMVLSAFVFA	Desconocida
121,	Fosfatidilinositol			
122	PLC	AA1-23	MRNKKFILKLLICSTVLSTFVFA	Desconocida
141, 142	Fosfolipasa		MRTTTTNWRQIVKSLKFLMGLCLFISASFASS	Desconocida
155, 156	Fosfolipasa	AA1-36	AYA	Desconocida
159, 160	Fosfolipasa			Desconocida
145, 146	PLA			Desconocida
147, 148	PLA			Desconocida
149, 150	PLA			Desconocida
151, 152	PLA			Desconocida
153, 154	PLA			Desconocida
157, 158	PLA			Desconocida
163, 164	PLA		LSLVASLRRAPGAALALALAAATLAVTAQGAT	Desconocida
101, 102	PLC	AA1-39	AAPAAAAA	Bacteria
1, 2	PLC	AA1-24	MKKKVLALAAMVALAAPVQSVVFAQ	Desconocida
3, 4	PLC	AA1-24	MKRKILAIASVIALTAPIQSVFAH	Desconocida
5, 6	PLC	AA1-24	MKRKILAIASVIALTAPIQSVFAH	Desconocida
97, 98	PLC	AA1-25	MKRKLCTWALVTAIASSTAVIPTAAE	Desconocida
7, 8	PLC	AA1-29	MITLIKKLLVLTMTLLLGVFVPLQPSHAT	Desconocida

ES 2 451 266 T3

SEC n°:	ID Tipo de enzima	Localización de sec. señal (AA = aminoácido)	Señal (AA)	Fuente
31, 32	PLC	AA1-20	MKKKLCTWALVTAISSGVVAI	Desconocida
81, 82	PLC	AA1-25	MKKKLCTMALVTAISSGVVTIPTEAQ	Desconocida
93, 94	PLC	AA1-29	MITLIKKCLLVLTMTLLSGVFPVPLQPSYAT	Desconocida
89, 90	PLC	AA1-25	MKKKLCTLAFVTAISSIAITIPTEAQ	Desconocida
123, 124	PLC	AA1-24	M KKKVLALAAMVALAAPVQSVVFA	Desconocida
129, 130	PLC	AA1-27	MKKKICTLALVSAITSGVVTIPTVASA	Desconocida
139, 140	PLC	AA1-20	MKIKPLTFSFGLAVTSSVQA	Desconocida
105, 106	PLC	AA1-30	MNRCRNSLNLQLRAVTVAALVVVASSAALAW	Desconocida
9, 10	PLC	AA1-20	MKLLRVFVCFVALLSAHISKAD	Desconocida
47, 48	PLD			Desconocida
15, 16	PLD			Desconocida
41, 42	PLD			Desconocida
23, 24	PLD			Desconocida
51, 52	PLD			Desconocida
53, 54	PLD			Desconocida
19, 20	PLD	AA1-19	MKKTTLVLALLMPFGAASQA	Desconocida
75, 76	PLD			Desconocida
57, 58	PLD			Desconocida
63, 64	PLD	AA1-18	MKNTLILAGCILAAPAVAD	Desconocida
79, 80	PLD	AA1-23	MRNFSKGLTSILLSIATSTSAMAF	Desconocida
37, 38	PLD	AA1-23	MRNFSKGLTSILLSIATSTSAMAF	Desconocida
61, 62	PLD	AA1-21	MTLKLSELLIASLSAVSPAVLAN	Desconocida
67, 68	PLD		No	Desconocida
83, 84	PLD	AA1-21	MKKIVIYSFVAGVMTSGGVFAA	Desconocida
49, 50	PLD	AA1-23	MNFWSFLLSITLPMGVGVHAHAQPD	Desconocida
39, 40	PLD			Desconocida
73, 74	PLD			Desconocida
29, 30	PLD			Desconocida
21, 22	PLD	AA1-28	MQQHKLRNFKGLTGVLVSVLTSTSAMAF	Desconocida
71, 72	PLD			Desconocida
161, 162	PLD	AA1-24	MNRKLLSLCLGATSCIALSLPVHA	Desconocida

La presente descripción proporciona polipéptidos que tienen secuencias como se exponen en SEC ID NO: 175 o SEC ID NO:176 que tienen una o más mutaciones E41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R, y sus subsecuencias, por ejemplo, teniendo sus sitios activos ("dominios catalíticos") una actividad de fosfolipasa, por ejemplo una actividad de fosfolipasa C (PLC). En un aspecto, el polinucleótido tiene una actividad de fosfolipasa pero carece de actividad de hidrólisis de aceite neutro (triglicérido). Por ejemplo, el polipéptido tiene una actividad de fosfolipasa pero carece de cualquier actividad que afecte a una fracción de aceite neutro (triglicérido). Por ejemplo, la presente descripción proporciona un procedimiento de desgomado que comprende el uso de un polipéptido de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa, pero no una actividad de lipasa.

Los polipéptidos y péptidos de la invención se pueden aislar de fuentes naturales, y pueden ser polipéptidos sintéticos o pueden ser polipéptidos generados recombinantemente. Los péptidos y proteínas se pueden expresar recombinantemente *in vitro* o *in vivo*. Los péptidos y polipéptidos de la invención se pueden obtener y aislar usando cualquier método conocido en la técnica. Los polipéptidos y péptidos de la invención también se pueden sintetizar, todo o en parte, usando métodos químicos bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Caruthers (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223; Horn (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232; Banga, A.K., Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA. Por ejemplo, la síntesis peptídica se puede llevar a cabo usando diversas técnicas en fase sólida (véanse, por ejemplo, Roberge (1995) Science 269:202; Merrifield (1997) Methods Enzymol. 289:3-13) y la síntesis automatizada se puede lograr, por ejemplo, usando el sintetizador de péptidos ABI 431A (Perkin Elmer) según las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

Los péptidos y polipéptidos de la invención se pueden también glucosilar. La glucosilación se puede añadir post-traduccionalmente ya sea de forma química o mediante mecanismos biosintéticos celulares, en el que estos últimos incorporan el uso de motivos de glucosilación conocidos, que pueden ser nativos para la secuencia o se pueden añadir como un péptido o se pueden añadir en la secuencia codificante del ácido nucleico. La glucosilación se puede enlazar mediante O o enlazar mediante N.

Los péptidos y polipéptidos de la invención, como se definen anteriormente, incluyen todas las formas "miméticas" y "peptidomiméticas". Los términos "mimético" y "peptidomimético" se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de los polipéptidos de la invención. El mimético puede estar compuesto completamente de análogos sintéticos no naturales de aminoácidos, o es una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. Un polipéptido descrito aquí también se puede caracterizar como un mimético al contener todos o algunos restos no naturales en lugar de restos de aminoácidos de origen natural. Los restos no naturales están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes.

La descripción también proporciona métodos para modificar los polipéptidos de la invención mediante procesos naturales, tales como procesamiento post-traducciona (por ejemplo, fosforilación, acilación, etc.), o mediante técnicas de modificación química, y los polipéptidos modificados resultantes. Véase, por ejemplo, Creighton, T.E., Proteins - Structure and Molecular Properties 2ª Ed., W.H. Freeman and Company, Nueva York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, p. 1-12 (1983).

También se pueden usar métodos de síntesis química de péptidos de fase sólida para sintetizar el polipéptido o fragmentos de la invención. Tal método se conoce en la técnica desde principios de 1960 (Merrifield, R. B., J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154, 1963) (véase también Stewart, J. M. y Young, J. D., Solid Phase Peptide Synthesis, 2ª Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., p. 11-12).

Enzimas de fosfolipasa

La presente descripción proporciona nuevas fosfolipasas, ácidos nucleicos que las codifican, anticuerpos que se unen a ellos, péptidos que representan los sitios antigénicos de la enzima (epítos) y sitios activos, dominios de unión y reguladores, y métodos para obtenerlos y usarlos. En un aspecto, los polipéptidos de la invención tienen actividad de fosfolipasa, o cualquier combinación de actividades de fosfolipasa, como se describe aquí (por ejemplo, escisión de un enlace de éster de glicerolfosfato, carencia de actividad de lipasa, etc.). Como alternativa, las fosfolipasas de la invención tienen actividades que se han modificado a partir de aquellas de las fosfolipasas ejemplares descritas aquí.

La invención incluye fosfolipasas con y sin secuencias señal, y las propias secuencias señal. La descripción incluye fragmentos o subsecuencias de enzimas de la invención, por ejemplo, péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en dominios catalíticos ("sitios activos"), sitios de unión, dominios reguladores, epítos, secuencias señal, dominios prepro, y similares. La descripción también incluye fosfolipasas inmovilizadas, anticuerpos anti-fosfolipasa y sus fragmentos. La descripción incluye heterocomplejos, por ejemplo proteínas de fusión, heterodímeros, etc., que comprenden las fosfolipasas de la invención. La determinación de los péptidos que representan los sitios antigénicos de la enzima (epítos), sitios activos, sitios de unión, secuencias señal, y similares, se puede hacer mediante protocolos de cribado rutinarios.

Estas enzimas y procedimientos de la presente descripción se pueden usar para lograr un desgomado más completo de aceites con contenido elevado de fósforo, en particular aceites de arroz, de haba de soja, de maíz, de cáñola, y de girasol. Por ejemplo, con la escisión mediante PI-PLC, el fosfatidilinositol se convierte en diacilglicerol y fosfoinositol. El diacilglicerol se reparte a la fase acuosa (mejorando el rendimiento oleoso), y el fosfoinositol se reparte a la fase acuosa, en la que se elimina como componente de la fase pesada durante la centrifugación. Una enzima descrita aquí, por ejemplo una PI-PLC, se puede incorporar en un procedimiento de refinado químico o físico del aceite.

Como alternativa, las enzimas descritas aquí tienen actividad de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), actividad de fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina, actividad de fosfatasa específica para ácido fosfatídico, actividad de fosfolipasa A y/o actividad de fosfolipasa relacionada con patatina. Estas enzimas se pueden usar solas o en combinación entre sí, o con otras enzimas de la presente descripción, u otras enzimas. La presente descripción también proporciona métodos en los que estas enzimas (incluyendo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PIPLC), fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina, y/o fosfolipasa C (junto con una fosfatasa), fosfatasa para ácido fosfatídico, fosfolipasa A, fosfolipasas relacionadas con patatina, descritas aquí) se usan solas o en combinación en el desgomado de aceites, por ejemplo aceites vegetales, por ejemplo aceites con contenido elevado de fósforo, tales como aceite de haba de soja, de maíz, de cáñola, de salvado de arroz y de girasol. Estas enzimas y procedimientos de la presente descripción se pueden usar para lograr un desgomado más completo de aceites con contenido elevado de fósforo, en particular aceites de haba de soja, de maíz, de cáñola, de salvado de arroz y de girasol. Con la escisión mediante PI-PLC, el fosfatidilinositol se convierte en diacilglicerol y fosfoinositol. El diacilglicerol se reparte a la fase acuosa (mejorando el rendimiento oleoso), y el fosfoinositol se reparte a la fase acuosa, en la que se elimina como componente de la fase pesada durante la centrifugación. En el procedimiento de refinado químico o físico del aceite se puede incorporar una enzima de la presente descripción, por ejemplo una PI-PLC descrita aquí.

La presente descripción también proporciona composiciones, por ejemplo disoluciones, que comprenden citrato de sodio a pH neutro para hidratar materias no hidratables. Por ejemplo, la descripción proporciona disoluciones de citrato de sodio en un intervalo de pH de entre alrededor de 4 a 9, ó 5 a 8, ó 6 a 7, que se pueden usar para hidratar fosfolípidos no hidratables (incluyendo enzimas de la presente descripción) en aceites con contenido elevado de fósforo. La hidratación de fosfolípidos no hidratables se logra quelando el calcio y magnesio asociados con los fosfolípidos, permitiendo de ese modo que las sales de fosfolípidos previamente insolubles se repartan más fácilmente en la fase acuosa. Por ejemplo, una vez que los fosfolípidos se mueven a la interfaz agua/aceite o a la fase acuosa, una fosfolipasa de la invención (por ejemplo una fosfohidrolasa específica para fosfolipasa), u otra fosfolipasa, convertirá el fosfolípido en diacilglicerol y un éster de fosfato. El contenido de calcio y magnesio metálicos se puede reducir con la adición de ácido y materia cáustica (véase la discusión sobre procedimientos cáusticos).

Las enzimas como se describen aquí son catalizadores muy selectivos. Al igual que otras enzimas, catalizan reacciones con estereo-, regio- y quimioselectividades exquisitas que no tienen parangón en la química sintética convencional. Además, las enzimas descritas aquí son notablemente versátiles. Se pueden personalizar para funcionar en disolventes orgánicos, operar a pHs extremos (por ejemplo, pHs elevados y pHs bajos), temperaturas extremas (por ejemplo, temperaturas elevadas y temperaturas bajas), niveles extremos de salinidad (por ejemplo, salinidad elevada y baja salinidad), y reacciones catalíticas con compuestos que no están estructuralmente relacionados con sus sustratos fisiológicos naturales. Las enzimas de la presente descripción se pueden diseñar para que sean reactivas frente a un amplio intervalo de sustratos naturales y no naturales, permitiendo así la modificación de virtualmente cualquier compuesto de plomo orgánico. Las enzimas de la presente descripción también se pueden diseñar para ser muy enantio- y regioselectivas. El grado elevado de especificidad por los grupos funcionales mostrado por estas enzimas permite a cualquiera rastrear cada reacción en una secuencia sintética que conduzca a un nuevo compuesto activo. Las enzimas de la descripción aquí también se pueden diseñar para catalizar muchas reacciones diversas no relacionadas con su función fisiológica nativa en la naturaleza.

Secuencias señal de fosfolipasas

La descripción proporciona secuencias señal de fosfolipasas (por ejemplo, péptidos señal (SPs)), por ejemplo péptidos que comprenden secuencias señal y/o polipéptidos quiméricos, en el que los polipéptidos o quiméricos tienen una secuencia señal como se expone en la Tabla 1, o como se expone más abajo. La descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican estas secuencias señal (SPs, por ejemplo un péptido que tiene una secuencia que comprende/que consiste en restos terminales amino de un polipéptido de la invención). La presente descripción proporciona una secuencia señal que comprende un péptido comprende/consiste en una secuencia como se expone en los restos 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24, 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 28, 1 a 30, 1 a 31, 1 a 32 o 1 a 33 de un polipéptido de la invención, por ejemplo SEC ID NO:175 o SEC ID NO:176 que tienen una o más mutaciones que codifican E41A, E41W, E41F, E41Y, E41R, E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K, o Q265R. Cualquiera de estos péptidos puede ser parte de una proteína quimérica, por ejemplo, una proteína recombinante. Un péptido de secuencia señal se puede emparejar con otra enzima de la invención (por ejemplo, una fosfolipasa de la invención a partir de la que no se derivó), o con otra fosfolipasa, o con cualquier polipéptido, como se discute adicionalmente, más abajo.

Las secuencias señal ejemplares se exponen en la Tabla 1 y en el listado de SEC ID, por ejemplo restos 1 a 24 de SEC ID NO:2, SEC ID NO:4, SEC ID NO:6; restos 1 a 29 de SEC ID NO:8; restos 1 a 20 de SEC ID NO:10; restos 1 a 19 de SEC ID NO:20; restos 1 a 28 de SEC ID NO:22; restos 1 a 20 de SEC ID NO:32; restos 1 a 23 de SEC ID NO:38; véase la Tabla 1 y el listado de SEC ID para otras secuencias señal ejemplares de la invención.

- 5 En algunos aspectos las fosfolipasas de la invención pueden no tener secuencias señal. En un aspecto, la invención proporciona las fosfolipasas de la invención que carecen de toda o parte de una secuencia señal. En un aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal de una fosfolipasa enlazada operablemente a una secuencia de ácido nucleico de una fosfolipasa diferente, u opcionalmente se puede desear una secuencia señal de una proteína que no es fosfolipasa.

- 10 Dominios prepro de fosfolipasa, dominios de unión y dominios catalíticos

Además de las secuencias señal (por ejemplo, péptidos señal (SPs)), como se discute anteriormente, la descripción proporciona dominios prepro, dominios de unión (por ejemplo, dominio de unión a sustrato) y dominios catalíticos (CDs). La descripción proporciona ácidos nucleicos que codifican estos dominios catalíticos (CDs) (por ejemplo, "sitios activos"), dominios prepro, dominios de unión y secuencias señal (SPs, por ejemplo un péptido que tiene una secuencia que comprende/consiste en restos amino terminales de un polipéptido de la invención).

- 15

Las secuencias señal (SPs) de fosfolipasas, dominios de unión, dominios catalíticos (CDs) y/o secuencias prepro de la descripción pueden ser péptidos aislados, o secuencias unidas a otra fosfolipasa o a un polipéptido que no es fosfolipasa, por ejemplo como una proteína de fusión (quimérica). Los polipéptidos que comprenden secuencias señal SPs de fosfolipasas y/o prepro de la presente descripción comprenden secuencias heterólogas a las fosfolipasas de la invención (por ejemplo, una proteína de fusión que comprende una SP y/o prepro de la presente descripción y secuencias de otra fosfolipasa o una proteína que no es fosfolipasa). La descripción también proporciona fosfolipasas de la invención con CDs, SPs y/o secuencias prepro heterólogas, por ejemplo secuencias con una secuencia señal de levadura. Una fosfolipasa de la invención puede comprender una CD, SP y/o prepro heteróloga en un vector, por ejemplo un vector de la serie pPIC (Invitrogen, Carlsbad, CA).

- 20

- 25 Como alternativa, una fosfolipasa de la presente descripción puede no tener SPs y/o secuencias prepro, y/o dominios catalíticos (CDs).

Los polipéptidos de la invención incluyen fosfolipasas en forma activa o inactiva. Los polipéptidos de la invención incluyen fosfolipasas inactivas por otras razones, por ejemplo antes de la "activación" mediante un suceso de procesamiento post-traduccion, por ejemplo una acción de endo- o exo-peptidasa o proteínasa, un suceso de fosforilación, una amidación, una glucosilación, una desglucosilación, una sulfatación, un suceso de dimerización, y/o similar. Los métodos para identificar secuencias de dominios "prepro", CDs, dominios de unión y secuencias señal son habituales y bien conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Van de Ven (1993) Crit. Rev. Oncog. 4(2):115-136; cribados de dos híbridos de levadura para identificar interacciones proteína-proteína, descritos por ejemplo por Miller (2004) Methods Mol. Biol. 261:247-62; Heynink (2004) Methods Mol. Biol. 282:223-41, patente US nº 6.617.122; 6.190.874. Por ejemplo, para identificar una secuencia prepro, la proteína se purifica del espacio extracelular, y la secuencia proteica N-terminal se determina y compara con la forma no procesada.

- 30

- 35

Los polipéptidos de la invención se pueden formular como una preparación proteica en cualquier forma líquida, sólida, semisólida o en gel. Por ejemplo, una preparación proteica de la invención puede comprender una formulación que comprende una composición líquida no acuosa, un sólido moldeado, un polvo, un polvo liofilizado, una forma granular, una forma en partículas, un comprimido, un pelete, una pastilla, una forma de gel, un hidrogel, una pasta, un aerosol, una pulverización, una loción o una formulación en suspensión.

- 40

Los polipéptidos de la invención incluyen todas las formas activas, incluyendo subsecuencias activas, por ejemplo dominios catalíticos (CDs) o sitios activos, de una enzima de la presente descripción. Por ejemplo, la descripción proporciona dominios catalíticos o sitios activos como se exponen más abajo. La descripción proporciona un péptido o polipéptido que comprende o consiste en un dominio de sitio activo como se predice a través del uso de una base de datos tal como Pfam (que es una gran colección de múltiples alineamientos de secuencias y modelos de Markov ocultos que cubren muchas familias normales de proteínas, The Pfam protein families database, A. Bateman, E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K.L. Howe, M. Marshall, y E.L.L. Sonnhammer, Nucleic Acids Research, 30(1):276-280, 2002) o equivalente.

- 45

- 50 Se puede usar cualquier sistema hospedante (véase discusión, anterior), por ejemplo cualquier bacteria, por ejemplo una bacteria grampositiva, tal como *Bacillus*, o una bacteria gramnegativa, tal como *E. coli*, o cualquier levadura, por ejemplo *Pichia pastoris*. La ordenación de las secuencias nucleotídicas en la construcción nucleotídica quimérica se puede determinar basándose en los niveles de expresión proteica logrados con cada constructo de fusión. Procediendo desde el extremo 5' del constructo nucleotídico hasta el extremo 3' del constructo, las secuencias nucleotídicas se ensamblan según lo siguiente: secuencia señal/proteína de fusión/secuencia enlazadora/sitio de reconocimiento de escisión de proteasa/enzima madura (por ejemplo, cualquier enzima descrita aquí, por ejemplo una fosfolipasa) o secuencia señal/secuencia pro/enzima madura/secuencia enlazadora/proteína de fusión. La expresión de la enzima (por ejemplo, cualquier enzima descrita aquí, por ejemplo una fosfolipasa) como una

- 55

proteína de fusión inactiva puede mejorar la expresión global de la secuencia de la enzima, puede reducir cualquier toxicidad potencial asociada con la sobreproducción de la enzima activa, y/o puede incrementar el período de duración de la enzima antes del uso debido a que la enzima sería inactiva hasta que la proteína de fusión, por ejemplo pectato liasa, se separe de la enzima, por ejemplo proteína fosfolipasa.

5 Glucosilación

Los péptidos y polipéptidos de la invención (por ejemplo, hidrolasas, anticuerpos) también se pueden glucosilar, por ejemplo, comprendiendo al menos un sitio de glucosilación, por ejemplo una glucosilación enlazada mediante N o enlazada mediante O. El péptido se puede glucosilar tras ser expresado en una *P. pastoris* o una *S. pombe*. La glucosilación se puede añadir post-traduccionalmente, ya sea químicamente o mediante mecanismos biosintéticos celulares, en el que estos últimos incorporan el uso de motivos de glucosilación conocidos, que pueden ser nativos a la secuencia o se pueden añadir como un péptido o se pueden añadir en la secuencia codificante del ácido nucleico.

Por ejemplo, la presente descripción proporciona un polipéptido que comprende una SEC ID NO:2 glucosilada enlazada mediante N, como se describe, por ejemplo, en la siguiente tabla:

Número de sitio	Sitio de glucosilación	Longitud	Posición del aminoácido del sitio de glucosilación	
1	Pareja: NNS	Longitud: 3	Comienzo: 27	Parada: 29
2	Pareja: NTT	Longitud: 3	Comienzo: 65	Parada: 67
3	Pareja: NET	Longitud: 3	Comienzo: 72	Parada: 74
4	Pareja: NST	Longitud: 3	Comienzo: 100	Parada: 102
5	Pareja: NFT	Longitud: 3	Comienzo: 168	Parada: 170
6	Pareja: NLS	Longitud: 3	Comienzo: 171	Parada: 173
7	Pareja: NDT	Longitud: 3	Comienzo: 229	Parada: 231

15 El marco de lectura abierto de SEC ID NO:2 de longitud completa (que, por ejemplo, es codificada por SEC ID NO:1) codifica siete (7) sitios de glucosilación enlazados mediante asparagina (enlazados mediante N) potenciales. La expresión del marco de lectura abierto de SEC ID NO:2 de tipo salvaje en un hospedante glucosilante (por ejemplo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, o una célula de mamífero) da como resultado la producción de una enzima fosfolipasa SEC ID NO:2 glucosilada que es esencialmente inactiva debido a la presencia de la glucosilación enlazada mediante N. La desglucosilación enzimática de la SEC ID NO:2 glucosilada, de tipo salvaje, con PNGasa F o Endoglucosidasa H da como resultado la activación de la actividad de SEC ID NO:2. Además, la modificación de uno o más de los sitios de glucosilación enlazados mediante N a través de mutagénesis (de manera que el sitio ya no es reconocido como un sitio de glucosilación enlazado mediante N, y la glucosilación ya no se produce en ese sitio) da como resultado la producción de SEC ID NO:2 con grados variables de actividad incrementada.

La mutagénesis del codón nucleotídico que codifica la asparagina en los sitios 4,5 y/o 6 de glucosilación de SEC ID NO:2 (por ejemplo, que convierte la asparagina en un ácido aspártico) da como resultado la producción de una enzima con actividad de PLC incrementada en comparación con el marco de lectura abierto de tipo salvaje expresado en el mismo hospedante (el triple mutante expresado en *Pichia pastoris* posee una actividad específica y una actividad funcional que es esencialmente idéntica a la de la secuencia de tipo salvaje expresada en un hospedante no glucosilante como *E. coli*). También es posible abolir el sitio de glucosilación enlazado mediante N a través de mutagénesis del resto de serina o treonina en la secuencia de consenso de glucosilación enlazada mediante N (NXS/T), por ejemplo convirtiendo estos codones nucleotídicos para producir valina o isoleucina en esas posiciones en lugar de serina o treonina. El uso de esta estrategia para eliminar sitios de glucosilación enlazados mediante N también da como resultado la producción de fosfolipasa SEC ID NO:2 activa en sistemas de expresión hospedantes glucosilantes.

Ensayos para actividad de fosfolipasa

La invención proporciona polipéptidos aislados, sintéticos o recombinantes (por ejemplo, enzimas, anticuerpos) que tienen una actividad de fosfolipasa, o cualquier combinación de actividades de fosfolipasa, y ácidos nucleicos que los codifican. Para determinar si un polipéptido tiene una actividad de fosfolipasa y está dentro del alcance de la invención, se puede usar cualquiera de los muchos ensayos de actividad de fosfolipasa conocidos en la técnica. Los protocolos habituales para determinar las actividades de fosfolipasa A, B, D y C, de patatina y de acil hidrolasa de lípido, o actividad de lipasa, son bien conocidos en la técnica.

Los ensayos de actividad ejemplares incluyen ensayos de turbidez, ensayos de metilumbeliferil fosfocolina (fluorescente), ensayos de lipasa con Amplex Red (fluorescente), ensayos de cromatografía de capa fina (TLC), ensayos citolíticos y ensayos con p-nitro-fenilfosforilcolina. Usando estos ensayos, los polipéptidos, péptidos y anticuerpos se pueden cribar rápidamente en busca de la actividad de fosfolipasa.

- 5 La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de acil hidrolasa de lípido (LAH). Véase, por ejemplo, Jimenez (2001) *Lipids* 36:1169-1174, que describe un ensayo micelar mixto a base de octaetilenglicol monododecil éter para determinar la actividad de acil hidrolasa de lípido de una patatina. Pinsiroadom (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48:155-160, describe una actividad de patatina de acil hidrolasa de lípido (LAH) ejemplar.

- 10 Los ensayos de turbidez para determinar la actividad de fosfolipasa se describen por ejemplo en Kauffmann (2001) "Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design", *Protein Engineering* 14:919-928; Ibrahim (1995) "Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*", *Infect. Immun.* 63:1993-1998.

- 15 Los ensayos de metilumbeliferil fosfocolina (fluorescente) para determinar la actividad de fosfolipasa se describen, por ejemplo, en Goode (1997) "Evidence for cell surface and internal phospholipase activity in ascidian eggs", *Develop. Growth Differ.* 39:655-660; Diaz (1999) "Direct fluorescence-based lipase activity assay", *BioTechniques* 27:696-700.

- 20 Los ensayos de fosfolipasa con Amplex Red (fluorescente), para determinar la actividad de fosfolipasa, están disponibles como kits, por ejemplo la detección de fosfolipasa específica de fosfatidilcolina usando un kit de ensayo de fosfolipasa específico de Amplex Red fosfatidilcolina de Molecular Probes Inc. (Eugene, OR), según las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se mide en un lector de microplacas de fluorescencia usando excitación a 560 ± 10 nm y detección de la fluorescencia a 590 ± 10 nm. El ensayo es sensible a concentraciones muy bajas de enzima.

- 25 Los ensayos de cromatografía de capa fina (TLC) para determinar la actividad de fosfolipasa se describen, por ejemplo, en Reynolds (1991) *Methods in Enzymol.* 197:3-13; Taguchi (1975) "Phospholipase from *Clostridium novyi* type A.1", *Biochim. Biophys. Acta* 409:75-85. La cromatografía de capa fina (TLC) es una técnica ampliamente usada para la detección de actividad de fosfolipasa. Se han usado diversas modificaciones de este método para extraer los fosfolípidos de las mezclas de ensayo acuosas. En algunos ensayos de PLC, la hidrólisis se detiene mediante adición de cloroformo/metanol (2:1) a la mezcla de reacción. El material de partida sin reaccionar y el diacilglicerol se extraen en la fase orgánica y se pueden fraccionar mediante TLC, mientras que el producto del grupo de cabeza permanece en la fase acuosa. Para una medida más precisa de la digestión fosfolipídica, se pueden usar sustratos radiomarcados (véase, por ejemplo, Reynolds (1991) *Methods in Enzymol.* 197:3-13). Las relaciones de productos y reaccionantes se pueden usar para calcular el número real de moles de sustrato hidrolizado por unidad de tiempo. Si todos los componentes se extraen por igual, cualesquiera pérdidas en la extracción afectarán por igual a todos los componentes. La separación de los productos de la digestión fosfolipídica se puede lograr mediante TLC con gel de sílice, usándose cloroformo/metanol/agua (65:25:4) como un sistema disolvente (véase, por ejemplo, Taguchi (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 409:75-85).
- 30
- 35

- 40 Los ensayos con p-nitrofenilfosforilcolina para determinar la actividad de fosfolipasa se describen, por ejemplo, en Korbsrisate (1999) *J. Clin. Microbiol.* 37:3742-3745; Berka (1981) *Infect. Immun.* 34:1071-1074. Este ensayo se basa en la hidrólisis enzimática del análogo sustrato p-nitrofenilfosforilcolina para liberar un compuesto cromógeno amarillo, p-nitrofenol, detectable a 405 nm. Este sustrato es conveniente para un cribado de producción elevada.

Un ensayo citolítico puede detectar fosfolipasas con actividad citolítica basándose en la lisis de eritrocitos. Las fosfolipasas tóxicas pueden interactuar con membranas de células eucariotas e hidrolizar fosfatidilcolina y eñingomielina, conduciendo a la lisis celular. Véase, por ejemplo, Titball (1993) *Microbiol. Rev.* 57:347-366.

Fosfolipasas híbridas (quiméricas) y librerías peptídicas

- 45 La presente descripción también proporciona fosfolipasas híbridas y proteínas de fusión, incluyendo librerías peptídicas, que comprenden secuencias de la invención. La descripción también proporciona métodos para generar fosfolipasas "mejoradas" e híbridas usando los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención. Por ejemplo, la descripción proporciona métodos para generar enzimas que tienen actividad, por ejemplo actividad de fosfolipasa (tal como, por ejemplo, actividad de fosfolipasa A, B, C o D, actividad de esterasa de patatina, escisión de un enlace de éster de glicerolfosfato, escisión de un enlace de éster en un fosfolípido en un aceite vegetal) a pHs extremos alcalinos y/o pHs ácidos, temperaturas elevadas y bajas, condiciones osmóticas, y similares. La descripción proporciona métodos para generar enzimas híbridas (por ejemplo, fosfolipasas híbridas).
- 50

- 55 Los polinucleótidos seleccionados y aislados como se describe aquí, incluyendo al menos un ácido nucleico de la invención, se introducen en una célula hospedante adecuada. Los hospedantes apropiados ejemplares pueden ser cualquiera de las células hospedantes familiares para los expertos en la técnica, incluyendo células procariotas, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células de mamífero, células de insectos, o células vegetales. Las células bacterianas ejemplares incluyen cualquier especie dentro del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, incluyendo, por ejemplo,

- Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Las células fúngicas ejemplares incluyen cualquier especie de *Aspergillus*. Las células de levadura ejemplares incluyen cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Schwanniomyces*, incluyendo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de insecto ejemplares incluyen cualquier especie de *Spodoptera* o *Drosophila*, incluyendo *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Las células de animal ejemplares incluyen CHO, COS o la estirpe celular de melanoma de Bowes o cualquier estirpe celular de ratón o humana. La selección de un hospedante apropiado está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Las células hospedantes que contienen los polinucleótidos de interés (para recombinación y/o reselección reductora, o sólo para la expresión de proteína recombinante) se pueden cultivar en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similar, son las usadas previamente con la célula hospedante seleccionada para la expresión, y serán manifiestas para el experto normal. Los clones que se identifican por tener la actividad enzimática específica se pueden secuenciar entonces para identificar la secuencia polinucleotídica que codifica una enzima que tiene la actividad potenciada.
- Los ácidos nucleicos y métodos de la presente invención se pueden usar para generar nuevos polinucleótidos para rutas bioquímicas, por ejemplo rutas de uno o más operones o racimos génicos o sus porciones. Por ejemplo, las bacterias y muchos eucariotas tienen un mecanismo coordinado para regular genes cuyos productos están implicados en procesos relacionados. Los genes se agrupan, en estructuras denominadas "racimos génicos", en un único cromosoma, y se transcriben juntos bajo el control de una única secuencia reguladora, incluyendo un único promotor que inicia la transcripción de todo el racimo. De este modo, un racimo génico es un grupo de genes adyacentes que son idénticos o están relacionados, habitualmente en cuanto a su función.

Metodologías de cribado y dispositivos de monitorización "en línea"

- En la práctica de los métodos descritos aquí, se puede usar una variedad de aparatos y metodologías en conjunción con los polipéptidos y ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo para cribar polipéptidos en busca de actividad de fosfolipasa, para cribar compuestos como moduladores potenciales de actividad (por ejemplo, potenciación o inhibición de la actividad enzimática), en busca de anticuerpos que se unen a un polipéptido de la invención, en busca de ácidos nucleicos que se hibridan a un ácido nucleico de la invención, y similares.

Soportes sólidos para la enzima inmovilizada

- Las enzimas de fosfolipasa, sus fragmentos y los ácidos nucleicos que codifican las enzimas y fragmentos se pueden fijar a un soporte sólido. Esto es a menudo económico y eficiente en el uso de las fosfolipasas en procesos industriales. Por ejemplo, un consorcio o cóctel de enzimas de fosfolipasa (o sus fragmentos activos), que se usan en una reacción química específica, se pueden unir a un soporte sólido y sumergir en una vasija del proceso. Se puede producir la reacción enzimática. Después, el soporte sólido se puede sacar de la vasija, junto con las enzimas fijadas a él, para uso repetido. Por ejemplo, un ácido nucleico aislado de la invención se fija a un soporte sólido. El soporte sólido se puede seleccionar del grupo de un gel, una resina, un polímero, un material cerámico, un vidrio, un microelectrodo, y cualquier combinación de los mismos.

Métodos de inmovilización

- Hay muchos métodos que serían conocidos por un experto en la técnica para inmovilizar enzimas o sus fragmentos, o ácidos nucleicos, sobre un soporte sólido. Algunos ejemplos de tales métodos incluyen, por ejemplo, generación de gotitas electrostáticas, medios electroquímicos, vía adsorción, vía unión covalente, vía reticulación, vía una reacción o proceso químico, vía encapsulamiento, vía atrapamiento, vía alginato de calcio, o vía poli(metacrilato de 2-hidroxiethyl). Métodos parecidos se describen en *Methods in Enzymology, Immobilized Enzymes and Cells, Part C*. 1987. Academic Press. Editado por S. P. Colowick y N. O. Kaplan. Volumen 136; e *Immobilization of Enzymes and Cells*. 1997. Humana Press. Editado por G. F. Bickerstaff. Series: *Methods in Biotechnology*, Editado por J. M. Walker.

Matrices capilares

- Las matrices capilares, tales como la GIGAMATRIX™, Diversa Corporation, San Diego, CA, se pueden usar también en los métodos descritos aquí. Los ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención se pueden inmovilizar o aplicar a una matriz, incluyendo matrices capilares. Las matrices se pueden usar para cribar o monitorizar librerías de composiciones (por ejemplo, pequeñas moléculas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) en busca de su capacidad para unirse a o modular la actividad de un ácido nucleico o un polipéptido de la invención. Las matrices capilares proporcionan otro sistema para soportar y cribar muestras.

Matrices o "biochips"

- Los ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención se pueden inmovilizar o aplicar a una matriz. Una matriz se puede usar para cribar o monitorizar librerías de composiciones (por ejemplo, pequeñas moléculas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) en busca de su capacidad para unirse a o modular la actividad de un ácido nucleico o un polipéptido de la invención.

La presente descripción se puede poner en práctica con cualquier “matriz” conocida, también denominada como “micromatriz” o “matriz de ácido nucleico” o “matriz polipeptídica” o “matriz de anticuerpo” o “biochip”, o variación de los mismos. Las matrices son genéricamente una pluralidad de “puntos” o “elementos diana”, comprendiendo cada elemento diana una cantidad definida de una o más moléculas biológicas, por ejemplo oligonucleótidos, inmovilizadas sobre un área definida de una superficie de sustrato para la unión específica a una molécula de la muestra, por ejemplo transcritos de ARNm.

Anticuerpos y métodos de cribado a base de anticuerpos

La presente descripción proporciona anticuerpos aislados, sintéticos o recombinantes que se unen específicamente a una fosfolipasa de la invención. Estos anticuerpos se pueden usar para aislar, identificar o cuantificar las fosfolipasas de la invención o polipéptidos relacionados. Estos anticuerpos se pueden usar para inhibir la actividad de una enzima descrita aquí. Estos anticuerpos se pueden usar para aislar polipéptidos relacionados con aquellos de la invención, por ejemplo enzimas de fosfolipasa relacionadas.

Los polipéptidos se pueden usar para generar anticuerpos que se unen específicamente a los polipéptidos de la invención. Los anticuerpos resultantes se pueden usar en procedimientos de cromatografía por inmutofinidad para aislar o purificar el polipéptido o para determinar si el polipéptido está presente en una muestra biológica. En tales procedimientos, una preparación proteica, tal como un extracto, o una muestra biológica se ponen en contacto con un anticuerpo capaz de unirse específicamente a uno de los polipéptidos de la invención.

Los anticuerpos generados frente a los polipéptidos de la invención se pueden usar en el cribado de polipéptidos similares de otros organismos y muestras. En tales técnicas, los polipéptidos procedentes del organismo se ponen en contacto con el anticuerpo, y se detectan aquellos anticuerpos que se unen específicamente al anticuerpo. Para detectar la unión al anticuerpo, se puede usar cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente.

Kits

La invención proporciona kits que comprenden las composiciones, por ejemplo ácidos nucleicos, casetes de expresión, vectores, células, polipéptidos (por ejemplo, un kit que tiene al menos una fosfolipasa de la invención) y/o anticuerpos (por ejemplo, un kit que tiene al menos un anticuerpo descrito aquí. Los kits pueden contener enzimas para el procesamiento (la obtención de) biocombustibles, detergentes, o para tratar o procesar alimentos, piensos, biomasa, aditivos alimentarios o de piensos, o suplementos nutricionales, y similares. Los kits también pueden contener material de instrucción que enseña las metodologías y usos industriales de la invención, como se describe aquí.

Usos industriales y médicos de las enzimas de la invención

La invención proporciona muchos usos industriales y aplicaciones médicas usando polipéptidos de la invención, por ejemplo una fosfolipasa y otras enzimas descritas aquí, por ejemplo fosfolipasas A, B, C y D, patatinas, incluyendo la conversión de un fosfolípido no hidratable en una forma hidratable, la obtención de biocombustibles y el procesamiento de biomásas, el desgomado de aceites, el procesamiento de aceites procedentes de plantas, peces, algas y similares, por nombrar sólo unas pocas aplicaciones. En cualquiera de estos usos industriales y aplicaciones médicas alternativos, se pueden añadir las enzimas en un orden específico, por ejemplo se añaden fosfolipasas con especificidades diferentes en un orden específico, por ejemplo se añade en primer lugar una enzima con actividad hidrolizante de PC y de PE (o se añaden dos enzimas, una con actividad hidrolizante de PC y la otra con actividad hidrolizante de PE), después se añade una enzima con actividad hidrolizante de PI (por ejemplo, actividad de PLC), o cualquier combinación de las mismas.

Cualquiera o todos los métodos se pueden usar en una “escala de procedimiento”, por ejemplo procedimientos o refinado de aceite en una escala de alrededor de 15.000; 25.000; 50.000; 75.000; ó 100.000 lbs de aceite refinado/día hasta alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 o más millones de lbs de aceite refinado/día.

Los métodos para usar enzimas de fosfolipasa en aplicaciones industriales son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las fosfolipasas y métodos de la invención se pueden usar para el procesamiento de grasas y aceites como se describe, por ejemplo, en la Publicación de Solicitud de Patente JP H6-306386, que describe la conversión de fosfolípidos presentes en los aceites y grasas en sustancias solubles en agua que contienen grupos ácido fosfórico.

Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para procesar aceites vegetales y fosfolípidos tales como los derivados de o aislados de salvado de arroz, soja, cáñola, palma, semilla de algodón, maíz, pepita de palma, coco, cacahuete, sésamo, girasol. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para procesar aceites esenciales, por ejemplo aquellos procedentes de aceites de semillas de frutas, por ejemplo uva, albaricoque, borraja, etc. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para procesar aceites y fosfolípidos en formas diferentes, incluyendo formas brutas, desgomadas, gomas, agua de lavado, arcilla, sílice, grasa para jabón, y similares. Los fosfolípidos de la invención se pueden usar para procesar aceites con alto contenido en fósforo, aceites de pescado, aceites de animales, aceites vegetales, aceites de algas, y similares. Siempre que se pueda usar una fosfolipasa C, una alternativa comprende el uso de una fosfolipasa D de la invención y una fosfatasa (por ejemplo, usando una

combinación PLD/fosfatasa para mejorar el rendimiento en aceite con contenido elevado de fósforo, tal como aceite de haba de soja).

5 Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para procesar y obtener aceites comestibles, aceites biodiésel, liposomas para fármacos y cosméticos, fosfolípidos estructurados y lípidos estructurados. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en la extracción de aceites. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para procesar y obtener diversos jabones.

Procesamiento de aceites comestibles: Generación de 1,3-diacilglicerol (1,3 DAG)

10 La invención proporciona procedimientos que usan enzima o enzimas de la invención para obtener 1,3-diacilglicerol (1,3 DAG). Una fosfolipasa C o fosfolipasa D más una fosfatasa generan 1,2-diacilglicerol; esto mejora el rendimiento de aceite durante el refinado del aceite comestible. Cuando se usa en un procedimiento que incluye una etapa de neutralización cáustica, por ejemplo como un auxiliar del refinado cáustico, una cantidad tan alta como 70% del 1,2-diacilglicérido (1,2-DAG) sufre migración acílica y se convierte en 1,3-DAG. 1,3-DAG posee mayores beneficios para la salud, y por lo tanto el uso de PLC como un auxiliar del refinado cáustico produce un aceite con mayor valor nutricional.

15 Se proporcionan procedimientos que usan enzima o enzimas descritas aquí para obtener y procesar aceites comestibles, incluyendo la generación de aceites comestibles con mayores cantidades de 1,3-DAG. Los diacilgliceroles son compuestos de origen natural encontrados en muchos aceites comestibles. Por ejemplo, en el procedimiento de desgomado de aceite, una base (cáustica) provoca la isomerización de 1,2-DAG, producido por PLC, en 1,3-DAG, que proporciona un beneficio para la salud nutricional con respecto a 1,2-DAG, por ejemplo el 1,3-DAG se quema como energía en lugar de ser almacenado como grasa (como lo es 1,2-DAG). Añadiendo la PLC al inicio del procedimiento de refinado cáustico (y subsiguientemente el ácido y la materia cáustica), los métodos de la invención generan un nivel elevado de 1,3-DAG (disminuyendo 1,2-DAG). Nutricionalmente, 1,3-DAG es mejor para usted que 1,2-DAG. Un procedimiento de desgomado de aceite puede comprender el uso de una PLC de la invención, con lo que el producto oleoso desgomado final contiene no menos de 0,5%, 1,0%, 2,0% o 3,0% o más de 25 1,3-DAG.

De este modo, la presente descripción proporciona un procedimiento para obtener (a través de interesterificación) un aceite refinado (por ejemplo, un aceite de diacilglicerol), incluyendo aceites comestibles, que contiene mayores niveles de 1,3-diacilglicerol (1,3-DAG), por ejemplo como se ilustra en el Ejemplo 13, en el que se “añade inicialmente” o se añade antes de la adición de ácido o de la materia cáustica una fosfolipasa, tal como una enzima 30 descrita aquí. La generación mediante hidrólisis enzimática de un DAG a partir de un triglicérido genera mediante interesterificación 1,3 DAG a partir de 1,2 DAG. El aceite comestible que comprende 1,3 DAG muestra diferentes efectos metabólicos en comparación con los agentes comestibles convencionales. Las diferencias en las rutas metabólicas entre 1,3 DAG y 1,2 DAG o triglicéridos permiten que se queme una mayor porción de ácidos grasos a partir de 1,3 diacilglicerol como energía en lugar de ser almacenada como grasa. Los estudios clínicos han demostrado que el consumo habitual de aceite de DAG como parte de una dieta sensible puede ayudar a los individuos a gestionar su peso corporal y grasa corporal. Además, el metabolismo de 1,3 DAG reduce los triglicéridos postprandiales circulantes en el torrente sanguíneo. Puesto que la obesidad y los niveles elevados de lípidos sanguíneos están asociados con factores de riesgo para enfermedades crónicas que incluyen enfermedad 35 cardiovascular y diabetes tipo II, estas condiciones de salud relacionadas con el estilo de vida pueden ser impactadas de manera beneficiosa con el consumo habitual de aceites de DAG.

El consumo de aceite que comprende DAG puede tener lugar a través de una variedad de medios. De este modo, la presente descripción proporciona un procedimiento que usa una enzima descrita aquí para obtener un alimento, por ejemplo un producto horneado, que tiene mayores niveles de diacilglicerol 1,3-DAG, y productos horneados que comprenden aceites de diacilglicerol. Los productos horneados son galletas, tartas y productos horneados similares.

45 Como alternativa, la combinación de enzimas que se puede usar en los métodos descritos aquí, incluyendo el procesamiento de aceites comestibles, incluye (en la que una, varias o todas las enzimas en la combinación comprenden una enzima descrita aquí):

- O PLC + PI-PLC + PLA (PLA añadida tras terminar las reacciones de PLC);
- O PLD + fosfatasa + PI-PLC seguido de PLA; o
- 50 O PLC o (PLC + PI-PLC) + PLA específica para ácido fosfatídico (todas las enzimas se añaden juntas o secuencialmente).

Desgomado de aceites y procesamiento del aceite vegetal

55 Las enzimas descritas aquí (por ejemplo, polipéptidos de la invención que tienen actividad de lipasa, de fosfolipasa, de esterasa y/o de glucosidasa, o actividad equivalente) se pueden usar en diversas etapas del procesamiento de aceites vegetales, tales como en la extracción de aceites vegetales, particularmente en la eliminación de “gomas de fosfolípidos” en un procedimiento denominado “desgomado de aceites”.

Estos procedimientos descritos se pueden usar en una “escala de procedimiento”, por ejemplo en una escala de alrededor de 15.000; 25.000; 50.000; 75.000; ó 100.000 lbs de aceite refinado/día hasta alrededor de 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 o más millones de lbs de aceite refinado/día.

5 En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de desgomado de aceite que comprenden usar una fosfolipasa de la invención, por ejemplo una PLC de la invención. El procedimiento comprende además añadir otra fosfolipasa (que también puede ser una fosfolipasa de la invención), por ejemplo otra PLC, una PLA, una PLB, una PLB o una patatina, o una enzima (que también puede ser una enzima de la invención) que tiene una actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA) o actividad de lisofosfolipasa (LPL) y lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o una combinación de las mismas, y/o una fosfolipasa de tipo patatina (que también puede ser una enzima de la invención). Como alternativa, todas las enzimas se añaden juntas, o, como alternativa, las enzimas se añaden en un orden específico, por ejemplo la adición de PLC es seguida de la adición de PLA y/o patatina; o primeramente se añade una enzima o enzimas de la invención que tienen actividad de PC y de PE, y después en segundo lugar se añade PI PLC.

15 Este procedimiento puede proporcionar una mejora del rendimiento como resultado del tratamiento con fosfolipasa (por ejemplo, PLC de la invención). Este procedimiento puede proporcionar además una disminución adicional del contenido de fósforo del aceite como resultado del tratamiento con fosfolipasa (por ejemplo, PLA de la invención).

La presente descripción proporciona procedimientos que comprenden el uso de una fosfolipasa de la invención, por ejemplo una PLC de la invención, para reducir la masa de goma e incrementar la ganancia de aceite neutro (triglicérido) mediante el atrapamiento de aceite reducido. En un aspecto, la invención proporciona procedimientos que comprenden el uso de una fosfolipasa de la invención, por ejemplo una PLC de la invención, para incrementar la producción de aceites neutros y diacilglicerol (DAG), para contribuir a la fase oleosa. Como alternativa, los procedimientos de la invención (por ejemplo, procedimientos de desgomado) pueden comprender una o más enzimas adicionales tales como una proteasa, una amilasa, una lipasa, una cutinasa, otra fosfolipasa (incluyendo, por ejemplo, una enzima de la invención), una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una oxidasa, por ejemplo una lactasa, y/o una peroxidasa, o polipéptidos con actividad equivalente, o una combinación de las mismas.

Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en diversas etapas del procesamiento de aceites vegetales, tales como en la extracción de aceites vegetales, particularmente en la eliminación de “gomas de fosfolípidos” en un procedimiento denominado “desgomado de aceites”, como se describe anteriormente. La descripción proporciona métodos para procesar aceites vegetales a partir de diversas fuentes, tales como salvado de arroz, habas de soja, colza, cacahuetes y otras nueces, sésamo, girasol, palma y maíz. Los métodos se pueden usar conjuntamente con procedimientos basados en la extracción como con hexano, con el refinado subsiguiente de los extractos brutos a aceites comestibles, incluyendo el uso de los métodos y enzimas descritos aquí. La primera etapa en la secuencia de refinado es el proceso denominado “desgomado”, que sirve para separar fosfátidos mediante adición de agua. El material precipitado mediante desgomado se separa y se procesa posteriormente a mezclas de lecitinas. Las lecitinas comerciales, tales como lecitina de haba de soja y lecitina de girasol, son materiales semisólidos o muy viscosos. Consisten en una mezcla de lípidos polares, principalmente fosfolípidos, y aceite, principalmente triglicéridos.

Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en cualquier procedimiento de “desgomado”, incluyendo desgomado con agua, desgomado con aceite ALCON (por ejemplo, para habas de soja), desgomado safinco “superdesgomado”, desgomado UF, desgomado TOP, unidesgomado, desgomado en seco y desgomado con ENZYMAX™. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n^{os} 6.355.693; 6.162.623; 6.103.505; 6.001.640; 5.558.781; 5.264.367. Diversos procedimientos de “desgomado”, incorporados por los métodos de la invención, se describen en Bockisch, M. (1998) en Fats and Oils Handbook, The extraction of Vegetable Oils (Capítulo 5), 345-445, AOCS Press, Champaign, Illinois. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en la aplicación industrial de desgomado enzimático de aceites triglicéridos como se describe, por ejemplo, en el documento EP 513709.

Las fosfolipasas descritas aquí se usan para tratar aceites vegetales, por ejemplo aceites brutos, tales como salvado de arroz, soja, cáñola, girasol y similar. En un aspecto, esto mejora la eficiencia del procedimiento de desgomado. La presente descripción proporciona métodos para el desgomado enzimático en condiciones de bajo contenido de agua, por ejemplo en el intervalo de entre alrededor de 0,1% a 20% de agua, o 0,5% a 10% de agua. Esto da como resultado la separación mejorada de una fase pesada a partir de la fase oleosa durante la centrifugación. La separación mejorada de estas fases puede dar como resultado una eliminación más eficaz de fosfolípidos a partir del aceite, incluyendo aceites tanto hidratables como no hidratables. Esto puede producir una fracción de goma que contiene menos aceite neutro (triglicéridos) arrastrado, mejorando de ese modo el rendimiento global de aceite durante el procedimiento de desgomado.

En un aspecto, las fosfolipasas de la invención, por ejemplo un polipéptido que tiene actividad de PLC, se usan para tratar aceites (por ejemplo, aceites vegetales, incluyendo aceites brutos, tales como salvado de arroz, soja, cáñola, girasol y similares), por ejemplo en procedimientos de desgomado, para reducir la masa de goma e incrementar la ganancia de aceite neutro mediante atrapamiento de aceite reducido. En un aspecto, las fosfolipasas de la

invención, por ejemplo un polipéptido que tiene actividad de PLC, se usan para la producción de diacilglicerol (DAG) y para contribuir a la fase oleosa.

5 Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en la aplicación industrial del desgomado enzimático como se describe, por ejemplo, en el documento CA 1102795, que describe un método para aislar lípidos polares a partir de lípidos de cereales mediante la adición de al menos 50% en peso de agua. Este método es un desgomado modificado, en el sentido de que utiliza el principio de añadir agua a una mezcla de aceite bruta.

10 La presente descripción proporciona procedimientos enzimáticos que comprenden el uso de fosfolipasas de la invención (por ejemplo, una PLC) que comprenden la hidrólisis de fosfolípidos hidratados en un aceite a una temperatura de alrededor de 20°C a 40°C, a un pH alcalino, por ejemplo un pH de alrededor de pH 8 a pH 10, usando un tiempo de reacción de alrededor de 3 a 10 minutos. Esto puede dar como resultado niveles finales de fósforo en aceite menores que 10 ppm. La invención también proporciona procedimientos enzimáticos que comprenden el uso de fosfolipasas de la invención (por ejemplo, una PLC) que comprenden la hidrólisis de fosfolípidos hidratables y no hidratables en aceite a una temperatura de alrededor de 50°C a 60°C, a un pH ligeramente por debajo del neutro, por ejemplo de alrededor de pH 5 a pH 6,5, usando un tiempo de reacción de alrededor de 30 a 60 minutos. Esto puede dar como resultado niveles de fósforo en aceite finales menores que 10 ppm.

20 La presente descripción proporciona procedimientos enzimáticos que utilizan una enzima de fosfolipasa C para hidrolizar un enlace de fosfoéster de glicerilo y permitir de ese modo la devolución de la porción de diacilglicérido de los fosfolípidos nuevamente al aceite, por ejemplo un aceite vegetal, de pescado o de algas (un "auxiliar del refinado cáustico de fosfolipasa C (PLC)"); y reducir el contenido de fosfolípidos en una etapa de desgomado hasta niveles suficientemente bajos para que los aceites con alto contenido de fósforo se refinan físicamente (un "auxiliar del desgomado de fosfolipasa C (PLC)"). Los dos enfoques pueden generar valores diferentes y tener diferentes aplicaciones diana.

25 En diversos procedimientos ejemplares descritos aquí, un número de etapas distintas componen el procedimiento de desgomado que antecede a los procedimientos de blanqueo del núcleo y refinado con desodorización. Estas etapas incluyen calentar, mezclar, retener, separar y secar. Tras la etapa de calentamiento, se añade agua y a menudo ácido y se mezclan para permitir que la "goma" de fosfolípido insoluble se aglomere en partículas que se pueden separar. Mientras que el agua separa muchos de los fosfátidos en el desgomado, las porciones de los fosfolípidos son fosfátidos no hidratables (NHPs) presentes como sales de calcio o magnesio. Los procedimientos de desgomado se dirigen a estos NHPs mediante la adición de ácido. Tras la hidratación de los fosfolípidos, el aceite se mezcla, se retiene y se separa mediante centrifugación. Finalmente, el aceite se seca y se almacena, se transporta o refina, como se ilustra, por ejemplo, en la Figura 6. Las gomas resultantes se procesan posteriormente para productos de lecitina, o se añaden nuevamente a la harina.

35 En diversos procedimientos ejemplares descritos aquí, los niveles de fósforo se reducen suficientemente bajos para el refinado físico. El procedimiento de separación puede dar como resultado pérdidas de rendimiento potencialmente mayores que el refinado cáustico. Adicionalmente, los procedimientos de desgomado pueden generar productos de desecho que no se pueden vender como lecitina comercial, véase, por ejemplo, la Figura 7 para un procedimiento de desgomado ejemplar para aceites físicamente refinados. Por lo tanto, estos procedimientos no han logrado una cuota significativa de mercado, y los procedimientos de refinado cáustico continúan dominando la industria para salvado de arroz, soja, cáñola y girasol. Obsérvese sin embargo que una enzima de fosfolipasa C empleada en un procedimiento de desgomado especial disminuiría la formación de gomas y la devolución de la porción de diglicérido del fosfolípido nuevamente al aceite.

45 La presente descripción proporciona métodos que usan una PLC de la invención en la fracción de goma. El aceite se puede añadir al aceite bruto para crear una emulsión que da como resultado la mejora de la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol en la fase acuosa (desgomado con agua). Tras la centrifugación, estos fosfolípidos son componentes principales de la fracción acuosa de la goma. Los fosfolípidos en la fracción de goma se pueden tratar con fosfolipasa C o fosfolipasa D más fosfatasa (u otras combinaciones, señaladas más abajo) para general diacilglicerol (DAG) y un éster de fosfato. En este punto, el DAG se puede extraer de los otros componentes de la goma y se puede tratar con una lipasa en condiciones adecuadas para la transesterificación del DAG, para producir un triacilglicerol (lípido estructurado) deseado.

50 La mayor parte del 1,2-DAG se puede convertir en 1,3-DAG incrementando el pH de la goma tras la reacción de PLC, por ejemplo añadiendo materia cáustica. El 1,3-DAG se puede extraer entonces de la goma y se puede hacer reaccionar con una lipasa en condiciones apropiadas para transesterificar el 1,3-DAG en la posición sn2 para crear el triacilglicerol estructurado deseado.

55 Los ácidos grasos usados en la reacción de transesterificación podrían proceder de una variedad de fuentes, incluyendo los ácidos grasos libres encontrados en el aceite bruto.

Los fosfolípidos procedentes del desgomado con agua se usan en combinación con una PLC descrita aquí para crear lípidos estructurados. El aceite desgomado con agua se puede exponer a una PLC y/o PLD (tanto una o

ambas pueden ser enzimas descritas aquí) más fosfatasa, o una de estas combinaciones seguido de PLA (puede ser una enzima descrita aquí), para reducir los niveles de fósforo hasta niveles adecuados para el refinado cáustico o físico.

5 En realizaciones alternativas, la combinación de enzimas que se puede usar en los métodos de la invención, incluyendo estos procedimientos de desgomado, incluyen (en el que una, varias o todas las enzimas en la combinación comprenden una enzima de la actual invención):

- O PLC + PI-PLC + PLA (PLA añadida tras terminar las reacciones de PLC);
- O PLD + fosfatasa + PI-PLC seguido de PLA; o
- 10 O PLC o (PLC + PI-PLC) + PLA específica para ácido fosfatídico (todas las enzimas se añaden juntas o secuencialmente).

Refinado cáustico

15 La invención proporciona procedimientos que usan fosfolipasas (incluyendo enzimas de la invención) en refinado cáustico, en los que las enzimas se usan como auxiliares del refinado cáustico. Como alternativa, se usa una PLC o PLD y/o una fosfatasa en los procedimientos como añadido, ya sea antes, durante o después de un proceso de refinado mediante neutralización cáustica (ya sea refinado continuo o por lotes). La cantidad de enzima añadida puede variar según el procedimiento. El nivel de agua usado en el procedimiento puede ser bajo, por ejemplo alrededor de 0,5 a 5%. Como alternativa, el compuesto cáustico se añade al procedimiento múltiples veces. Además, el procedimiento se puede llevar a cabo a diferentes temperaturas (25°C a 70°C), con diferentes ácidos o cáusticos, y a pH variable (4-12). Se pueden usar disoluciones concentradas de materia cáustica, por ejemplo más 20 concentradas que el estándar industrial de 11%, para disminuir la masa de goma. Como alternativa, la disolución concentrada de materia cáustica está entre alrededor de 12% y 50% concentrada, por ejemplo alrededor de 20%, 30%, 40%, 50%, o 60% o más concentrada.

25 Por ejemplo, una enzima de fosfolipasa C hidroliza un fosfátido en un enlace de fosfoéster de glicerilo para generar un diglicérido y un compuesto de fosfato soluble en agua. El fosfátido hidrolizado se mueve a la fase acuosa, dejando el diglicérido en la fase oleosa, como se ilustra en la Figura 8. Un objetivo del "auxiliar de refinado cáustico" de PLC es convertir las gomas de fosfolípidos formadas durante la neutralización en un diacilglicérido que migrará nuevamente a la fase oleosa. Por el contrario, un objetivo del "auxiliar de desgomado de PLC" es reducir los fosfolípidos en el aceite bruto hasta un fósforo equivalente a menos de 10 partes por millón (ppm).

30 Los ácidos que se pueden usar en un procedimiento de refinado cáustico incluyen, pero no se limitan a, ácidos fosfórico, cítrico, ascórbico, sulfúrico, fumárico, maleico, clorhídrico y/o acético. Los ácidos se usan para hidratar fosfolípidos no hidratables. Los compuestos cáusticos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, KOH y NaOH. Los compuestos cáusticos se usan para neutralizar ácidos grasos libres. Como alternativa, las fosfolipasas, o más particularmente una PLC o una PLD, y una fosfatasa, se usan para la purificación de fitosteroles a partir de la goma/grasa para jabón.

35 La fosfolipasa se puede expresar en una planta antes de añadirla al refinado cáustico. Como alternativa, la fosfolipasa se añade durante la trituración de la planta, pero antes del refinado (es decir, en vasijas de contención). Además, la fosfolipasa se añade como un pretratamiento de refinado, con o sin ácido.

40 Otra realización de la invención, ya descrita, es añadir la fosfolipasa durante un procedimiento de refinado cáustico. En este procedimiento, los niveles de ácido y cáustico se varían dependiendo del nivel de fósforo y del nivel de ácidos grasos libres. Además, en el procedimiento se usan intervalos amplios de temperatura y de pH, dependiendo del tipo de enzima usada.

45 En otra realización de la invención, la fosfolipasa se añade tras el refinado cáustico (Fig. 9). En un caso, la fosfolipasa se añade en una mezcladora intensa o en una mezcladora de retención, antes de la separación. Como alternativa, la fosfolipasa se añade tras la etapa de calentamiento. En otra realización, la fosfolipasa se añade en la etapa de centrifugación. En una realización adicional, la fosfolipasa se añade a la grasa para jabón. Como alternativa, la fosfolipasa se añade al agua de lavado. En otro caso, la fosfolipasa se añade durante las etapas de blanqueo y/o desodorizado.

50 Una enzima de fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, de la invención hidrolizará el fosfátido tanto de fosfolípidos hidratables como no hidratables en aceites brutos y desgomados neutralizados, antes del blanqueamiento y eliminación del olor. Los procedimientos de "refinado cáustico" ejemplares se ilustran en la Figura 9 y Figura 13. La Figura 9 incluye tiempos, temperatura y pHs ejemplares para mezcladora estática (30 a 60 min., 50 a 60°C, pH 5 a 6,5) y mezcladora de retención (3 a 10 min., 20 a 40°C). La enzima diana se puede aplicar como un producto de goteo en el procedimiento de neutralización cáustica existente, como se ilustra en la Figura 9. En este aspecto, la enzima no necesitará soportar niveles de pH extremos si se añade tras la adición de la materia cáustica. 55 Como se ilustra en la Figura 13 (un procedimiento ejemplar de "carga inicial" de enzima), se puede usar cualquier fosfolipasa, incluyendo, por ejemplo, una fosfolipasa de la invención, tal como PLC, PLB, PLA y/o PLC, en un

5 procedimiento de desgomado de aceite bruto, como se describe, por ejemplo, en Bailey's Industrial Oil & Fat Products v.4 (ed. Y. H. Hui). La Figura 14 y la Figura 15 ilustran variaciones de métodos de la invención en las que se usan en el procedimiento dos o tres etapas de centrifugación, respectivamente, procedimiento el cual se puede usar para procesar cualquier aceite, por ejemplo un aceite vegetal tal como un aceite de soja bruto, como se muestra en la figura. El método ejemplar de la Figura 15 tiene una etapa de centrifugación antes del refinado cáustico (además de una etapa de centrifugación tras el refinado cáustico y antes del lavado con agua, y después del lavado con agua), mientras que el método ejemplar de la Figura 14 no tiene ninguna etapa de centrifugación antes del refinado cáustico. La Figura 16 ilustra otra variación ejemplar de este procedimiento que usa tratamiento ácido y que tiene una etapa de centrifugación antes de una etapa de desgomado; este procedimiento ejemplar se puede usar para procesar cualquier aceite, por ejemplo en un aceite vegetal tal como aceite de soja bruto, como se muestra en la figura.

15 Una fosfolipasa de la invención permite eliminar el fósforo hasta los niveles bajos aceptables en el refinado físico. Una PLC descrita aquí hidrolizará el fosfátido tanto de los fosfolípidos hidratables como de los no hidratables en aceites brutos antes del blanqueo y desodorización. La enzima diana se puede aplicar como un producto de aplicación inmediata en la operación de desgomado existente; véase, por ejemplo, la Figura 10. Dado el mezclamiento subóptimo en el equipo comercial, es probable que se necesitará ácido para poner en contacto los fosfolípidos no hidratables con la enzima en la interfaz aceite/agua. Por lo tanto, se usa una PLC descrita aquí estable a ácidos.

20 Un procedimiento de auxiliar de desgomado de PLC descrito aquí puede eliminar pérdidas en una, o en las tres, áreas señaladas en la Tabla 2. Las pérdidas asociadas en un procedimiento de PLC se pueden estimar en alrededor de 0,8% frente al 5,2% en base a la masa debido a la eliminación del fosfátido.

Tabla 2: Pérdidas apuntadas por los productos de PLC

	Auxiliar del refinado cáustico	Auxiliar del desgomado
1) Aceite perdido en la formación y separación de goma 2,1%	X	X
2) Aceite saponificado en la adición cáustica 3,1%		X
3) Aceite atrapado en arcilla en el blanqueo* <1,0%	X	X
Pérdida de rendimiento total ~5,2%	~2,1%	~5,2%

Los beneficios potenciales adicionales de este procedimiento descrito aquí incluyen los siguientes:

- 25
- Adsorbentes reducidos – se necesitan menos adsorbentes con menor fósforo (< 5 ppm)
 - Menor uso de compuestos químicos – menos costes químicos y de procesamiento asociados con la hidratación de fosfolípidos no hidratables
 - Menor generación de desechos – se necesita menos agua para eliminar fósforo del aceite.

30 Los aceites procesados (por ejemplo, “desgomado”) mediante los métodos de la invención incluyen oleaginosas, por ejemplo aceite de haba de soja, aceite de colza, aceite de salvado de arroz y aceite de girasol. El “auxiliar del refinado cáustico de PLC” descrito aquí puede ahorrar 1,2% con respecto a los procedimientos de refinado cáustico existentes. La aplicación del auxiliar del refinado se dirige a aceite de soja que se ha desgomado para lecitina, y también se excluyen de los cálculos de valor/carga.

35 Las dianas de comportamiento de los procedimientos de la descripción aquí pueden variar según las aplicaciones, y más específicamente el punto de adición de enzima; véase la Tabla 3.

Tabla 3: Dianas de comportamiento mediante aplicación

	Auxiliar del refinado cáustico	Auxiliar del desgomado
Niveles entrantes de fósforo en aceite	<200 ppm*	600-1.400 ppm
Niveles finales de fósforo en aceite	<10 ppm †	<10 ppm
Gomas hidratables y no hidratables	Sí	Sí
Tiempo de residencia	3-10 minutos	30 minutos‡

ES 2 451 266 T3

Formulación líquida	Sí	Sí
pH diana	8-10†††	5,0-5,5††
Temperatura diana	20-40°C	~50-60°C
Contenido de agua	<5%	1-1,25%
Pureza de la formulación enzimática	Sin lipasa/proteasa ¹	Sin lipasa/proteasa
Otros requisitos clave	Eliminación de Fe	Eliminación de Fe
<p>* Aceite desgomado con agua</p> <p>† Niveles diana logrados en la etapa de neutralización cáustica aguas arriba, pero se deben de mantener</p> <p>‡ 1-2 horas existente</p> <p>†† El desgomado ácido requerirá una enzima que sea estable en condiciones mucho más ácidas: pH a 2,3 para ácido cítrico a 5% (~Roehm USPN 6.001.640).</p> <p>††† El pH del aceite neutralizado NO es neutro. El ensayo en POS indica que el pH estará en el intervalo alcalino de 6,5-10 (9 de diciembre de 2002). Es necesario determinar el intervalo de pH típico.</p>		

Otros procedimientos que se pueden usar con una fosfolipasa de la invención, por ejemplo una fosfolipasa A₁, pueden convertir fosfolípidos nativos no hidratables en una forma hidratable. La enzima es sensible al calor. Esto puede ser deseable, puesto que el calentamiento del aceite puede destruir la enzima. Sin embargo, la reacción de desgomado se debe ajustar a pH 4-5 y 60°C para adecuar esta enzima. A una dosis de saturación de aceite de 300 unidades/kg, este procedimiento ejemplar es útil llevando el contenido de fósforo en aceite previamente desgomado con agua hasta ≤10 ppm de P. Las ventajas pueden ser un menor contenido de H₂O y los ahorros resultantes en el uso, manipulación y desechos. La Tabla 4 enumera aplicaciones ejemplares para usos industriales para las enzimas de la invención:

Tabla 4: Aplicación ejemplar

	Auxiliar del refinado cáustico	Auxiliar del desgomado
Producción de aceite de soja sin lecitina	X	
Aceite de soja refinado químico, aceite de girasol, aceite de cáñola	X	X
Aceites con bajo contenido de fosfátido (por ejemplo palma)		X

Además de estos diversos procedimientos de “desgomado”, las fosfolipasas de la invención se pueden usar en cualquier etapa del procesamiento de aceites vegetales. Por ejemplo, se pueden usar las enzimas de fosfolipasa de la invención en lugar de PLA, por ejemplo fosfolipasa A₂, en cualquier etapa de procesamiento de aceite vegetal. Los aceites que se “procesan” o “desgomar” en los métodos de la invención incluyen aceites de haba de soja, aceites de colza, aceites de maíz, aceite procedente de pepitas de palma, aceites de cáñola, aceites de girasol, aceites de sésamo, aceites de cacahuete, aceite de salvado de arroz y similares. Los productos principales de este procedimiento incluyen triglicéridos.

En un procedimiento ejemplar, cuando la enzima se añade a y reacciona con un aceite bruto, la cantidad de fosfolipasa empleada es alrededor de 10-10.000 unidades, o, como alternativa, alrededor de 100-2.000 unidades, por 1 kg de aceite bruto. El tratamiento enzimático se lleva a cabo durante 5 minutos hasta 10 horas a una temperatura de 30°C a 90°C, o, como alternativa, alrededor de 40°C a 70°C. Las condiciones pueden variar dependiendo de la temperatura óptima de la enzima. La cantidad de agua añadida para disolver la enzima es 5-1.000 partes en peso por 100 partes en peso de aceite bruto, o, como alternativa, alrededor de 10 a 200 partes en peso por 100 partes en peso de aceite bruto.

Al terminar tal tratamiento enzimático, el líquido de la enzima se separa con un medio apropiado, tal como un separador centrífugo, y se obtiene el aceite procesado. Los compuestos que contienen fósforo, producidos mediante descomposición enzimática de sustancias gomosas en tal procedimiento, se transfieren prácticamente todos a la

fase acuosa y se eliminan de la fase oleosa. Al terminar el tratamiento enzimático, si es necesario, el aceite procesado se puede lavar adicionalmente con agua o con ácido orgánico o inorgánico tal como, por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido succínico, y ácidos equivalentes, o con disoluciones salinas.

5 En un procedimiento ejemplar para el desgomado mediante ultrafiltración, la enzima se une a un filtro o la enzima se añade a un aceite antes de la filtración, o la enzima se usa para limpiar periódicamente los filtros.

10 En un procedimiento ejemplar para un auxiliar del refinado físico mediado por fosfolipasas, se añaden agua y enzima al aceite bruto (por ejemplo aceite vegetal bruto). Por ejemplo, en el procedimiento se usa una PLC o una PLD y una fosfatasa. En el refinado físico mediado por fosfolipasas, el nivel de agua puede ser bajo, es decir, 0,5-5%, y el tiempo del proceso debería ser corto (menos de 2 horas, o menos de 60 minutos, o menos de 30 minutos, o menos de 15 minutos, o menos de 5 minutos). El procedimiento se puede llevar a cabo a diferentes temperaturas (25°C a 70°C) usando diferentes ácidos y/o compuestos cáusticos, a diferentes pHs (por ejemplo, 3-10).

15 Como alternativa, el desgomado con agua se lleva a cabo primero para recoger lecitina mediante centrifugación, y después se añade PLC o PLC y PLA para eliminar fosfolípidos no hidratables (el procedimiento se debería llevar a cabo a una concentración baja de agua). También se lleva a cabo el desgomado con agua del aceite bruto hasta menos de 10 ppm (aceites comestibles) y el refinado físico subsiguiente (menos de 50 ppm para biodiésel). Se puede añadir un emulsionante, y/o el aceite bruto se somete a una mezcladora intensa para promover el mezclado. Como alternativa, se añade un interruptor de la emulsión, y/o el aceite bruto se calienta para promover la separación de la fase acuosa. Como alternativa, se añade un ácido para promover la hidratación de fosfolípidos no hidratables. Adicionalmente, las fosfolipasas se pueden usar para mediar la purificación de fitosteroles a partir de la goma/grasa para jabones.

20 En un aspecto, la invención proporciona composiciones y métodos (que pueden comprender el uso de fosfolipasas de la invención) para el desgomado de aceite que comprenden usar cantidades variables de ácido y base sin obtener materia prima para jabón. Usando este aspecto de la invención para el desgomado de aceite, se puede usar ácido (incluyendo fosfórico y/o cítrico) para hidratar fosfolípidos no hidratables en aceites con contenido elevado de fósforo (incluyendo haba de soja, cáñola, y girasol). Una vez que se hidratan los fosfolípidos, el pH de la fase acuosa se puede elevar usando adición cáustica: la cantidad de materia cáustica añadida puede crear un pH favorable para la actividad enzimática, pero no dará como resultado la formación de una fracción significativa de materia prima de jabón en el aceite. Debido a que no se forma materia prima de jabón, los ácidos grasos libres en el aceite se pueden eliminar aguas abajo, tras la etapa de desgomado, durante el blanqueamiento y eliminación del olor.

30 Las enzimas descritas aquí se usan para mejorar la extracción de aceite y el desgomado de aceite (por ejemplo aceites vegetales). Por ejemplo, en un procedimiento de la invención se usa una PLC de la invención y al menos un agente degradante de la pared celular vegetal (por ejemplo, una celulasa, una hemicelulasa o similar, para reblandecer las paredes e incrementar el rendimiento en la extracción). En este enfoque ejemplar del uso de enzimas descritas aquí para mejorar la extracción de aceite y el desgomado de aceite, se usa una fosfolipasa C descrita aquí así como otras hidrolasas (por ejemplo, una celulasa, una hemicelulasa, una esterasa, una proteasa y/o una fosfatasa) durante las etapas de trituración asociadas con la producción de aceite (incluyendo, pero sin limitarse a, aceite de haba de soja, de cáñola, de girasol, de salvado de arroz). Usando las enzimas antes o en lugar de la extracción con disolvente, es posible incrementar el rendimiento de aceite y reducir la cantidad de fosfolípidos hidratables y no hidratables en el aceite bruto. La reducción en fosfolípidos no hidratables puede resultar de la conversión de fosfolípidos potencialmente no hidratables en diacilglicerol y éster de fosfato correspondiente antes de la complejación con calcio o magnesio. La reducción global de fosfolípidos en el aceite bruto dará como resultado rendimientos mejorados durante el refinado, con el potencial de eliminar el requisito de una etapa de desgomado aparte antes del blanqueamiento y desodorización.

45 La presente descripción también proporciona procedimiento que usan una fosfolipasa de la invención (por ejemplo, una fosfolipasa de la invención específica de fosfolipasa), u otra fosfolipasa, en un "procedimiento de refinado orgánico" modificado, que puede comprender la adición de la enzima (por ejemplo una PLC) en un tanque de alojamiento de ácido nítrico.

50 Las enzimas de la invención se pueden usar en cualquier método de procesamiento de aceites, por ejemplo desgomado o procedimientos equivalentes. Por ejemplo, las enzimas de la invención se pueden usar en procedimientos como se describen en las patentes U.S. n^{os} 5.558.781; 5.264.367; 6.001.640. El procedimiento descrito en USPN 5.558.781 usa fosfolipasa A1, A2 o B, rompiendo esencialmente la lecitina en el aceite que se comporta como un emulsionante.

55 Las enzimas y métodos de la invención se pueden usar en procedimientos para la reducción de componentes que contienen fósforo en aceites comestibles que comprenden una cantidad elevada de fósforo no hidratable, usando una fosfolipasa de la invención, por ejemplo un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa A y/o B, como se describe, por ejemplo, en la patente EP número EP 0869167. Por ejemplo, el aceite comestible es un aceite bruto, un aceite denominado "no desgomado". El método puede comprender tratamiento de un aceite no desgomado, incluyendo aceites prensados o aceites extraídos, o una mezcla de los mismos, de, por ejemplo, colza, haba de soja, sésamo, cacahuete, maíz, salvado de arroz o girasol. El contenido de fosfátidos en un aceite bruto puede variar de

0,5 a 3% p/p, que corresponde a un contenido de fósforo en el intervalo de 200 a 1200 ppm, o en el intervalo de 250 a 1200 ppm. Aparte de los fosfátidos, el aceite bruto también puede contener pequeñas concentraciones de hidratos de carbono, compuestos de azúcar y compuestos ácidos de metal/fosfátido de Ca, Mg y Fe. En un aspecto, el procedimiento comprende el tratamiento de un fosfolípido o lisofosfolípido con la fosfolipasa de la invención para hidrolizar grupos acilo grasos. En un aspecto, el fosfolípido o lisofosfolípido comprende lecitina o lisolecitina. Por ejemplo, el procedimiento, el aceite comestible tiene un contenido de fósforo entre alrededor de 50 y 250 ppm, y el procedimiento comprende tratar el aceite con una fosfolipasa de la invención para hidrolizar una parte principal del fosfolípido y separar una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado del aceite. Antes del procedimiento de desgomado enzimático, el aceite se puede desgomar con agua. Los métodos proporcionan la producción de un pienso para animales, que comprende mezclar la fosfolipasa de la invención con sustancias de pienso y al menos un fosfolípido.

Las enzimas y métodos de la invención se pueden usar en procedimientos de desgomado de aceites como se describe, por ejemplo, en el documento WO 98/18912. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para reducir el contenido de fosfolípido en un aceite comestible. El procedimiento puede comprender tratar el aceite con una fosfolipasa de la invención para hidrolizar una parte importante de fosfolípido y separar una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizable del aceite. Este procedimiento es aplicable a la purificación de cualquier aceite comestible, que contenga un fosfolípido, por ejemplo aceites vegetales, tales como aceite de haba de soja, aceite de salvado de arroz, aceite de colza y aceite de girasol, aceites de pescado, y aceites de algas y de animales, y similares. Antes del tratamiento enzimático, el aceite vegetal se pretrata preferiblemente para eliminar cieno (mucílago), por ejemplo mediante refinado húmedo. El aceite puede contener entre alrededor de 50 a 250 ppm, o entre 50 a alrededor de 1500 ppm o más, de fósforo como fosfolípido al comienzo del tratamiento con fosfolipasa, y el procedimiento de la invención puede reducir este valor por debajo de 5 a 10 ppm.

Las enzimas de la invención se pueden usar en procedimientos como se describe en la Solicitud JP nº H5-132283, presentada el 25 de abril de 1993, que comprende un procedimiento para la purificación de aceites y grasas, que comprende una etapa de convertir fosfolípidos presentes en los aceites y grasas en sustancias solubles en agua que contienen grupos ácido fosfórico, y eliminarlos como sustancias solubles en agua. Para la conversión en sustancias solubles en agua, se usa una acción enzimática. Preferiblemente, como enzima se usa una enzima que tiene una actividad de fosfolipasa C.

Las enzimas de la invención se pueden usar en procedimientos como se describe como el "Procedimiento de Refinado Orgánico" (ORP) (IPH, Omaha, NE), que es un método para refinar aceites de semillas. ORP puede tener ventajas con respecto al refinado químico tradicional, incluyendo un rendimiento mejorado del aceite refinado, valor añadido de los coproductos, costes de capital reducidos, y menores costes medioambientales.

Las enzimas de la invención se pueden usar en procedimientos para el tratamiento de un aceite o grasa, animal o vegetal, bruta, semiprocesada o refinada, que comprende añadir a tal aceite o grasa al menos una enzima de la invención que permite hidrolizar y/o despolimerizar los compuestos no glicéricos contenidos en el aceite, como se describe, por ejemplo, en la Solicitud EP número: 82870032.8. Los métodos ejemplares de la invención para la hidrólisis y/o despolimerización de compuestos no glicéricos en aceites son:

1) La adición y mezcla en aceites y grasas de una enzima de la invención o complejos enzimáticos disueltos previamente en una pequeña cantidad de disolvente apropiado (por ejemplo agua). Es posible un cierto número de disolventes, pero se escoge un disolvente no tóxico y adecuado para la enzima. Esta adición se puede hacer en procedimientos con cargas sucesivas, así como también en procedimientos continuos. La cantidad de enzima o enzimas necesaria a añadir a los aceites y grasas, según este procedimiento, puede oscilar, dependiendo de las enzimas y los productos a procesar, de entre alrededor de 5 a 400 ppm, o entre alrededor de 20 a 400 ppm; por ejemplo, 0,005 kg a 0,4 kg de enzima para 1000 kg de aceite o grasa, y preferiblemente de 5 a 100 ppm, es decir, de 0,005 a 0,1 kg de enzima para 1000 kg de aceite, entendiéndose que estos valores son para enzimas concentradas, es decir, sin diluyente o disolvente.

2) Pasar el aceite o grasa a través de un lecho filtrante fijo o insoluble de enzima o enzimas de la invención sobre soportes sólidos o semisólidos, que presentan preferiblemente una estructura porosa o fibrosa. En esta técnica, las enzimas son atrapadas en las microcavidades de la estructura porosa o fibrosa de los soportes. Estos consisten, por ejemplo, en resinas o polímeros sintéticos, carbonatos de celulosa, geles tales como agarosa, filamentos de polímeros o copolímeros con estructura porosa, que atrapan pequeñas gotitas de enzima en disolución en sus cavidades. Con respecto a la concentración enzimática, es posible llegar hasta la saturación de los soportes.

3) La dispersión de los aceites y grasas en forma de gotitas finas, en una disolución enzimática diluida, que contienen por ejemplo entre alrededor de 0,05 a 4%, o contienen entre alrededor de 0,2 a 4% en volumen de una enzima de la invención. Esta técnica se describe, por ejemplo, en la patente belga nº 595.219. Una columna cilíndrica con una altura de varios metros, con tapa cónica, se llena con una disolución enzimática diluida. Para este fin, se escoge un disolvente que no es tóxico y no miscible en el aceite o grasa a procesar, preferiblemente agua. La parte inferior de la columna está equipada con un sistema de distribución en la que el aceite o grasa se inyecta de forma continua en una forma extremadamente dividida (aproximadamente

10.000 flujo por m²). De este modo, se forma un número infinito de gotitas de aceite o grasa, que se elevan lentamente en la disolución de enzimas y llegan a la superficie, evacuándose continuamente en la parte superior de la tapa cónica del reactor.

5 El aceite de palma se puede pretratar antes del tratamiento con una enzima de la invención. Por ejemplo, se calientan alrededor de 30 kg de aceite de palma bruto hasta +50°C. Se preparan disoluciones al 1% en agua destilada con celulasas y pectinasas. Se añaden 600 g de cada una de estas a disoluciones acuosas del aceite con agitación fuerte durante unos pocos minutos. El aceite se mantiene entonces a +50°C con agitación moderada, durante un tiempo total de reacción de dos horas. Después, la temperatura se eleva hasta +90°C para desactivar las enzimas y preparar la mezcla para la filtración y el procesamiento posterior. El aceite se seca a vacío y se seca con un auxiliar de la filtración.

10 Las enzimas de la invención se pueden usar en procedimientos como se describen en la patente europea EP 0513709 B2. Por ejemplo, un procedimiento para la reducción del contenido de componentes que contienen fósforo en aceites animales y vegetales mediante descomposición enzimática usando una fosfolipasa de la invención. Un aceite animal o vegetal desmucilaginado previamente, con un contenido de fósforo de entre alrededor de 50 a 1500 ppm, o, entre alrededor de 50 a 250 ppm, se agita con un ácido carboxílico orgánico, y el valor del pH de la mezcla resultante se ajusta a entre alrededor de pH 4 hasta pH 6, se añade una disolución enzimática que contiene fosfolipasa A₁, A₂, o B a la mezcla en una vasija de mezclamiento con agitación turbulenta y con formación de gotitas finas, en la que se forma una emulsión con 0,5 a 5% en peso con respecto al aceite, llevándose dicha emulsión a través de al menos una vasija de reacción subsiguiente en movimiento turbulento durante un tiempo de reacción de 0,1 a 10 horas a temperaturas en el intervalo de 20 a 80°C, y en la que el aceite tratado, tras la separación de la disolución acuosa, tiene un contenido de fósforo por debajo de 5 ppm.

15 El procedimiento de refinado orgánico es aplicable tanto a aceite bruto como desgomado. El procedimiento usa la adición en línea de un ácido orgánico en condiciones controladas del procedimiento, conjuntamente con separación centrífuga convencional. El agua separada de forma natural de los fosfolípidos del aceite vegetal ("VOP") se recicla y se reusa. El uso total del agua se puede reducir sustancialmente como resultado del Procedimiento de Refinado Orgánico.

20 Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. n° 6.162.623. En estos métodos ejemplares, se proporciona una enzima anfifílica. Se puede inmovilizar, por ejemplo preparando una emulsión que contiene una fase hidrófoba continua y una fase acuosa dispersa que contiene la enzima, y un soporte para la enzima, y eliminando agua de la fase dispersa hasta que esta fase se convierte en partículas revestidas con enzima sólidas. La enzima puede ser una lipasa. La lipasa inmovilizada se puede usar para reacciones catalizadas mediante lipasa, tales como interesterificación de mono-, di- o triglicéridos, desacidificación de un aceite triglicérido, o eliminación de fosfolípidos a partir de un aceite triglicérido cuando la lipasa es una fosfolipasa. La fase acuosa puede contener un líquido de fermentación, un aceite triglicérido comestible puede ser la fase hidrófoba, y los soportes incluyen azúcares, almidón, dextrano, derivados de celulosa solubles en agua, y restos de fermentación. Este método ejemplar se puede usar para procesar triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, glicerol, fosfolípidos o ácidos grasos, que pueden estar en la fase hidrófoba. Por ejemplo, el procedimiento para la eliminación de fosfolípidos a partir de un aceite triglicérido comprende mezclar un aceite triglicérido que contiene fosfolípidos con una preparación que contiene una fosfolipasa de la invención; hidrolizar los fosfolípidos a lisofosfolípidos; separar los fosfolípidos hidrolizados del aceite, en el que la fosfolipasa es una fosfolipasa inmovilizada.

25 Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. n° 6.127.137. Este método ejemplar hidroliza ambos grupos acilo grasos en fosfolípido intacto. La fosfolipasa de la invención usada en este método ejemplar no tiene actividad de lipasa, y es activa a pH muy bajo. Estas propiedades la hacen muy adecuada para uso en el desgomado de aceites, ya que se pueden suprimir tanto la hidrólisis enzimática como alcalina (saponificación) del aceite. La invención proporciona un procedimiento para hidrolizar grupos acilo grasos en un fosfolípido o lisofosfolípido, que comprende tratar el fosfolípido o lisofosfolípido con la fosfolipasa que hidroliza ambos grupos acilo grasos en un fosfolípido y está esencialmente libre de actividad de lipasa. La fosfolipasa de la invención tiene un óptimo de temperatura a alrededor de 50°C, medido a pH 3 a pH 4 durante 10 minutos, y un pH óptimo de alrededor de pH 3, medido a 40°C durante alrededor de 10 minutos. El fosfolípido o lisofosfolípido comprende lecitina o lisolecitina. Después de hidrolizar una parte importante del fosfolípido, se separa del aceite una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado. También se proporciona un procedimiento para eliminar fosfolípido de un aceite comestible, que comprende tratar el aceite a pH 1,5 a 3 con una dispersión de una disolución acuosa de la fosfolipasa de la invención, y separar del aceite una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado. El aceite se puede tratar para eliminar mucílago antes del tratamiento con la fosfolipasa. Por ejemplo, el aceite antes del tratamiento con la fosfolipasa contiene el fosfolípido en una cantidad correspondiente a 50 a 250 ppm de fósforo. Por ejemplo, el tratamiento con fosfolipasa se realiza a 30°C a 45°C durante 1 a 12 horas a una dosis de fosfolipasa de 0,1 a 10 mg/l en presencia de 0,5 a 5% de agua.

30 Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. n° 6.025.171. En estos métodos ejemplares las

enzimas de la invención se inmovilizan preparando una emulsión que contiene una fase hidrófoba continua, tal como un aceite triglicérido, y una fase acuosa dispersa que contiene una enzima anfifílica, tal como lipasa o una fosfolipasa de la invención, y material soporte que se disuelve parcialmente o está parcialmente sin disolver en la fase acuosa, y eliminando agua de la fase acuosa hasta que la fase se convierte en partículas de soporte revestidas con enzima sólidas. La parte sin disolver del material soporte puede ser un material que es insoluble en agua y en aceite, o un material soluble en agua en forma no disuelta debido a que la fase acuosa ya está saturada con el material soluble en agua. La fase acuosa se puede formar con un líquido de fermentación de lipasa bruta que contiene restos de fermentación y biomasa que pueden servir como materiales soporte. La lipasa inmovilizada es útil para el reordenamiento y desacidificación de ésteres en aceites. Tras una reacción, la enzima inmovilizada se puede regenerar para una reacción subsiguiente añadiendo agua para obtener una disolución parcial del soporte, y con la enzima resultante y la fase acuosa que contiene el soporte dispersas en una fase hidrófoba evaporando agua para nuevamente formar partículas de soporte revestidas con enzima.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. nº 6.143.545. Este método ejemplar se usa para reducir el contenido de componentes que contienen fósforo en un aceite comestible que comprende una cantidad elevada de contenido de fósforo no hidratable, usando una fosfolipasa de la invención. El método se usa para reducir el contenido de componentes que contienen fósforo en un aceite comestible que tiene un contenido de fósforo no hidratable de al menos 50 ppm medido pretratando el aceite comestible, a 60°C, mediante adición de una disolución que comprende ácido cítrico monohidratado en agua (agua añadida frente a aceite es igual a 4,8% p/p; (ácido cítrico) en fase acuosa = 106 mM, en emulsión de agua/aceite = 4,6 mM) durante 30 minutos; transfiriendo 10 ml de la emulsión de agua en aceite pretratada a un tubo; calentando la emulsión en un baño de agua hirviendo durante 30 minutos; centrifugando a 5000 rpm durante 10 minutos, transfiriendo alrededor de 8 ml de la fase superior (aceite) a un nuevo tubo, y dejando que sedimente durante 24 horas; y extrayendo 2 g de la fase transparente superior para la medida del contenido de fósforo no hidratable (ppm) en el aceite comestible. El método también puede comprender poner en contacto un aceite a un pH de alrededor de pH 5 a 8 con una disolución acuosa de una fosfolipasa A o B (por ejemplo, PLA1, PLA2, o una PLB), disolución la cual se emulsiona en el aceite hasta que se reduce el contenido de fósforo del aceite a menos de 11 ppm, y después separar la fase acuosa del aceite tratado.

Las fosfolipasas y métodos de la descripción también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. nº 5.532.163. La invención proporciona procedimientos para el refinado de aceite y grasa mediante el cual los fosfolípidos en el aceite y grasa a tratar se pueden descomponer y eliminar eficientemente. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el refinado de aceite y grasa que comprende hacer reaccionar, en una emulsión, el aceite y grasa con una enzima de la invención, por ejemplo una enzima que tiene una actividad para descomponer enlaces de éster de ácido graso con glicerol en glicerofosfolípidos (por ejemplo, una PLA2); y otro procedimiento en el que el aceite o grasa tratado con la enzima se lava con agua o una disolución acuosa ácida. La disolución acuosa ácida a usar en la etapa de lavado es una disolución de al menos un ácido, por ejemplo ácido cítrico, ácido acético, ácido fosfórico y sus sales. La condición emulsionada se forma usando 30 partes en peso o más de agua por 100 partes en peso del aceite y grasa. Puesto que el aceite y grasa se pueden purificar sin emplear la etapa de refinado alcalina convencional, se puede reducir la generación de agua de lavado de desecho y el desecho industrial. Además, el rendimiento de la recuperación del aceite se mejora debido a que no se produce en el procedimiento de la invención la pérdida de aceite o grasa neutra debido a su inclusión en estos desechos. La presente descripción proporciona un procedimiento para refinar aceite y grasa que contiene alrededor de 100 a 10.000 ppm de fosfolípidos, que comprende: hacer reaccionar, en una condición emulsionada, dicho aceite y grasa con una enzima de la invención que tiene actividad para descomponer enlaces de éster de ácido graso con glicerol en glicerofosfolípidos. Por ejemplo, la presente descripción proporciona procedimientos para refinar aceite y grasa que contiene alrededor de 100 a 10.000 ppm de fosfolípidos, que comprende hacer reaccionar, en una condición emulsionada, aceite y grasa con una enzima de la invención que tiene actividad para descomponer enlaces de éster de ácido graso con glicerol en glicerofosfolípidos; y lavar subsiguientemente el aceite o grasa tratado con un agua de lavado.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. nº 5.264.367. El contenido de componentes que contienen fósforo y el contenido de hierro de un aceite vegetal o animal comestible, tal como un aceite, por ejemplo aceite de haba de soja, que se ha refinado en húmedo para eliminar mucílago, se reducen mediante descomposición enzimática poniendo en contacto el aceite con una disolución acuosa de una enzima de la invención, por ejemplo una fosfolipasa A1, A2, o B, y separando entonces la fase acuosa del aceite tratado. La presente descripción proporciona un método enzimático para disminuir el contenido de componentes que contienen fósforo y hierro en aceites, que se han refinado para eliminar mucílago. Un aceite, que se ha refinado para eliminar mucílago, se puede tratar con una enzima de la invención, por ejemplo, fosfolipasa C, A1, A2, o B. Se pueden lograr contenidos de fósforo por debajo de 5 ppm, y contenidos de hierro por debajo de 1 ppm. El bajo contenido de hierro puede ser ventajoso para la estabilidad del aceite.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para preparar aceites transesterificados, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. nº 5.288.619. La presente descripción proporciona métodos para la transesterificación enzimática para preparar un aceite de margarina que tiene tanto un contenido bajo de ácido trans

como un contenido bajo de ácido graso de cadena intermedia. El método incluye las etapas de proporcionar una mezcla de reacción de transesterificación que contiene un material fuente de ácido esteárico y un aceite vegetal líquido comestible, transesterificar el material fuente de ácido esteárico y el aceite vegetal usando una lipasa específica de las posiciones 1, 3, y finalmente hidrogenar entonces la mezcla de ácidos grasos para proporcionar un material fuente de ácido graso reciclado para una reacción de reciclaje con el aceite vegetal. La presente descripción también proporciona un método en contracorriente para preparar un aceite transesterificado. El método incluye las etapas de proporcionar una zona de reacción de transesterificación que contiene una lipasa específica de las posiciones 1, 3, introducir un aceite vegetal en la zona de transesterificación, introducir un material fuente de ácido esteárico, conducir un fluido en contracorriente de gas supercrítico o de gas licuado subcrítico, llevar a cabo una reacción de transesterificación de la corriente de triglicérido con la corriente de ácido esteárico o monoéster de ácido esteárico en la zona de reacción, extraer una corriente de aceite de margarina triglicérido transesterificado, extraer una fase fluida en contracorriente, hidrogenar el ácido esteárico o monoéster de ácido esteárico transesterificado para proporcionar un material fuente de ácido esteárico reciclado hidrogenado, e introducir el material fuente de ácido esteárico reciclado hidrogenado en la zona de reacción.

El compuesto fosfolípido muy insaturado se puede convertir en un triglicérido mediante uso apropiado de una fosfolipasa C de la invención para eliminar el grupo fosfato en la posición sn-3, seguido de la síntesis del éster acílico mediante la lipasa 1,3. El fosfolípido sustituido en 2 se puede usar como un ingrediente alimentario funcional directamente, o se puede hidrolizar subsiguientemente de forma selectiva en un reactor 160 usando una fosfolipasa C inmovilizada descrita aquí para producir un 1-diglicérido, seguido de la esterificación enzimática como se describe aquí para producir un producto de triglicérido que tiene un componente de ácido graso poliinsaturado sustituido en 2.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar en un procedimiento de desgomado enzimático de aceites vegetales como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. n° 6.001.640. Este método comprende una etapa de desgomado en la producción de aceites vegetales. Los aceites vegetales de los que se han eliminado fosfátidos hidratables mediante un procedimiento de desgomado acuoso previo se liberan de fosfátidos no hidratables mediante tratamiento enzimático usando una fosfolipasa de la invención. El procedimiento puede ser suave, económico y amigable para el medioambiente. Las fosfolipasas que sólo hidrolizan lisolecitina, pero no lecitina, se usan en este procedimiento de desgomado.

Para permitir que la enzima de la invención actúe, ambas fases, la fase oleosa y la fase acuosa que contiene la enzima, se deben mezclar íntimamente. Puede no ser suficiente agitarlas simplemente. La buena dispersión de la enzima en el aceite es ayudada si se disuelve en una pequeña cantidad de agua, por ejemplo 0,5-5% en peso (con relación al aceite), y se emulsiona en el aceite en esta forma, para formar gotitas de menos de 10 micrómetros de diámetro (media ponderal). Las gotitas pueden ser menores de 1 micrómetro. La agitación turbulenta se puede realizar con velocidades radiales por encima de 100 cm/s. El aceite también se puede hacer circular en el reactor usando una bomba giratoria externa. La fase acuosa que contiene la enzima también se puede dispersar finamente por medio de acción de ultrasonidos. Se puede usar un aparato de dispersión.

La reacción enzimática tiene lugar probablemente en la superficie frontera entre la fase oleosa y la fase acuosa. Es el objetivo de todas estas medidas para el mezclamiento crear la superficie más grande posible para la fase acuosa que contiene la enzima. La adición de tensioactivos aumenta la microdispersión de la fase acuosa. En algunos casos, por lo tanto, se añaden a la disolución enzimática tensioactivos con valores de HLB por encima de 9, tales como dodecilsulfato de sodio, como se describe, por ejemplo, en el documento EP-A 0513709. Un método eficaz similar para mejorar el emulsionamiento es la adición de lisolecitina. Las cantidades añadidas pueden estar en el intervalo de 0,001% a 1%, con referencia al aceite. La temperatura durante el tratamiento enzimático no es crítica. Se pueden usar temperaturas entre 20°C y 80°C, pero esta última sólo se puede aplicar durante un tiempo corto. En este aspecto, se usa una fosfolipasa de la invención que tiene una buena tolerancia a la temperatura y/o al pH bajo. Son óptimas las temperaturas de aplicación entre 30°C y 50°C. El período de tratamiento depende de la temperatura, y se puede mantener más corto al incrementar la temperatura. Generalmente son suficientes los tiempos de 0,1 a 10 horas, o 1 a 5 horas. La reacción tiene lugar en un reactor de desgomado, que se puede dividir en etapas, como se describe, por ejemplo, en el documento DE-A 4339556. Por lo tanto, es posible la operación continua, junto con la operación discontinua. La reacción se puede llevar a cabo en etapas de temperatura diferentes. Por ejemplo, la incubación puede tener lugar durante 3 horas a 40°C, después durante 1 hora a 60°C. Si la reacción transcurre en etapas, esto también abre la posibilidad de ajustar diferentes valores de pH en las etapas individuales. Por ejemplo, en la primera etapa, el pH de la disolución se puede ajustar a 7, por ejemplo, y en una segunda etapa a 2,5, añadiendo ácido cítrico. Sin embargo, en al menos una etapa, el pH de la disolución enzimática debe estar por debajo de 4, o por debajo de 3. Si el pH se ajusta subsiguientemente por debajo de este nivel, se puede encontrar un deterioro del efecto. Por lo tanto, el ácido cítrico se puede añadir a la disolución enzimática antes de que ésta última se mezcle en el aceite.

Tras terminar el tratamiento enzimático, la disolución enzimática, junto con los productos de descomposición del NHP contenido en ella, se puede separar de la fase oleosa, por lotes o de forma continua, por ejemplo por medio de centrifugación. Puesto que las enzimas se caracterizan por un nivel elevado de estabilidad, y la cantidad de los productos de descomposición contenidos en la disolución es pequeña (pueden precipitar como lodo), la misma fase enzimática acuosa se puede usar varias veces. También existe la posibilidad de liberar la enzima del lodo, véase, por ejemplo, el documento DE-A 4339556, de manera que se puede usar nuevamente una disolución enzimática

que está esencialmente libre de lodo. Como resultado de este procedimiento de desgomado, se obtienen aceites que contienen menos de 15 ppm de fósforo. Un objetivo son contenidos de fósforo menores de 10 ppm, o menores de 5 ppm. Con contenidos de fósforo por debajo de 10 ppm, es fácilmente posible el procesamiento adicional del aceite según el procedimiento de desacidificación destilativa. Un número de otros iones, tales como magnesio, calcio, cinc, así como hierro, se puede eliminar del aceite, por ejemplo por debajo de 0,1 ppm. De este modo, este producto posee prerequisites ideales para una buena resistencia a la oxidación durante el procesamiento y almacenamiento posteriores.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para reducir la cantidad de componentes que contienen fósforo en aceites vegetales y animales como se describe, por ejemplo, en la patente europea EP 0513709. En este método, el contenido de componentes que contienen fósforo, especialmente fosfátidos, tales como lecitina, y el contenido de hierro en aceites vegetales y animales, que se han deslodado previamente, por ejemplo aceite de soja, se reducen mediante ruptura enzimática usando una fosfolipasa A1, A2 o B.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para refinar grasa o aceites como se describe, por ejemplo, en el documento JP 06306386. Se describen procedimientos para refinar una grasa o aceite, que comprenden una etapa de convertir un fosfolípido en una grasa o un aceite en una sustancia soluble en agua que contiene grupos fosfóricos, y eliminar esta sustancia. La acción de una enzima de la invención (por ejemplo, una PLC) se utiliza para convertir el fosfolípido en la sustancia. De este modo, es posible refinar una grasa o aceite sin llevar a cabo una etapa de refinado alcalino a partir de la que se producen desechos industriales que contienen agua de desecho alcalina y una gran cantidad de aceite. La mejora de los rendimientos se puede lograr debido a que la pérdida de grasa o aceite neutro del escape de los desechos se puede reducir a cero. Las sustancias gomosas se convierten en sustancias solubles en agua y se eliminan como sustancias solubles en agua añadiendo una enzima de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa C en la etapa de desgomado del aceite bruto y llevando a cabo el tratamiento enzimático. La fosfolipasa C de la invención puede tener una actividad que corta enlaces de éster de glicerina con ácido fosfórico en fosfolípidos. Si es necesario, el método puede comprender lavar el aceite tratado con enzima con agua o una disolución acuosa ácida. La enzima de la invención se añade a y se hace reaccionar con el aceite bruto. La cantidad de fosfolipasa C empleada puede ser 10 a 10.000 unidades, o alrededor de 100 a 2.000 unidades, por 1 kg de aceite bruto.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para procedimientos de desgomado con agua como se describe, por ejemplo, en Dijkstra, Albert J., et al., *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* (1998), 5(5), 367-370. En este método ejemplar, el procedimiento de desgomado con agua se usa para la producción de lecitina y para procedimientos de desgomado en seco que usan un ácido de desgomado y tierra de blanqueo. Este método puede ser económicamente factible sólo para aceites con un bajo contenido de fosfátido, por ejemplo aceite de palma, aceites láuricos, etc. Para aceites de semillas que tienen un contenido elevado de NHP, se usa el procedimiento de refinado ácido, con lo que este procedimiento se lleva a cabo en el molino de aceite para permitir el desecho de la goma vía la harina. Este aceite refinado con ácido es una operación de "pulido" posible a llevar a cabo antes del refinado físico.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para procedimientos de desgomado como se describen, por ejemplo, en Dijkstra, et al., *Res. Dev. Dep., N.V. Vandemoortele Coord. Cent., Izegem, Belg. JAOCs, J. Am. Oil Chem. Soc.* (1989), 66:1002-1009. En este método ejemplar, el procedimiento de desgomado total implica dispersar un ácido, tal como H_3PO_4 o ácido cítrico, en aceite de haba de soja, permitir un tiempo de contacto, y mezclar después una base, tal como sosa cáustica o silicato de sodio, en la emulsión de ácido en aceite. Esto mantiene el grado de neutralización suficientemente bajo para evitar formar jabones, debido a que eso conduciría a una mayor pérdida de aceite. Subsiguientemente, el aceite se hace pasar a un separador centrífugo en el que la mayoría de las gomas se eliminan de la corriente de aceite para producir una fase de goma con un contenido mínimo de aceite. La corriente de aceite se hace pasar entonces a un segundo separador centrífugo para eliminar todas las gomas que quedan para producir una fase de goma diluida, que se recicla. El lavado y el secado o el refinado alcalino en línea completan el procedimiento. Tras la adopción del procedimiento de desgomado total, en comparación con el procedimiento de refinado alcalino clásico, se obtiene una mejora del rendimiento global de alrededor de 0,5%. El aceite desgomado totalmente se puede refinar subsiguientemente de forma alcalina, se puede blanquear y desodorizar, o se puede blanquear y refinar físicamente.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para la eliminación de fosfolípidos no hidratables a partir de un aceite vegetal, por ejemplo aceite de haba de soja, como se describe, por ejemplo, en Hvolby, et al., *Sojakagefabr., Copenhagen, Den., J. Amer. Oil Chem. Soc.* (1971) 48:503-509. En este método ejemplar, el aceite desgomado con agua se mezcla a diferentes valores de pH fijos con disoluciones tampón con y sin Ca^{++} , reactivos de unión a Mg/Ca, y tensioactivos. Los fosfolípidos no hidratables se pueden eliminar en un estado no convertido como un componente de micelas o de emulsionantes mixtos. Además, los fosfolípidos no hidratables son eliminables mediante conversión en formas disociadas, por ejemplo mediante eliminación de Mg y Ca de los fosfatidatos, lo que se puede lograr mediante acidulación o mediante tratamiento con reactivos complejantes de Mg/Ca o precipitantes de Mg/Ca. La eliminación o conversión química de los fosfolípidos no hidratables puede dar como resultado la formación reducida de emulsión y la separación mejorada del aceite desacidificado a partir de la capa de emulsión y la grasa para jabón.

- Las fosfolipasas y métodos de la descripción también se pueden usar para el desgomado de aceites vegetales como se describe, por ejemplo, Buchold, et al., Frankfurt/Main, Alemania. *Fett Wissenschaft Technologie* (1993), 95(8), 300-304. En este procedimiento ejemplar para el desgomado de aceites vegetales comestibles, se usan suspensiones acuosas de una enzima de la invención, por ejemplo fosfolipasa A2, para hidrolizar el ácido graso unido a la posición sn2 del fosfolípido, dando como resultado 1-acil-lisofosfolípidos que son insolubles en aceite y de este modo más susceptibles a la separación física. Incluso la adición de pequeñas cantidades correspondientes a alrededor de 700 unidades de lecitasa/kg de aceite da como resultado una concentración residual de P menor que 10 ppm, de manera que el refinado químico es sustituible por el refinado físico, eliminando la necesidad de neutralización, división de la grasa para jabón, y tratamiento con agua de desecho.
- Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para el desgomado de aceites vegetales como se describe, por ejemplo, por EnzyMax. Dahlke, Klaus. Dept. G-PDO, Lurgi Öl-Gas, Chemie, GmbH, Frankfurt, Alemania. *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* (1997), 4(1), 55-57. Este procedimiento ejemplar es un procedimiento de desgomado para el refinado físico de casi cualquier tipo de aceite. Mediante una hidrólisis catalizada enzimáticamente, los fosfátidos se convierten en lisofosfátidos solubles en agua, que se separan del aceite mediante centrifugación. El contenido de fósforo residual en el aceite desgomado enzimáticamente puede ser tan bajo como 2 ppm de P.
- Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para el desgomado de aceites vegetales como se describe, por ejemplo, por Cleenewerck, et al., N.V. Vamo Mills, Izegem, Belg. *Fett Wissenschaft Technologie* (1992), 94:317-22; y, Clausen, Kim; Nielsen, Munk. *Novozymes A/S, Den. Dansk Kemi* (2002) 83(2):24-27. Las fosfolipasas y métodos de la invención pueden incorporar el refinado previo de aceites vegetales con ácidos como se describe, por ejemplo, por Nilsson-Johansson, et al., Fats Oils Div., Alfa-Laval Food Eng. AB, Tumba, Swed. *Fett Wissenschaft Technologie* (1988), 90 (11), 447-51; y, Munch, Ernst W. *Cereol Deutschland GmbH, Mannheim, Alemania*. Editor(es): Wilson, Richard F. *Proceedings of the World Conference on Oilseed Processing Utilization, Cancun, Mexico, Nov. 12-17, 2000* (2001), Meeting Date 2000, 17-20.
- Las fosfolipasas y métodos de la descripción también se pueden usar para el desgomado de aceites vegetales como se describe, por ejemplo, por Jerzewska, et al., Inst. Przemyslu Miesnego i Tluszczowego, Warsaw, Pol., *Tluszczze Jadalne* (2001), 36(3/4), 97-110. En este procedimiento, el desgomado enzimático de aceite de colza hidratado con bajo contenido de ácido erúico es mediante el uso de una fosfolipasa A2. La enzima puede catalizar la hidrólisis de enlaces de éster de ácido graso al átomo de carbono central del resto de glicerol en fosfolípidos. Puede hidrolizar fosfolípidos no hidratables a sus lisocompuestos hidratables correspondientes. Con una preparación enzimática no purificada, se pueden lograr mejores resultados con la adición de una preparación del 2% durante 4 horas (87% de eliminación de P).
- En otro procedimiento ejemplar de la invención para el desgomado de aceite (o un procedimiento de desgomado de aceite que usa una enzima de la invención), se añade un polímero ácido, por ejemplo un alginato o pectina. En este procedimiento de desgomado de aceite de la invención, se añade un polímero ácido (por ejemplo, ácido alginico o pectina, o una forma salina más soluble) al aceite bruto con una cantidad baja de agua (por ejemplo, en un intervalo de entre alrededor de 0,5 y 5%). Por ejemplo, los polímeros ácidos pueden reducir y/o destruir complejos de fosfolípido-metal mediante la unión de calcio y/o magnesio en el aceite bruto, mejorando de ese modo la solubilidad de los fosfolípidos no hidratables. Como alternativa, estos fosfolípidos se moverán a la interfaz aceite/agua o entrarán en la fase acuosa y se convertirán en diacilglicerol, y la cadena lateral correspondiente o el fosfolípido intacto se eliminará mediante centrifugación subsiguiente como un componente de la fase pesada. La presencia del polímero ácido en la fase acuosa puede incrementar también la densidad de la fase acuosa, y puede dar como resultado una separación mejorada de la fase pesada a partir de la fase oleosa (ligera).
- Un procedimiento ejemplar para el desgomado de aceite (o un procedimiento de desgomado de aceite que usa una enzima de la invención) altera el procedimiento de desodorización para obtener una fracción de diacilglicerol (DAG). Como alternativa, si es necesario o se desea, tras el desgomado asistido por enzimas, las condiciones de desodorización (temperatura, presión, configuración del aparato de destilación) se pueden modificar con el objetivo de mejorar la separación de los ácidos grasos libres (FFA) de la fracción de diacilglicerol/triacilglicerol, o se pueden modificar adicionalmente para separar el diacilglicerol de la fracción de triacilglicerol. Como resultado de estas modificaciones, usando este método, es posible obtener FAA y diacilglicerol de grado alimentario si se usa una enzima de la invención (por ejemplo, una fosfatasa, o una PLC, o una combinación de PLC y fosfatasas) para desgomar aceite comestible en un procedimiento de refinado físico.
- La práctica de los métodos como se describen aquí (o el uso de las enzimas de la invención) tiene ventajas tales como: disminuye o elimina el disolvente y la recuperación del disolvente; reduce los costes de capital; disminuye los costes del refinado aguas abajo, disminuye el uso de sustancias químicas, equipo, tiempo de procesamiento, energía (calor) y uso de agua/generación de aguas de desecho; produce aceite de mayor calidad; el aceite prensado por el expulsor se puede usar sin refinar en algunas aplicaciones de cocción y salteado (este aceite prensado puede tener características superiores de estabilidad, color y olor, y un contenido elevado de tocoferol); produce harina de mayor calidad; produce un menor contenido de grasa en la harina (actualmente, la harina que sale de la prensa mecánica provoca problemas de digestión en rumiantes); produce atributos nutricionales mejorados – niveles

reducidos de glucosinolatos, taninos, sinapina, ácido fítico (como se describe, por ejemplo, en Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils, AOCS 1997).

La presente descripción proporciona métodos para refinar aceites vegetales (por ejemplo, aceite de haba de soja, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de palma, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de alazor, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo, aceite de salvado de arroz, aceite de coco o aceite de cáñola) y sus subproductos, y procedimientos para desodorizar lecitina, por ejemplo como se describe en la patente U.S. nº 6.172.248, o 6.172.247, en el que los métodos comprenden usar al menos una enzima de la invención, por ejemplo una fosfolipasa C. De este modo, la presente descripción proporciona lecitina y aceites vegetales que comprenden al menos una enzima de la invención. En un procedimiento de refinado ácido orgánico ejemplar, el aceite vegetal se combina con una disolución acuosa diluida de ácido orgánico y se somete a cizallamiento elevado para dispersar finamente la disolución de ácido en el aceite. La mezcla resultante de ácido y aceite se mezcla a bajo cizallamiento durante un tiempo suficiente para secuestrar contaminantes en una fase de impurezas hidratadas, produciendo una fase de aceite vegetal purificada. En este procedimiento ejemplar, se puede usar una mezcladora o sistema de reciclado (por ejemplo, un tanque de agua de reciclaje) y/o un tanque de almacenamiento de fosfátido o lecitina, por ejemplo como se describe en las patentes U.S. nºs 4.240.972, 4.049.686, 6.172.247 ó 6.172.248. Estos procedimientos se pueden llevar a cabo como un procedimiento discontinuo o continuo. El aceite vegetal bruto o desgomado se puede suministrar desde un tanque de almacenamiento (por ejemplo, a través de una bomba) y se puede calentar. El aceite vegetal a purificar puede ser aceite bruto o "desgomado".

Las enzimas de fosfatidilinositol-PLC (PI-PLC) se usan para el desgomado de aceite vegetal. Las enzimas PI-PLC descritas aquí se pueden usar solas o en combinación con otras enzimas (por ejemplo enzimas PLC, PLD, fosfatasa) para mejorar el rendimiento de aceite durante el desgomado de aceites vegetales (incluyendo haba de soja, cáñola, y girasol). La PI-PLC puede convertir preferentemente fosfatidilinositol en 1,2-diacilglicerol (DAG) y fosfoinositol, pero también puede demostrar actividad en otros fosfolípidos, incluyendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, o ácido fosfatídico, o una combinación de los mismos. La mejora en el rendimiento se observará como un incremento en la cantidad de DAG en el aceite vegetal tratado con enzimas, y un incremento en el aceite neutro, debido a una disminución en la cantidad de aceite arrastrado en la fracción de goma más pequeña que resulta del tratamiento enzimático del aceite vegetal.

Procesamiento enzimático de oleaginosas

La invención proporciona composiciones (por ejemplo, enzimas) y métodos para el procesamiento enzimático de oleaginosas, incluyendo pasta de haba de soja, cáñola, coco, aguacate y aceituna. Estos procedimientos pueden incrementar el rendimiento de aceite y mejorar la calidad nutricional de las harinas obtenidas. El procesamiento enzimático de oleaginosas usando las enzimas y métodos de la invención proporcionará beneficios económicos y medioambientales, así como tecnologías alternativas para la extracción de aceite y procesamiento de alimentos para el consumo humano y animal. Como alternativa, los procedimientos de la invención comprenden el uso de fosfolipasas de la invención, otras fosfolipasas, proteasas, fosfatasa, fitasas, xilanasas, amilasas (por ejemplo, α -amilasas), glucanasas (por ejemplo, α -glucanasas), poligalacturonasas, galactolipasas, celulasas, hemicelulasas, pectinasas, y otras enzimas que degradan la pared celular de las plantas, así como preparaciones enzimáticas mixtas y lisados celulares.

Como alternativa, los procedimientos de la invención se pueden poner en práctica junto con otros procedimientos, por ejemplo tratamientos enzimáticos, por ejemplo con carbohidrasas, incluyendo celulasa, hemicelulosa y otras actividades degradantes secundarias, o procedimientos químicos, por ejemplo extracción de aceite de haba de soja con hexano. El tratamiento enzimático puede incrementar la capacidad de extracción del aceite en 8-10% cuando el tratamiento enzimático se lleva a cabo antes de la extracción con disolventes.

Como alternativa, los procedimientos de la invención se pueden poner en práctica con procedimientos de extracción acuosos. Los métodos de extracción acuosos pueden ser de tecnologías alternativas medioambientalmente más limpias para la extracción de aceite. Los rendimientos bajos de extracción de procedimientos acuosos se pueden superar usando enzimas que hidrolizan los polisacáridos estructurales que forman la pared celular de oleaginosas, o que hidrolizan las proteínas que forman las membranas del cuerpo lipídicas y celulares, por ejemplo utilizando digestiones que comprenden celulasa, hemicelulasa, y/o protopectinasa para la extracción de aceite a partir de células de haba de soja. Los métodos se pueden poner en práctica con una enzima de la invención como se describe por Kasai (2003) J. Agric. Food Chem. 51:6217-6222, que dio a conocer que la enzima más eficaz para digerir la pared celular fue celulasa.

Las proteasas se pueden usar en combinación con los métodos de la invención. Se ha evaluado el efecto combinado de variables operacionales y actividad enzimática de proteasa y celulasa sobre los rendimientos de extracción de aceite y proteína, combinado con otros parámetros del procedimiento, tales como concentración enzimática, tiempo de hidrólisis, tamaño de las partículas y relación sólido a líquido. En un aspecto, los métodos se ponen en práctica con una enzima de la invención como se describe por Rosenthal (2001) Enzyme and Microb. Tech. 28:499-509, que dio a conocer que el uso de proteasa puede dar como resultado rendimientos significativamente mayores de aceite y proteína con respecto al control cuando se usa harina tratada con calor.

La extracción completa de proteína, pectina, y hemicelulosa se puede usar en combinación con los métodos de la invención. La célula vegetal consiste en una serie de polisacáridos asociados a menudo con o sustituidos por proteínas o compuestos fenólicos. La mayoría de estos hidratos de carbono son digeridos sólo parcialmente o se utilizan pobremente por las enzimas digestivas. La destrucción de estas estructuras a través del procesamiento o enzimas degradantes puede mejorar su disponibilidad de nutrientes. Los métodos se pueden poner en práctica con una enzima de la invención como se describe por Ouhida (2002) J. Agric. Food Chem. 50:1933-1938, que dio a conocer que se ha logrado una degradación significativa de la celulosa de la pared celular de haba de soja (hasta 20%) tras la extracción total de proteína, pectina y hemicelulosa.

Los métodos descritos aquí comprenden además la incorporación de diversos tratamientos enzimáticos en el tratamiento de semillas, por ejemplo semillas de cáñola, comprendiendo estos tratamientos el uso de proteasas, celulasas, y hemicelulasas (en diversas combinaciones entre sí y con una o más enzimas de la invención). Por ejemplo, los métodos pueden comprender tratamientos enzimáticos de semillas de cáñola a humedad de 20 a 40 durante la incubación con enzimas antes de un procedimiento convencional, como se describe, por ejemplo, por Sosulski (1990) Proc. Can. Inst. Food Sci. Technol. 3:656. Los métodos de la invención pueden comprender además la incorporación de proteasas, α -amilasas, poligalacturonasas (en diversas combinaciones entre sí y con una o más enzimas de la invención) para hidrolizar material celular en harina de coco y liberar aceite de coco, que se puede recuperar mediante centrifugación, como se describe por McGlone (1986) J. of Food Sci. 51:695-697. Los métodos descritos aquí pueden comprender además la incorporación de pectinasas, α -amilasas, proteasas, celulasas en diferentes combinaciones (entre sí y con una o más enzimas de la invención) para dar como resultado una mejora significativa del rendimiento (~70% en el mejor caso) durante la extracción enzimática de aceite de aguacate, como se describe, por ejemplo, por Buenrosto (1986) Biotech. Letters 8(7):505-506. En los procedimientos para la extracción de aceite de oliva, la pasta de oliva se trata con celulasa, hemicelulasa, poligalacturonasa, pectina-metiltransferasa, proteasa y sus combinaciones (entre sí y con una o más enzimas de la invención), como se describe, por ejemplo, por Montedoro (1976) Acta Vitamin. Enzymol. (Milano) 30:13.

25 Composiciones detergentes

La invención proporciona composiciones detergentes que comprenden una o más fosfolipasas de la invención, y métodos para obtener y usar estas composiciones. La invención incorpora todos los métodos para obtener y usar composiciones detergentes, véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n^{os} 6.413.928; 6.399.561; 6.365.561; 6.380.147. Las composiciones detergentes pueden ser una composición acuosa de una o dos partes, una composición líquida no acuosa, un sólido moldeado, una forma granular, una forma en partículas, un comprimido prensado, un gel y/o una pasta y una forma en suspensión. La presente descripción también proporciona métodos capaces de eliminar rápidamente manchas gruesas de alimento, películas de restos de alimento, u otras composiciones menores de alimentos, usan estas composiciones detergentes. Las fosfolipasas de la invención pueden facilitar la eliminación de manchas por medio de hidrólisis catalítica de fosfolípidos. Las fosfolipasas descritas aquí se pueden usar en detergentes lavavajillas y en detergentes para la colada.

El contenido de enzima activa real depende del método de fabricación de una composición detergente, y no es crítico, suponiendo que la disolución detergente tenga la actividad enzimática deseada. Por ejemplo, la cantidad de fosfolipasa presente en la disolución final oscila desde alrededor de 0,001 mg a 0,5 mg por gramo de la composición detergente. La enzima particular escogida para uso en el procedimiento y productos de esta descripción depende de las condiciones de utilidad final, incluyendo la forma física del producto, pH de uso, temperatura de uso, y tipos de suciedades a degradar o alterar. La enzima se puede escoger para proporcionar actividad y estabilidad óptimas para cualquier conjunto dado de condiciones de utilidad. Los polipéptidos descritos aquí son activos en los intervalos de pH de alrededor de 4 a alrededor de 12, y en el intervalo de temperatura de alrededor de 20°C a alrededor de 95°C. Los detergentes de la invención pueden comprender tensioactivos catiónicos, no iónicos semipolares o zwitteriónicos; o sus mezclas.

Las fosfolipasas de la presente invención se pueden formular en detergentes en polvo y líquidos que tienen pH entre 4,0 y 12,0 a niveles de alrededor de 0,01 a alrededor de 5% (preferiblemente 0,1% a 0,5%) en peso. Estas composiciones detergentes también pueden incluir otras enzimas, tales como proteasas, celulasas, lipasas o endoglucosidasas conocidas, así como mejoradores de los detergentes y estabilizantes. La adición de fosfolipasas de la invención a composiciones de limpieza convencionales no crea ninguna limitación de uso especial. En otras palabras, también es adecuada cualquier temperatura y pH adecuado para el detergente para las presentes composiciones, en tanto que el pH esté dentro del intervalo anterior, y la temperatura esté por debajo de la temperatura de desnaturalización de la enzima descrita. Además, los polipéptidos de la invención se pueden usar en una composición de limpieza sin detergentes, nuevamente ya sea sola o en combinación con mejoradores del detergente y estabilizantes.

La presente descripción proporciona composiciones de limpieza o desinfectantes que incluyen composiciones detergentes y/o desinfectantes para limpiar y/o desinfectar superficies duras, composiciones detergentes para limpiar y/o desinfectar tejidos, composiciones lavavajillas, composiciones para la limpieza oral, composiciones para la limpieza de la dentadura, y/o disoluciones limpiadoras de lentes de contacto.

La presente descripción proporciona un método para lavar un objeto que comprende poner en contacto el objeto con

una fosfolipasa de la invención en condiciones suficientes para el lavado. Una fosfolipasa de la invención se puede incluir como un aditivo detergente. La composición detergente de la invención se puede formular, por ejemplo, como una composición detergente para la colada a mano o a máquina, que comprende una fosfolipasa de la invención. Un aditivo para la colada, adecuado para el pretratamiento de tejidos manchados, puede comprender una fosfolipasa de la invención. Una composición suavizante de tejidos puede comprender una fosfolipasa de la invención. Como alternativa, una fosfolipasa de la invención se puede formular como una composición detergente para uso en operaciones de limpieza de superficies duras domésticas generales. Como alternativa, los aditivos detergentes y composiciones detergentes de la invención pueden comprender una o más enzimas tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, otra fosfolipasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una manasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanas, una oxidasa, por ejemplo una lactasa, y/o una peroxidasa. Las propiedades de la enzima o enzimas descritas aquí se escogen para que sean compatibles con el detergente seleccionado (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la enzima o enzimas están presentes en cantidades eficaces. Las enzimas de fosfolipasa de la invención se pueden usar para eliminar materiales de mal olor de los tejidos. Diversas composiciones detergentes y métodos para obtenerlas que se pueden usar en la práctica de la invención se describen, por ejemplo, en las patentes U.S. n^{os} 6.333.301; 6.329.333; 6.326.341; 6.297.038; 6.309.871; 6.204.232; 6.197.070; 5.856.164.

Tratamiento de desechos

Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en el tratamiento de desechos, por ejemplo un procedimiento de digestión de desechos sólidos que usa fosfolipasas de la invención. Los métodos pueden comprender reducir la masa y volumen de un desecho sólido sustancialmente no tratado. El desecho sólido se puede tratar con un procedimiento digestivo enzimático en presencia de una disolución enzimática (que incluye fosfolipasas de la invención) a una temperatura controlada. El desecho sólido se puede convertir en un desecho licuado y cualquier desecho sólido residual. El desecho licuado resultante se puede separar de cualquier desecho solidificado residual. Véase, por ejemplo, la patente U.S. n^o 5.709.796.

Conversión de biomasa y producción de biocombustibles limpios

La presente descripción proporciona polipéptidos, incluyendo enzimas (fosfolipasas (PLs), por ejemplo PLAs, PLCs o PLDs) y anticuerpos, y métodos para la conversión de una biomasa o cualquier material lignocelulósico (por ejemplo, cualquier composición que comprenda celulosa, hemicelulosa y lignina) en un combustible (por ejemplo, bioetanol, biopropanol, biobutanol, biopropanol, biometanol, biodiésel), además de piensos, alimentos y sustancias químicas. Por ejemplo, la enzima o enzimas de la invención usadas para la conversión de biomasa y para la producción de biocombustibles pueden tener una o más actividades de fosfolipasa, incluyendo una actividad de fosfolipasa C (PLC); una actividad de fosfolipasa A (PLA), tal como una actividad de fosfolipasa A1 o de fosfolipasa A2; una actividad de fosfolipasa D (PLD), tal como una actividad de fosfolipasa D1 o de fosfolipasa D2; una actividad de fosfolipasa B (PLB), por ejemplo una actividad de fosfolipasa y de lisofosfolipasa (LPL), o una actividad de fosfolipasa y de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o una actividad de fosfolipasa y de lisofosfolipasa (LPL) y una actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o actividad de patatina, o una combinación de las mismas.

De este modo, las composiciones y métodos descritos aquí proporcionan alternativas o auxiliares eficaces y sostenibles para usar productos a base de petróleo, por ejemplo como una mezcla de un biocombustible tal como biometanol, bioetanol, biopropanol, biobutanol, y similar, a combustible diésel, gasolina, queroseno y similar. La descripción proporciona organismos que expresan enzimas de la invención para la participación en ciclos químicos que implican conversión de biomasa natural. Las enzimas y métodos para la conversión se usan en ensamblajes enzimáticos para el procesamiento de fosfolípidos. La descripción proporciona métodos para descubrir e implementar las enzimas más eficaces para permitir estos nuevos procedimientos importantes de "conversión de biomasa" y procedimientos industriales energéticos alternativos.

Las composiciones y métodos descritos aquí se pueden usar para proporcionar alternativas o auxiliares eficaces y sostenibles para usar productos a base de petróleo, por ejemplo como una mezcla de bioetanol, biopropanol, biobutanol, biopropanol, biometanol y/o biodiésel y gasolina. La presente descripción proporciona organismos que expresan enzimas de la invención para la participación en ciclos químicos que implican la conversión de biomasa natural. La presente descripción proporciona métodos para descubrir e implementar las enzimas más eficaces para permitir estos nuevos procedimientos importantes de "conversión de biomasa" y procedimientos industriales energéticos alternativos.

Se proporcionan métodos, enzimas y mezclas de enzimas o "cócteles" para procesar un material, por ejemplo un material biomásico, que comprende un celooligosacárido, un oligómero de arabinoxilano, una lignina, una lignocelulosa, un xilano, un glucano, una celulosa y/o un azúcar fermentable, que comprenden poner en contacto la composición con un polipéptido de la invención, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la invención, en el que opcionalmente el material deriva de una cosecha agrícola (por ejemplo, trigo, cebada, patatas, panizo de pradera, madera de álamo), es un subproducto de una producción de alimentos o de piensos, es un producto residual lignocelulósico, o es un residuo vegetal o un papel residual o un producto de papel residual, y opcionalmente el residuo vegetal comprende tallos, hojas, vainas, cáscaras, maíz o mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, fibra de maíz, heno, paja (por ejemplo paja de arroz o paja de trigo), bagazo de caña de azúcar, pulpa de

- remolacha, pulpa de cítrico, y pieles de cítricos, madera, lascas de madera, virutas de madera, pasta maderera, residuo de pasta, residuo maderero, astillas de madera y serrín, residuos y restos de construcción y/o de demolición (por ejemplo madera, virutas de madera y serrín), y opcionalmente el residuo papelerero comprende papel de fotocopia descargado o usado, papel de impresora de ordenador, papel de agenda, papel de bloc de notas, papel de máquina de escribir, periódicos, revistas, cartón y materiales de envasado a base de papel, y materiales de papel reciclado. Además, se pueden usar desechos urbanos, por ejemplo la fracción papelerera de residuos sólidos municipales, residuos madereros municipales, y residuos vegetales municipales, junto con otros materiales que contienen azúcar, almidón, y/o celulosa. Como alternativa, el procesamiento del material, por ejemplo el material biomásico, genera un bioalcohol, por ejemplo un bioetanol, un biometanol, biobutanol o biopropanol.
- 5
- 10 Como alternativa, el polipéptido de la invención se puede expresar en el material vegetal biomásico o en la propia materia prima.
- Los métodos descritos aquí también incluyen coger una biomasa o material vegetal procesado o “convertido” (por ejemplo, mediante un procedimiento que comprende el uso de una enzima de esta invención), por ejemplo un material que comprende lípidos o un material lignocelulósico (procesado, por ejemplo, mediante enzimas de la invención) y convertirlo en un combustible (por ejemplo un bioalcohol, por ejemplo un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel) mediante fermentación (por ejemplo, mediante levadura) y/o mediante síntesis química. Los azúcares producidos se fermentan, y/o los productos no fermentables se gasifican.
- 15
- Los métodos de la invención también incluyen convertir algas, aceite vegetal tal como aceites vegetales vírgenes o aceites vegetales residuales, grasas animales y grasas (por ejemplo sebo, manteca, y grasa amarilla), o aguas residuales, usando enzimas de la invención, y convertirlos en un combustible (por ejemplo, un bioalcohol, por ejemplo un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel) mediante fermentación y/o mediante síntesis o conversión química.
- 20
- Las enzimas de la invención (incluyendo, por ejemplo, organismos tales como microorganismos, por ejemplo hongos, levaduras o bacterias, que fabrican y por ejemplo segregan enzimas recombinantes) se pueden usar en o se pueden incluir/integrar en cualquier etapa en cualquier procedimiento de conversión de biomasa, por ejemplo en una etapa cualquiera, varias etapas, o se pueden incluir en todas las etapas, o todos los siguientes métodos de procedimientos de conversión de biomasa, o todas estas alternativas de biocombustible:
- 25
- **Combustión directa:** la combustión de material por calor directo, y es la tecnología de biomasa más simple; puede ser muy económica si la fuente de biomasa está próxima.
- 30
- **Pirólisis:** es la degradación térmica de la biomasa por calor en ausencia de oxígeno. La biomasa se puede calentar hasta una temperatura entre alrededor de 800 y 1400 grados Fahrenheit, pero no se introduce oxígeno para apoyar la combustión, dando como resultado la creación de gas, fueloil y carbón.
 - **Gasificación:** la biomasa se puede usar para producir metano a través del calentamiento o digestión anaerobia. Se puede derivar de la biomasa un Syngas, una mezcla de monóxido de carbono e hidrógeno.
- 35
- **Gas de vertedero:** es generado por la descomposición (digestión anaerobia) de basura enterrada en vertederos. Cuando el residuo orgánico se descompone, genera gas que consiste en aproximadamente 50% de metano, el componente principal de gas natural.
 - **Digestión anaerobia:** convierte materia orgánica en una mezcla de metano, el componente principal de gas natural, y dióxido de carbono. La biomasa tal como agua residual (aguas de cloaca), estiércol, o residuo del procesamiento de alimentos, se mezcla con agua y se alimenta en un tanque digestor sin aire.
- 40
- **Fermentación**
 - **Fermentación alcohólica:** el alcohol de combustible se produce convirtiendo masa celulósica y/o almidón en azúcar, fermentando el azúcar hasta alcohol, separando después por destilación la mezcla de agua y alcohol. Las materias primas tales como cosechas dedicadas (por ejemplo, trigo, cebada, patatas, panizo de pradera, madera de álamo), residuos o restos agrícolas (por ejemplo, paja de arroz, rastrojo de maíz, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz, fibra de maíz, pulpa de remolacha, pulpa de cítrico, y pieles de cítricos), residuos de bosques (por ejemplo, lascas de maderas duras y maderas blandas, residuos de maderas duras y de maderas blandas procedentes de operaciones de la madera, virutas de madera, y serrín), residuos urbanos (por ejemplo, fracción de papel de residuos sólidos municipales, residuo maderero municipal, residuos vegetales municipales), residuos madereros (por ejemplo residuo de aserradero, residuo de molienda de pasta maderera, residuo de construcción, residuo de demolición, lascas de madera, y serrín), virutas y papel residual u otros materiales que contienen azúcar, almidón, y/o celulosa se pueden convertir en azúcares, y después en alcohol mediante fermentación con levadura. Como alternativa, los materiales que contienen azúcares se pueden convertir directamente en alcohol mediante fermentación.
- 50
- **Transesterificación:** Una reacción ejemplar para convertir aceite en biodiésel se denomina transesterificación. El procedimiento de transesterificación hace reaccionar un alcohol (como metanol) con los
- 55

aceites triglicéridos contenidos en aceites vegetales, grasas animales, o grasas recicladas, formando ésteres alquílicos de ácidos grasos (biodiésel) y glicerina. La reacción requiere calor y un catalizador de base fuerte, tal como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio.

5 ■ Biodiésel: El biodiésel es una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos obtenidos de aceites vegetales, grasas animales o grasas recicladas. El biodiésel se puede usar como un combustible para vehículos en su forma pura, pero se usa habitualmente como un aditivo para diésel de petróleo, para reducir los niveles de partículas, monóxido de carbono, hidrocarburos y tóxicos del aire procedentes de vehículos alimentados por diésel.

10 ■ Hidrólisis: incluye hidrólisis de un compuesto, por ejemplo una biomasa, tal como un material lignocelulósico, catalizado usando una enzima de la actual invención.

■ Cogeneración: es la producción simultánea de más de una forma de energía usando un único combustible en instalación. La cogeneración de biomasa tiene un crecimiento más potencial que la generación de biomasa sola, debido a que la cogeneración produce tanto calor como electricidad.

15 Los polipéptidos de la invención pueden tener actividad de hidrolasa, por ejemplo actividad de fosfolipasa, de patatina y/u otra actividad enzimática relacionada, para generar un combustible (por ejemplo, un bioalcohol, por ejemplo un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel) a partir de un material orgánico, por ejemplo una biomasa, tal como composiciones derivadas de plantas y animales, incluyendo cualquier cosecha agrícola u otra materia prima renovable, un residuo agrícola o un resto animal, los componentes orgánicos de residuos municipales e industriales, o residuos o restos de construcción o de demolición, o microorganismos tales como algas o levaduras.

20 Los polipéptidos de la invención se usan en procedimientos para convertir cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo una biomasa que comprende lípido o biomasa lignocelulósica, en un combustible (por ejemplo, un bioalcohol, por ejemplo un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel) o de otro modo se usan en procedimientos para hidrolizar o digerir biomateriales de manera que se pueden usar como un combustible (por ejemplo, un bioalcohol, por ejemplo un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel), o para hacer que sea más fácil procesar la biomasa en un combustible.

30 Los biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodiéseles) obtenidos usando los polipéptidos de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o “cócteles”, se pueden usar con oxigenados de combustible para mejorar las características de combustión. La adición de oxígeno da como resultado una combustión más completa, que reduce emisiones de monóxido de carbono. Este es otro beneficio medioambiental de sustituir combustibles del petróleo por biocombustibles (por ejemplo, un combustible de la invención). Un biocombustible obtenido usando las composiciones y/o métodos de esta invención se puede mezclar con gasolina para formar una mezcla E10 (alrededor de 5% a 10% de etanol y alrededor de 90% a 95% de gasolina), pero se puede usar en concentraciones mayores, tal como E85, o en su forma pura. Un biocombustible obtenido usando las composiciones y/o métodos de esta invención se puede mezclar con diésel de petróleo para formar una mezcla B20 (20% de biodiésel y 80% de diésel de petróleo), aunque se pueden usar otros niveles de mezcla hasta B100 (biodiésel puro).

40 La invención también proporciona procedimientos para obtener biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodiéseles) a partir de composiciones que comprenden cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo biomasa que comprende lípidos o biomasa lignocelulósica. El material biomásico se puede obtener a partir de cosechas agrícolas, como un subproducto de la producción de alimentos o de piensos, o como productos de desechos lignocelulósicos, tales como residuos vegetales, papel residual o residuos o restos de construcción y/o de demolición. Los ejemplos de fuentes vegetales o residuos vegetales adecuados para el tratamiento con polipéptidos de la invención incluyen laminarias, algas, granos, semillas, tallos, hojas, vainas, cáscaras, mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, paja, hierbas (por ejemplo, hierba india, tal como *Sorghastrum nutans*; o panizo, por ejemplo la especie *Panicum*, tal como *Panicum virgatum*), y similares, así como madera, virutas de madera, pasta maderera, y serrín. Los ejemplos de residuos papeleros adecuados para el tratamiento con polipéptidos de la invención incluyen papel de fotocopia desechado, papel de impresora de ordenador, papel de agenda, papel de bloc de notas, papel de máquina mecanográfica, y similar, así como periódicos, revistas, cartón, y materiales de envasado a base de papel. Los ejemplos de residuos y restos de construcción y de demolición incluyen madera, detritos madereros, lascas madereras y serrín.

55 En una realización, las enzimas, incluyendo la mezcla de enzimas o “cócteles” de la invención, y los métodos de la invención se pueden usar junto con medios más “tradicionales” para obtener etanol, metanol, propanol, butanol, propanol y/o diésel a partir de biomasa, por ejemplo como los métodos que comprenden hidrolizar lípidos y/o materiales lignocelulósicos secando cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo material biomásico que comprende lípidos o material biomásico lignocelulósico, en un reactor a un catalizador comprendido en una disolución diluida de un ácido fuerte y una sal metálica; esto puede reducir la

energía de activación, o la temperatura, de la hidrólisis de la celulosa para obtener mayores rendimientos de azúcar; véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n^{os} 6.660.506 y 6.423.145.

Otro método ejemplar que incorpora el uso de enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles", comprende hidrolizar cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo biomasa que comprende lípidos o biomasa lignocelulósica que contiene hemicelulosa, celulosa y lignina, o cualquier otro polisacárido que se puede hidrolizar mediante una enzima de esta invención, sometiendo el material a una primera etapa de hidrólisis en un medio acuoso a una temperatura y a una presión escogidas para efectuar la despolimerización principalmente de hemicelulosa sin despolimerización principal de celulosa a glucosa. Esta etapa da como resultado una suspensión en la que la fase acuosa líquida contiene monosacáridos disueltos que resultan de la despolimerización de hemicelulosa, y una fase sólida que contiene celulosa y lignina. Una segunda etapa de hidrólisis puede comprender condiciones de manera que al menos una porción principal de la celulosa se despolimeriza, dando dicha etapa como resultado una fase acuosa líquida que contiene productos de celulosa de la despolimerización disueltos/solubles. Véase, por ejemplo, la patente U.S. n^o 5.536.325. Las enzimas de la invención (incluyendo las mezclas de la invención o "cócteles" de enzimas) se pueden añadir en cualquier etapa de este procedimiento ejemplar.

Otro método ejemplar que incorpora el uso de enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles", comprende procesar cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo biomasa que comprende lípidos o material biomásico lignocelulósico, mediante una o más etapas de hidrólisis con ácido diluido, con un ácido fuerte de alrededor de 0,4% a 2%; y tratar un componente lignocelulósico sólido sin reaccionar del material biomásico hidrolizado con ácido mediante deslignificación alcalina para producir precursores para termoplásticos biodegradables y derivados. Véase, por ejemplo, la patente U.S. n^o 6.409.841. Las enzimas de la invención se pueden añadir en cualquier etapa de este procedimiento ejemplar.

Otro método ejemplar que incorpora el uso de enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles", comprende hidrolizar previamente cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo material biomásico que comprende lípidos o material biomásico lignocelulósico, en un reactor de hidrólisis previa; añadir un líquido ácido al material sólido (por ejemplo, material lignocelulósico) para obtener una mezcla; calentar la mezcla hasta la temperatura de reacción; mantener la temperatura de reacción durante un tiempo suficiente para fraccionar el material lignocelulósico en una porción solubilizada que contiene al menos alrededor de 20% de la lignina procedente del material lignocelulósico, y una fracción sólida que contiene celulosa; eliminar una porción solubilizada de la fracción sólida mientras se está a la temperatura de reacción o próxima a ella, en el que la celulosa en la fracción sólida se hace más susceptible a la digestión enzimática; y recuperar una porción solubilizada. Véase, por ejemplo, la patente U.S. n^o 5.705.369. Las enzimas de la invención se pueden añadir en cualquier etapa de este procedimiento ejemplar.

La presente descripción proporciona métodos para obtener composiciones de combustibles para motores (por ejemplo, para motores de encendido por bujía) basadas en hidrocarburos líquidos mezclados con un alcohol de grado combustible obtenido usando una enzima o un método de la invención. Los combustibles obtenidos mediante uso de una enzima de la invención comprenden, por ejemplo, mezclas de gas líquido de gas de carbón, o líquido de gas natural con etanol. Un codisolvente es 2-metiltetrahidrofurano (MTHF) derivado de la biomasa. Véase, por ejemplo, la patente U.S. n^o 6.712.866.

También se proporcionan métodos para la degradación enzimática de cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, que incluye una biomasa que comprende lípidos o una biomasa lignocelulósica, por ejemplo, para la producción de biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodiéselos) procedente de cualquier material orgánico, y también pueden comprender el uso de tratamiento ultrasónico del material biomásico; véase, por ejemplo, la patente U.S. n^o 6.333.181.

Los métodos de la invención para producir biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodiéselos) a partir de un sustrato celulósico comprenden proporcionar una mezcla de reacción en forma de una suspensión que comprende sustrato celulósico, una enzima de esta invención y un agente de fermentación (por ejemplo, en una vasija de reacción, tal como un biorreactor alimentado con sólidos semicontinuosamente), y la mezcla de reacción se hace reaccionar en condiciones suficientes para iniciar y mantener una reacción de fermentación (como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente U.S. n^o 20060014260). Los cálculos experimentales o teóricos pueden determinar una frecuencia de alimentación óptima. Las cantidades adicionales del sustrato celulósico y de la enzima se proporcionan a la vasija de reacción a un intervalo o intervalos según la frecuencia de alimentación optimizada.

Un procedimiento ejemplar para obtener biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodiéselos) de la invención se describe en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes U.S. n^{os} 20050069998; 20020164730; y comprende etapas de moler cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo biomasa que comprende lípidos o biomasa lignocelulósica (por ejemplo, hasta un tamaño de 15-30 mm), someter el producto obtenido a pretratamiento de explosión de vapor (por ejemplo, a una temperatura de 190-230°C) durante un tiempo entre 1 y 10 minutos en un

reactor; recoger el material pretratado en un ciclón o producto de fabricación relacionado; y separar las fracciones líquidas y sólidas mediante filtración en una prensa de filtro, introduciendo la fracción sólida en un depósito de fermentación y añadiendo una o más enzimas de la invención, por ejemplo una celulasa y/o una enzima beta-glucosidasa (por ejemplo, disuelta en un tampón de citrato pH 4,8).

5 Otro procedimiento ejemplar para obtener biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel) de la invención que comprenden bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol usando enzimas de la invención comprende pretratar un material de partida que comprende cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo una materia prima de biomasa que comprende lípidos o de biomasa lignocelulósica, que comprende al menos hemicelulosa y celulosa. El material de partida puede comprender patatas, haba de soja (colza), cebada, centeno, maíz, avena, trigo, remolacha o caña de azúcar, o un componente o residuo o subproducto de la producción de alimentos o de piensos. El material de partida ("materia prima") se hace reaccionar en condiciones que destruyen la estructura de fibra vegetal para efectuar al menos una hidrólisis parcial de la hemicelulosa y celulosa. Las condiciones destructivas pueden comprender, por ejemplo, someter el material de partida a una temperatura media de 180°C a 270°C a pH 0,5 a 2,5 durante un período de alrededor de 5 segundos a 60 minutos; o una temperatura de 220°C a 270°C, a pH 0,5 a 2,5 durante un período de 5 segundos a 120 segundos, o equivalente. Esto genera una materia prima con una mayor accesibilidad para ser digerida por una enzima, por ejemplo una enzima celulasa de la invención. Patente U.S. n° 6.090.595.

20 Las condiciones ejemplares para usar enzimas de la invención en la hidrólisis de cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo biomasa que comprende lípidos o biomasa lignocelulósica, incluyen reacciones a temperaturas entre alrededor de 30°C y 48°C, y/o un pH entre alrededor de 4,0 y 6,0. Otras condiciones ejemplares incluyen una temperatura entre alrededor de 30°C y 60°C, y un pH entre alrededor de 4,0 y 8,0.

25 En la conversión de biomasa en combustibles, o en la producción de etanol, por ejemplo como se describe en las Solicitudes PCT n°s WO 0043496 y WO 8100857, se pueden usar glucanasas (o celulasas), mananasas, xilanasas, amilasas, xantanasas y/o glucosidasas, por ejemplo, celobiohidrolasas, mananasas y/o beta-glucosidasas. Para producir azúcares fermentables y biomasa que contiene glucanos que se puede convertir en etanol de combustible, se pueden usar glucanasas (o celulasas), mananasas, xilanasas, amilasas, xantanasas y/o glucosidasas, por ejemplo celobiohidrolasas, mananasas y/o beta-glucosidasas de la invención.

30 Biodiésel – usando enzimas de la invención para obtenerlos

La presente descripción proporciona composiciones, incluyendo enzimas de la invención, y métodos, para obtener combustibles de biodiésel, incluyendo cualquier biocombustible, por ejemplo un biodiésel, que comprenden ésteres alquílicos obtenidos a partir de la transesterificación de aceites vegetales y/o grasas animales.

35 Por ejemplo, los polipéptidos de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles", se usan en procedimientos para un procedimiento de transesterificación haciendo reaccionar un alcohol (como etanol, propanol, butanol, propanol, metanol) con un aceite de triglicérido contenido en un aceite vegetal, grasa animal o grasas recicladas, formando ésteres alquílicos de ácidos grasos – incluyendo biodiésel – y glicerina. El biodiésel se puede obtener a partir de aceite de haba de soja o aceites de cocción reciclados. También se pueden usar grasas animales, otros aceites vegetales, y otros aceites reciclados (y se pueden procesar mediante enzimas, por ejemplo fosfolipasas, de la invención) para producir un biodiésel, dependiendo de sus costes y disponibilidad. Para producir un combustible de biodiésel de la invención usando enzimas de la invención, se usan mezclas de todos los tipos de grasas y aceites.

45 Las composiciones de la invención, incluyendo enzimas, y métodos de la invención, se pueden usar para procesar "SVO", o "aceite vegetal puro", incluyendo cualquier aceite vegetal que puede ser usado como combustible en un motor de diésel, por ejemplo, en los que el procesamiento comprende la transesterificación de lípidos en el combustible, por ejemplo, para uso en temperaturas inferiores.

50 Las composiciones de la invención, incluyendo enzimas, y métodos de la invención, se pueden usar para procesar "WVO", o aceite vegetal residual, para obtener, por ejemplo, una grasa amarilla, incluyendo la grasa de restaurantes; la grasa se ha de filtrar para eliminar partículas de alimentos. La grasa amarilla procesada por las composiciones de la invención, incluyendo enzimas, y los métodos de la invención, pueden caer en la categoría de SVO/WVO, incluyendo cualquier grasa, por ejemplo una grasa residual de restaurante, que puede contener sebo de vacuno y otros productos animales.

Procesamiento de residuos desecados de destilería

55 Las enzimas (por ejemplo fosfolipasas) de la invención se pueden usar para tratar/procesar "solubles desecados de destilería (DDS)", "granos desecados de destilería (DDS)", "solubles de destilería condensados (CDS)", "granos húmedos de destilería (DWG)", y "granos desecados de destilería con solubles (DDGS)"; los granos desecados de destilería pueden ser un subproducto de cereal de un procedimiento de destilación, y pueden incluir solubles. Estos procedimientos pueden comprender moler en seco subproductos vegetales, por ejemplo para aplicación de piensos,

5 por ejemplo para aves, bóvidos, ganado porcino y otros animales domésticos. De este modo, las enzimas de la invención se pueden usar para tratar/procesar granos, por ejemplo cereales, que son subproductos de cualquier procedimiento de destilación, incluyendo procedimientos que usan cualquier fuente de grano, por ejemplo las fuentes tradicionales de fabricantes de cerveza, o, como alternativa, de una planta productora de etanol (factoría, molino o similar). Las enzimas de la invención se pueden usar para tratar/procesar malta de destilerías; esta malta se puede usar subsiguientemente para una variedad de fines, por ejemplo como forraje para ganado, especialmente rumiantes; de este modo, la presente descripción proporciona métodos para procesar forraje para ganado tales como rumiantes, y forraje procesado mediante enzimas que comprende fitasas.

10 Las enzimas de esta invención se pueden usar solas o con otras enzimas, para procesar “solubles desecados de destilería (DDS)”, “granos desecados de destilería (DDS)”, “solubles de destilería condensados (CDS)”, “granos húmedos de destilería (DWG)”, y “granos desecados de destilería con solubles (DDGS)”. Por ejemplo, las enzimas de esta invención se pueden usar en cualquier etapa de un procedimiento para producir un producto de alcohol como se ilustra en la Figura 37. Las enzimas de esta invención se pueden usar para incrementar la biodisponibilidad de fósforo en cualquier biocombustible, o biocombustible potencial, incluyendo fósforo encontrado en “solubles desecados de destilería (DDS)”, “granos desecados de destilería (DDS)”, “solubles de destilería condensados (CDS)”, “granos húmedos de destilería (DWG)”, y “granos desecados de destilería con solubles (DDGS)” (véase, por ejemplo, C. Martinez Amezcua, 2004 Poultry Science 83:971-976).

Producción de bebidas alcohólicas o alcohol bebible

20 Las enzimas de esta invención también se pueden usar en el procesamiento de granos desecados de destilería para la producción de alcohol – alcohol como en “bebidas alcohólicas”, por ejemplo para la producción de cerveza o güisqui (además de usarlas en el procesamiento de biomasa para obtener biocombustibles). Las enzimas de esta invención se pueden usar en plantas de etanol, por ejemplo para procesar granos tales como maíz. Los granos desecados de destilería se pueden obtener moliendo en primer lugar un grano (por ejemplo, maíz) hasta una consistencia gruesa, y añadiendo a agua caliente. Tras enfriar, se añade levadura, y la mezcla fermenta durante 25 varios días hasta una semana. Los sólidos que quedan tras la fermentación son los granos de destilería. Se pueden usar fitasas en cualquier etapa de este procedimiento.

Formulaciones

30 La presente descripción proporciona nuevas formulaciones que comprenden enzimas de esta invención, y formulaciones para fosfolipasas de la invención, incluyendo formulaciones que incluyen las nuevas enzimas de la invención. Las enzimas de la invención se pueden usar o formular solas o como mezcla de fosfolipasas de la invención, u otras fosfolipasas, u otras enzimas tales como xilanasas, celulasas, proteasas, lipasas, amilasas, o enzimas redox, tales como lacasas, peroxidases, catalasas, oxidasas, o reductasas. Se pueden usar o formular en una forma sólida, tal como un polvo, una preparación liofilizada, un gránulo, un comprimido, una barra, un cristal, una cápsula, una pastilla, un pelete, o en forma líquida, tal como en una disolución acuosa, un aerosol, un gel, una 35 pasta, una suspensión, una emulsión acuosa/oleosa, una crema, una cápsula, o en una suspensión vesicular o micelar. Las formulaciones de la invención pueden comprender cualquiera o una combinación de los siguientes ingredientes: polioles tales como polietilenglicol, polialcohol vinílico, un glicerol, un azúcar tal como sacarosa, un sorbitol, una trehalosa, una glucosa, una fructosa, una maltosa, una manosa, un agente gelificante tal como goma guar, un carrageenano, un alginato, un dextrano, un derivado celulósico, una pectina, una sal tal como cloruro de sodio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de cinc, sulfato de cinc, una sal de un ácido graso y un derivado de ácido graso, un quelante metálico tal como EDTA, EGTA, citrato de sodio, un agente antimicrobiano tal como un ácido graso o un derivado de ácido graso o un derivado de ácido graso, un parabeno, un sorbato, un benzoato, un compuesto modulador adicional para bloquear el impacto de una enzima tal como una proteasa, proteínas voluminosas tales como BSA, un hidrolizado de trigo, un compuesto de borato, un 40 aminoácido o un péptido, un agente modulador del pH o de la temperatura apropiado, un emulsionante tal como un detergente no iónico y/o iónico, un agente redox tal como cistina/cisteína, una glutatona, una glutatona oxidada, un compuesto reducido o un compuesto antioxidante tal como ácido ascórbico, o un dispersante.

Para mejorar la estabilidad enzimática, también se puede usar la reticulación y modificación de proteínas, tal como pegilación, modificación de ácidos grasos, glucosilación.

50 Las fosfolipasas de la invención se pueden usar juntamente con otras enzimas para decolorar (es decir, eliminar la clorofila) y en detergentes (véase anteriormente), por ejemplo junto con otras enzimas (por ejemplo, lipasas, proteasas, esterases, fosfatasas). Por ejemplo, en cualquier caso en el que se use una PLC, se puede usar una PLD y una fosfatasa en combinación, para producir el mismo resultado que una PLC sola.

La siguiente tabla resume varios procedimientos y formulaciones ejemplares de la invención:

Procedimiento ejemplar de la invención	Propósito
Uso químico en desgomado de aceite mediante PLC	

ES 2 451 266 T3

Sin uso de ácido	Eliminación química
Sin uso de materia cáustica	Eliminación química
Intervalo de uso de ácido y de sustancia cáustica (sin exceso a exceso)	Realización alternativa del procedimiento de reducción química/desgomado
Otros tipos de ácido y materia cáustica	Realizaciones alternativas del procedimiento de desgomado
Impacto de agua en el desgomado de aceite mediante PLC	
Uso de gel de sílice	Sustitución de etapa de lavado con agua
Uso de agente secante de agua	Eliminación de agua en producto final
Impacto de menor contenido de agua durante el tratamiento cáustico	Eliminación de agua en producto final
Contenido mínimo de agua (<5%)	Eliminación de agua en producto final
Contenido máximo de agua (>5%)	Procedimiento alternativo
Perfiles de humedad en el desgomado mediante PLC	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Dependencia del aceite con respecto al contenido de agua para el desgomado mediante PLC	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Eliminación <i>in situ</i> de ácidos grasos libres, FFAs	
Adición de agente quelante de FFA	Realización alternativa del procedimiento de desgomado; mejora las condiciones en el aceite a partir de habas podridas
Impacto del régimen de mezclamiento sobre el desgomado de aceite mediante PLC	
Desgomado mediante PLC con mezclamiento mínimo	Protección de enzima a partir de desnaturalización inducida por mezclamiento, ahorros de energía
Desgomado mediante PLC con mezclamiento con cizallamiento inicial, seguido de mezclamiento con paletas	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Orden de adición de sustancias químicas	
Orden de adición: enzima-agua seguido de ácido y después sustancia cáustica	Permite a la PLC trabajar antes de la exposición a ácido y o a la sustancia cáustica, provocando inactivación potencial de PLC por pH o por quelación con metales
Realizaciones alternativas del procedimiento de desgomado de aceite mediante PLC para temperatura y tiempo	
Etapas de tratamiento enzimático (tiempo): <60 min., preferiblemente <30 min.	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Etapas de tratamiento enzimático (temperatura): 50-70°C, posiblemente <50°C (por ejemplo RT)	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Beneficios del desgomado de aceite mediante PLC	
Producción de materia prima de jabón con un contenido mínimo de PL y enriquecida en ésteres de fosfato solubles en agua	Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Aceite neutro reducido en goma mediante el uso de PLC	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Procedimiento para generar incremento de DAG en aceites vegetales (por ejemplo, 1,3-DAG)	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Beneficios de usar aceites vegetales con mayor contenido de DAG con otros aceites para beneficios de salud	Beneficio de producto ejemplar
Investigar procedimiento de desgomado que no deja actividad de PLC en el aceite	Realización alternativa del procedimiento de desgomado/mejora reguladora
Investigar procedimiento de desgomado que no deja proteína PLC detectable en el aceite	Realización alternativa del procedimiento de desgomado/mejora reguladora
Beneficios del desgomado de aceite mediante PLC	
Uso de una enzima para producir DAG a partir de una masa de goma de lecitina	Beneficio de producto ejemplar
Uso de PLC con aceites de especialidad (enriquecidos con PA, PI)	Beneficio de producto ejemplar
Uso de enzimas específicas de PA/PI (por ejemplo específicas de 596ES2/PI)	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Uso de enzimas específicas de PA/PI (por ejemplo, específicas de 596ES2/PI) + enzimas específicas de PC/PE; impacto de orden de adición	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Procedimiento discontinuo o continuo	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Uso de goma tratada con PLC resuspendida para operaciones adicionales de desgomado de aceite	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Balance másico para DAG, FFA, P, metales, aceite neutro en goma	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Miscelánea	
Adición de PLC a pepitas de oleaginosas en escamas antes de la extrusión	Realización alternativa del procedimiento
Ensayo de desgomado a pequeña escala	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Uso de otras enzimas para reducir la masa de goma (por ejemplo enzima PYROLASE™, clorofilasa, peroxidasa, lipasa, lacasa, manasa, proteasa, lactasa, amilasa, etc., o sus combinaciones)	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Uso de compuesto para facilitar mejor la separación de aceite/goma	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Goma endurecida procedente de aceite tratado con PLC	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Variantes glucosiladas/desglucosiladas de fosfolipasa	Realización alternativa del procedimiento de desgomado
Formulaciones ejemplares de la invención	Fin
Formulación líquida ejemplar para determinar la estabilidad	
Uso de compuestos para incrementar la estabilidad de	Estabilización de la enzima para la producción máxima

PLC a diferentes intervalos de pH y temp. (polioles, sales, metales...)	de DAG, posiblemente para alterar la especificidad del sustrato o dirigir la formación de producto hacia el tipo 1,3-DAG
Uso de un sistema de suministro hidrófobo para PLC (liposomas, enzima hidratada en gotitas de aceite refinado)	Estabilización de la enzima para la producción máxima de DAG, posiblemente para alterar la especificidad del sustrato o dirigir la formación de producto hacia el tipo 1,3-DAG
Formulación sólida para estabilidad	
Uso de diferentes sistemas portadores de PLC, fosfolipasa (resinas de inmovilización, matrices porosas, geles, gránulos, polvos, comprimidos, vesículas/micelas, encapsulados, líquidos estructurados, etc.) para estabilizar fosfolipasa y coenzimas	Estabilización de la enzima o enzimas y facilidad de separación de la enzima a partir del aceite o fase de goma tras el desgomado; reciclabilidad de la preparación enzimática; separación física de la fase enzimática durante el procesamiento del aceite; ataque de PI/PA por PLC
Uso de materiales residuales de desgomado (componentes de goma, vainas de semillas) para la formulación de PLC	Reducción de costes de ingrediente de la formulación, mejor miscibilidad de la enzima con aceite, termoestabilización de la enzima
Formulación y procedimientos ejemplares para incrementar la actividad	
Uso de sustancia química o enzima para ayudar a dispersar mejor la enzima en aceite (por ejemplo, matriz efervescente, etc.)	Tiempo de reacción más rápido/procedimiento de desgomado/reducción de uso de sustancias químicas
Reuso de gomas/enzima para reacciones de desgomado adicionales	Reciclabilidad de la enzima
Uso de formulaciones para potenciar la segregación o captura enzimática de PLs para la hidrólisis	Tiempo de reacción más rápido/procedimiento de desgomado/reducción de uso de sustancias químicas
Uso de múltiples formulaciones para acomodar PLCs con diferentes especificidades por PL	Versatilidad del procedimiento; diferentes enzimas pueden requerir diferentes formulaciones o se pueden añadir en diferentes etapas en el procedimiento
Uso de múltiples formulaciones para prevenir la inactivación de una PLC por un componente en la prep de otra PLC con una especificidad diferente por el sustrato	Protección de las actividades de PLC en una realización de formato multienzimático
Uso de múltiples formulaciones para prevenir la inactivación de una PLC por un componente en la prep de otra enzima (hidrolasa, oxidasa)	Protección de la actividad de PLC en una realización de formato multienzimático
Uso de adiciones intermitentes de sustancia cáustica como en formulación de adición de sustancia cáustica de liberación con el tiempo	Protección de la enzima frente a la desnaturalización inducida por mezclamiento, ahorros de energía

Actividad inactivante y modulante de enzimas mediante glucosilación

5 Esta invención proporciona métodos que comprenden el uso de tecnología recombinante para obtener y expresar enzimas u otras proteínas con actividad biológica, por ejemplo enzimas nocivas o tóxicas, (en los que las enzimas u otras proteínas no están normalmente glucosiladas) en una forma inactiva o menos activa, pero reactivable. El método comprende añadir uno o más sitios de glucosilación (por ejemplo, glucosilación enlazada mediante N o enlazada mediante O) en las enzimas u otras proteínas con actividad biológica (por ejemplo, una enzima de la presente invención) manipulando una secuencia codificante que incorpora el nuevo sitio o sitios de glucosilación; expresando las secuencias codificantes variantes en células eucariotas, o en un sistema manipulado mediante ingeniería o *in vitro* equivalente capaz de una glucosilación post-traducciona. Por ejemplo, la secuencia de 3 aminoácidos NXS/T es el sitio para la glucosilación en células eucariotas, pero las células procariotas no lo hacen. De este modo, la presente descripción comprende añadir al menos una secuencia de 3 aminoácidos NXS/T a la proteína, de manera que su actividad disminuya o se inactiven debido a la glucosilación post-traducciona.

La glucosilación puede dar como resultado 2 moléculas de N-acetil glucosamina (NGLucNac) que se añaden al resto de N. Las adiciones subsiguientes pueden ser específicas del organismo. En la mayoría de las especies, se añaden entonces azúcares de manosa (Mann) sobre la NGLucNac, oscilando el número de restos Mann de 10 a 100. En algunas especies, también se puede añadir ácido siálico. En *Pichia*, después de que se añade NGLucNac, se pueden añadir 10 a 25 restos de Mann.

Estos métodos comprenden usar cualquier enzima desglucosilante o conjunto de enzimas, muchas de las cuales se pueden identificar y/o están comercialmente disponibles. Por ejemplo, la enzima endoglucosidasa H escinde en la última NGLucNac, dejando una NGLucNac todavía unida al resto de N. La enzima PNGasaF separa por escisión todos los azúcares, y convierte la cadena lateral amínica del resto N en un grupo hidroxilo, dando como resultado el hecho de que el aminoácido de N se convierta en el aminoácido aspartato (D) en la enzima. De este modo, los métodos comprenden usar endoglucosidasa H y/o PNGasaF, o enzimas equivalentes, *in vivo* o *in vitro*, para reactivar parcial o completamente las proteínas manipuladas "temporalmente inactivadas".

El método comprende dirigir las enzimas u otros polipéptidos hacia la ruta secretora del hospedante, de manera que las enzimas se glucosilarán. Los nuevos sitios de glucosilación se diseñan de manera que la glucosilación inactiva la enzima o modifica su actividad, por ejemplo disminuye su actividad o modifica de otro modo la actividad, tal como bloquea un sitio de unión al sustrato. Debido a que la enzima es inactiva o menos activa, se podrían expresar enzimas nocivas o tóxicas en mayores cantidades, puesto que los efectos negativos de su actividad ya no son una limitación de cuánta proteína se puede acumular en las células hospedantes. La enzima inactiva, glucosilada, se puede reactivar (parcial o completamente) eliminando los azúcares, por ejemplo usando enzimas desglucosilantes comercialmente disponibles, por ejemplo eliminando los azúcares *in vitro*, o eliminando los azúcares *in vivo* usando enfoques de ingeniería de células completas.

Se añade un sitio diana de glucosilación eucariota, tal como NXS/T, a cualquier proteína, por ejemplo una enzima de la invención. Esto permite al experto en la técnica añadir sitios de glucosilación a una proteína de interés, con la expectativa de convertir esa proteína en una que sea temporalmente inactiva cuando esa proteína está glucosilada al expresar esa proteína en una célula hospedante eucariota y dirigir la proteína hacia la ruta secretora de la célula hospedante.

De este modo, la descripción proporciona métodos para la producción de enzimas que normalmente son demasiado nocivas o tóxicas para ser toleradas en grandes cantidades por una célula hospedante. El efecto puede ser temporal, ya que es posible regenerar la enzima activa (mediante desglucosilación, por ejemplo mediante modificación/desglucosilación traduccional) para el trabajo futuro que requiera una enzima activa.

La descripción proporciona métodos para obtener y expresar una proteína que tiene una actividad biológica cuya actividad está temporalmente inactivada por glucosilación, que comprenden: (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una actividad biológica, en el que la proteína no está naturalmente glucosilada; (b) insertar al menos una secuencia codificante de motivo de glucosilación en el ácido nucleico que codifica la proteína, en el que la forma glucosilada de la proteína está inactiva; (c) insertar una secuencia seleccionadora de diana en la proteína, de manera que se dirija hacia una ruta secretora de la célula hospedante, en el que la célula hospedante es capaz de reconocer el motivo de glucosilación y de glucosilar la proteína; y (d) expresar el ácido nucleico modificado en la célula hospedante. El método comprende además desglucosilar la proteína expresada, reactivando de ese modo la actividad de la proteína, por ejemplo una enzima, tal como una enzima de la invención. La célula hospedante es una célula eucariota. La proteína recombinante expresada inactivada se puede reactivar *in vitro* mediante desglucosilación, ya sea química o enzimática.

La determinación de la colocación de uno o más motivos de glucosilación para inactivar temporalmente una proteína implica solamente métodos habituales para obtener ácidos nucleicos que codifican proteínas variantes, por ejemplo mediante GSSM, y protocolos de cribado habituales, por ejemplo ensayos de actividad o de unión.

Una enzima cuya actividad fue perjudicial para la célula hospedante se hizo inactiva debido a la glucosilación. Debido a que era inactiva, se pudo acumular en niveles mucho mayores en las células hospedantes eucariotas. Debido a que ya no era activa, ya no pudo ser capaz de ejercer sus efectos negativos. La inactivación de la enzima tóxica fue temporal debido a la desglucosilación de la enzima usando EndoH o PNGasa F, que dio como resultado una restauración completa de la actividad normal de la enzima. Se acumuló una gran cantidad de la enzima glucosilada, inactiva, en el medio, sugiriendo que fue bien tolerada por el hospedante como forma inactiva.

La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos:

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: PROGRAMA BLAST USADO PARA EL PERFIL DE IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS

Este ejemplo describe un programa ejemplar de identificación de secuencias para determinar si un ácido nucleico está dentro del alcance de la invención. Se usa un programa BLAST 2.2.2 de NCBI, con opciones por defecto de blastp. Se usaron todos los valores por defecto excepto para el ajuste del filtro por defecto (es decir, todos los parámetros se ajustaron por defecto excepto el filtrado, que se ajustó a OFF); en su lugar se usa un ajuste "-F F",

que inhabilita el filtrado. El uso del filtrado por defecto da a menudo como resultado violaciones de Karlin-Altschul debido a la longitud corta de secuencia. Los valores por defecto usados en este ejemplo:

5 "Filtro para baja complejidad: ON
 > Tamaño de palabra: 3
 > Matriz: Blosum62
 > Costes de salto: Existencia: 11
 > Extensión: 1"

10 Otros ajustes por defecto fueron: filtro para baja complejidad OFF, tamaño de palabra de 3 para proteína, matriz BLOSUM62, penalización de existencia de salto de -11 y penalización de extensión de salto de -1. La opción "-W" se ajustó por defecto a 0. Esto significa que, si no se ajusta, los defectos para el tamaño de palabra es 3 para las proteínas y 11 para nucleótidos. Las lecturas de los parámetros:

```
<<README.bts.txt>>
> argumentos de blastall:
> -p Nombre del programa [String]
> -d Base de datos [String]
> defecto = nr
> -i Archivo de consulta [File In]
> defecto = stdin
> -e Valor de expectativa (E) [Real]
> defecto = 10,0
> -m opciones de vista de alineamiento:
> 0 = por pares,
> 1 = anclado a consulta que muestra identidades,
> 2 = anclado a consulta que no muestra identidades,
> 3 = anclado a consulta plana, muestra identidades,
> 4 = anclado a consulta plana, sin identidades,
> 5 = anclado a consulta, sin identidades y extremos romos,
15 > 6 = anclado a consulta plana, sin identidades y extremos romos,
> 7 = salida XML Blast,
> 8 = tabular,
> 9 tabular con líneas de comentario [Número entero]
> defecto = 0
20 > -o Archivo de salida de informe BLAST [salida de archivo] Opcional
> defecto = stdout
> -F Secuencia de consulta de filtro (DUST con blastn, SEG con otros) [String]
> defecto = T
25 > -G Coste para abrir un salto (cero invoca comportamiento por defecto) [Numero entero]
> defecto = 0
> -E Coste para extender un salto (cero invoca comportamiento por defecto) [Numero entero]
> defecto = 0
> -X X Valor de caída para alineamiento con saltos (en bits) (cero invoca comportamiento por defecto)
30 [Numero entero]
> defecto = 0
> -I Muestra GI's en deflines [T/F]
> defecto = F
> -q Penalización para un desemparejamiento nucleotídico (sólo blastn) [Número entero]
> defecto = -3
35 > -r Premio para un emparejamiento nucleotídico (sólo blastn) [Número entero]
> defecto = 1
> -v Número de secuencias de bases de datos para mostrar descripciones de una línea para (V) [Número
entero]
> defecto = 500
40 > -b Número de secuencias de bases de datos para mostrar alineamientos para (B) [Número entero]
> defecto = 250
```

> -f Umbral para extender resultados, defecto si cero [Número entero]
 > defecto = 0
 > -g Llevar a cabo alineamiento con saltos (no disponible con tblastx) [T/F]
 > defecto = T
 5 > -Q Código genético de búsqueda a usar [Número entero]
 > defecto = 1
 > -D Código genético DB (para tblast[nx] sólo) [Número entero]
 > defecto = 1
 10 > -a Número de procesadores a usar [Número entero]
 > defecto = 1
 > -O Archivo SeqAlign [Salida de archivo] Opcional
 > -J Cree la búsqueda defline [T/F]
 > defecto = F
 15 > -M Matriz [String]
 > defecto = BLOSUM62
 > -W Tamaño de palabra, defecto si es cero [Número entero]
 > defecto = 0
 > -z Longitud efectiva de la base de datos (úsease cero para el tamaño real) [String]
 > defecto = 0
 20 > -K Número de mejores resultados de una región a mantener (defecto off by, si se usa se recomienda un
 valor de 100) [Número entero]
 > defecto = 0
 > -P 0 para múltiples resultados 1-pasada, 1 para un solo resultado 1-pasada, 2 para 2-pasada
 > [Número entero]
 25 > defecto = 0
 > -Y Longitud efectiva del espacio de búsqueda (úsease cero para el tamaño real)
 > [Real]
 > defecto = 0
 > -S Hebras de consulta para buscar frente a base de datos (para blast[nx], y tblastx). 3 es ambos, 1 es parte
 30 superior, 2 es parte inferior [Número entero]
 > defecto = 3
 > -T Produce salida HTML [T/F]
 > defecto = F
 > -1 Búsqueda restringida de base de datos para listar GI's [String] Opcional
 35 > -U Usar filtrado de letra minúscula de secuencia FASTA [T/F] Opcional
 > defecto = F
 > -y Caída (X) para extensiones blast en bits (0.0 invoca comportamiento por defecto) [Real]
 > defecto = 0.0
 > -Z Valor de caída X para alineamiento con saltos final (en bits) [Número entero]
 40 > defecto = 0
 > -R archivo de punto de comprobación PSI-TBLASTN [File In] Opcional
 > -n búsqueda MegaBlast [T/F]
 > defecto = F
 > -L Localización en la secuencia de consulta [String] Opcional
 45 > -A Tamaño de ventana de múltiples resultados (cero para algoritmo de un solo resultado) [Número entero]
 > defecto = 40

EJEMPLO 2: SIMULACIÓN DE DESGOMADO MEDIADO POR PLC

Este ejemplo describe la simulación de desgomado mediado por fosfolipasa C (PLC).

Debido a su mala solubilidad en agua, originalmente se disolvió fosfatidilcolina (PC) en etanol (100 mg/ml). Para el
 50 ensayo inicial, se preparó una disolución madre de PC en 50 mM de ácido 3-morfolinopropanosulfónico o 60 mM de
 ácido cítrico/NaOH a pH 6. La disolución madre de PC (10 µl, 1 µg/µl) se añadió a 500 µl de aceite de haba de soja
 refinado (2% de agua) en un tubo Eppendorf. Para generar una emulsión, el contenido del tubo se mezcló durante 3
 minutos mediante remolino (véase Fig. 5A). La fase oleosa y la fase acuosa se separaron mediante centrifugación
 55 durante 1 minuto a 13.000 rpm (Fig. 5B). Los tubos de reacción se preincubaron a la temperatura deseada (37°C,
 50°C, o 60°C), y se añadieron 3 µl de PLC procedente de *Bacillus cereus* (0,9 U/µl) a la fase acuosa (Fig. 5C). La
 desaparición de PC se analizó mediante TLC usando cloroformo/metanol/agua (65:25:4) como un sistema disolvente
 (véase, por ejemplo, Taguchi (1975) más arriba), y se visualizó tras la exposición a vapor de I₂.

La Figura 5 ilustra esquemáticamente un sistema modelo de dos fases para la simulación del desgomado mediado
 por PLC. Fig. 5A: Generación de emulsión mezclando aceite bruto con 2% de agua para hidratar los fosfáticos
 60 contaminantes (P). Fig. 5B: Las fases oleosa y acuosa se separaron después de la centrifugación, y se añadió PLC
 a la fase acuosa, que contiene los fosfátidos precipitados ("gomas"). La hidrólisis de PLC tiene lugar en la fase
 acuosa. Fig. 5C: El transcurso de tiempo de la reacción se monitoriza extrayendo alícuotas de la fase acuosa y

analizándolas mediante TLC.

EJEMPLO 3: EXPRESIÓN DE FOSFOLIPASAS

Este ejemplo describe la construcción de una cepa de producción comercial de la invención que puede expresar múltiples fosfolipasas (incluyendo enzimas de la invención). A fin de producir una formulación multienzimática adecuada para uso en el desgomado de aceite vegetales de grado alimentario (incluyendo haba de soja, cáñola, y girasol), se puede generar una cepa de expresión recombinante que exprese dos secuencias de fosfolipasa diferentes en el mismo hospedante de expresión. Por ejemplo, esta cepa se puede construir para que contenga una o más copias de un gen de PLC y una o más copias de un gen de fosfatidilinositol-PLC. Estos genes pueden existir en un plásmido, múltiples plásmidos, o los genes se pueden insertar en el genoma del hospedante de expresión mediante recombinación homóloga. Cuando los genes se introducen mediante recombinación homóloga, los genes se pueden introducir en un único sitio en el genoma hospedante como un casete de expresión de ADN que contiene una o más copias de ambos genes. Como alternativa, una o más copias de cada gen se pueden introducir en sitios diferentes en el cromosoma hospedante. La expresión de estas dos secuencias génicas podía estar conducida por un tipo de promotor, o cada secuencia génica puede ser conducida por un promotor independiente. Dependiendo del número de copias de cada gen y del tipo de promotor, la cepa final expresará relaciones variables de cada tipo de enzima activa. Las cepas de expresión se pueden construir usando cualquier *Bacillus* (por ejemplo, *B. cereus*) o *Streptomyces*, *E. coli*, *S. pombe*, *P. pastoris*, u otros sistemas de expresión de gramnegativas, grampositivas, o de levaduras.

La descripción proporciona un sistema de dos enzimas para desgomar aceite de haba de soja, en el que al menos una enzima es una enzima de la invención. PLC más PI-PLC produce más DAG que cualquiera de las dos enzimas solas. Sin embargo, ambas enzimas producen más DAG que una muestra de control sin enzima. Las condiciones de reacción comprenden 1 mililitro de aceite de haba de soja, ~0,4% de humedad inicial en el aceite antes de cualquier adición, 50°C, ácido cítrico al 0,2% neutralizado con NaOH 2,75M, 10 U de PLC, 15 µl de PI-PLC (0,45 mg de proteína total), tiempo de reacción total 1 hora. La Figura 12 ilustra una tabla que resume datos de este sistema de desgomado bienzimático.

Una enzima PI-PLC se puede usar en las mismas condiciones descritas para PLC. Éstas incluyen el refinado químico de aceites vegetales y el desgomado con agua de aceites vegetales.

EJEMPLO 4: FOSFOLIPASAS CON EXPRESIÓN MEJORADA Y RESISTENCIA ALTERADA A PROTEASAS

La descripción proporciona un método para seleccionar variantes de fosfolipasa C (mutantes) que tienen expresión mejorada en un hospedante glucosilante y resistencia alterada a proteasas segregadas.

Expresión mejorada en un hospedante glucosilante

Se eliminaron los sitios de glucosilación potenciales enlazados a asparaginas con la secuencia de consenso de aminoácidos, asparagina-cualquier aminoácido-serina o treonina (NXS/T, en el código de aminoácidos de una letra), usando métodos de mutagénesis, para cambiar las asparaginas o la serina o la treonina en el motivo de reconocimiento de glucosilación por un aminoácido diferente, de manera que la secuencia ya no codifica un sitio de glucosilación potencial. La eliminación de los sitios de glucosilación se vio afectada como se indica más abajo: posiciones de aminoácidos: aminoácido 63, aminoácido 131, y aminoácido 134, de la enzima fosfolipasa C de la invención que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO:175, codificada por SEQ ID NO:178. Esta eliminación de los sitios de glucosilación mejoró la expresión de esta enzima fosfolipasa C activa variante cuando la proteína se expresó heterológamente en la levadura *Pichia pastoris*. Esta estrategia de reducir o eliminar sitios de glucosilación potenciales en la enzima PLC pueden mejorar la expresión de PLC activa en cualquier hospedante glucosilante. De este modo, la invención proporciona enzimas de fosfolipasa (y los ácidos nucleicos que las codifican) que tienen una secuencia de cualquiera de las fosfolipasas ejemplares de la invención con uno o más o todos los sitios de glucosilación alterados, como se describe anteriormente. De este modo, la descripción proporciona métodos para obtener secuencias codificantes de fosfolipasas variantes que tienen una mayor expresión en una célula hospedante, en el que el método comprende modificar una secuencia codificante de fosfolipasa de manera que uno, varios o todos los motivos codificantes del sitio de glucosilación enlazado mediante N se modifiquen a un motivo no glucosilado. La invención también proporciona una secuencia codificante de fosfolipasa obtenida mediante este procedimiento, y las enzimas que codifican.

Resistencia alterada a proteasa

La invención proporciona métodos para obtener una secuencia codificante de fosfolipasa variante que codifica una fosfolipasa que tiene mayor resistencia a una proteasa, que comprenden modificar un aminoácido equivalente a la posición 131 de SEQ ID NO:175, por uno, varios o todos los siguientes restos: lisina (K); serina (S); glicina (G); arginina (R); glutamina (Q); alanina (A); isoleucina (I); histidina (H); fenilalanina (F); treonina (T); metionina (M); leucina (L). La invención también proporciona fosfolipasas aisladas, sintéticas o recombinantes, codificadas por una secuencia obtenida mediante este método. La descripción también proporciona métodos para obtener una secuencia codificante de fosfolipasa variante que codifica una fosfolipasa que tiene menor resistencia a una proteasa, que comprenden modificar un aminoácido equivalente a la posición 131 de SEQ ID NO:175, por uno,

varios o todos los siguientes restos: triptófano (W); glutamato (E); tirosina (Y). La descripción también proporciona fosfolipasas aisladas, sintéticas o recombinantes, codificadas por una secuencia obtenida mediante este método.

- 5 El sobrenadante que contiene una mezcla de proteasas de *Pichia pastoris* segregadas nativas se mezcla e incuba con preparaciones enzimáticas de PLC de tipo salvaje y mutante. Las reacciones se paralizan, y la degradación se visualiza mediante SDS-PAGE frente al control negativo sin proteasa. La degradación también se puede determinar midiendo la actividad de PLC residual. La novedad deriva de la observación de que ciertas mutaciones para eliminar la glucosilación cambian significativamente la susceptibilidad de la fosfolipasa expresada a la degradación durante la fermentación. Una ventaja del método es la selección directa de mutantes con mayor o menor resistencia a las proteasas segregadas por el organismo hospedante durante la producción.
- 10 Este procedimiento de la invención puede emplear mutagénesis dirigida al sitio (por ejemplo, GSSM) para cambiar la secuencia de aminoácidos de una enzima de fosfolipasa C de la invención, por ejemplo como se muestra más abajo – una subsecuencia enzimáticamente activa de SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:175). Cada uno de los aminoácidos en **negrita y subrayado** (más abajo) se cambiaron de asparagina (N en código de una sola letra) a aspartato (D), serina (S), u otro aminoácido como se describe más abajo. Estos aminoácidos se designan como aminoácido 63, aminoácido 131, y aminoácido 134 de la secuencia más abajo, en la que triptófano (W) se designa aminoácido 1. Estas mutaciones se realizan para incrementar la expresión de la proteína fosfolipasa C activa al reducir la glucosilación de la proteína expresada en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*. Estas mismas mutaciones pueden incrementar la expresión de cualquier fosfolipasa C activa de la invención en cualquier otro sistema de expresión que glucosile asparaginas (glucosilación enlazada mediante N) según el sistema NXS/T en el que N es asparagina, X es cualquier aminoácido, y S/T es serina o treonina. De este modo, la descripción también proporciona un procedimiento para cambiar la susceptibilidad de la fosfolipasa C expresada cambiando el aminoácido de la posición 131.

- 20 Los aminoácidos 1-37 de SEQ ID NO:2 es una secuencia líder que se elimina durante la expresión en *Pichia*, o mediante proteasas cuando se expresa en *E. coli*. Los aminoácidos 38-286 de SEQ ID NO:2, que incorporan las tres modificaciones (N63D, N131S, N134D), es SEQ ID NO:175:

25 NOTA: Para contar las posiciones cambiadas, cuéntese el primer aminoácido (W) como la posición 1.

WSAEDKHNEGINSHLWIVNRAIDIMSRNTTIVNPNETALLNEWRADLENGIYS
 ADYENPYYDDSTYASHFYDPDTGTTYIPFAKHAKETGAKYFNLAGQAYQNQ
 DMQQAFFYLGSLHYLGDVNQPMHAASFTDLSYPMGFHFSKYENFVDTIKNN
 YIVSDSNGYWNWKGANPEDWIEGA AVAAKQDYPGVVNDTTKDW FVKA AV
 SQEYADKWRAE VTPVTGKRLMEAQRVTAGYIHLWFD TYVNR-

Las variantes de fosfolipasa C expresadas se incubaron en presencia de proteasas de *P. pastoris* como se describe más abajo, y se obtuvieron los siguientes resultados.

- 30 Los siguientes aminoácidos en la posición 131 de aminoácidos de SEQ ID NO:2 aumentaron la resistencia de la fosfolipasa C expresada a la degradación por proteasas de *P. pastoris*: lisina (K); serina (S); glicina (G); arginina (R); glutamina (Q); alanina (A); isoleucina (I); histidina (H); fenilalanina (F); treonina (T); metionina (M); Leucina (L). Los siguientes aminoácidos en la posición 131 de aminoácidos de SEQ ID NO:2 disminuyeron la resistencia de la fosfolipasa C expresada a la degradación por proteasas de *P. pastoris*: triptófano (W); glutamato (E); tirosina (Y). De este modo, la invención proporciona fosfolipasas variantes que tienen una cualquiera de, o varias o todas estas modificaciones, dependiendo de si se deseó aumentar o disminuir la resistencia de la fosfolipasa C expresada a la degradación por proteasa. La descripción proporciona fosfolipasas variantes que tienen una cualquiera de, o varias o todas estas modificaciones en posiciones equivalentes a la posición 131 de SEQ ID NO:2. El hecho de qué resto es equivalente a la posición 131 de SEQ ID NO:2, y de si cualquier modificación de resto de aminoácidos particular puede aumentar o disminuir la resistencia de la enzima a la degradación por una proteasa, se puede averiguar habitual y predeciblemente mediante protocolos bien conocidos en la técnica, por ejemplo el ensayo ejemplar usado par evaluar la susceptibilidad de la fosfolipasa C (SEQ ID NO:2, codificada por SEQ ID NO:1) a proteasa, descrito más abajo:

Tampones:

- 45
 - MES 1,0M, pH 6,2
 - acetato de sodio ("NaAc") 0,7M, pH 5,2

Exposición:

- Úsense tubos de microcentrifugadora de 1,5 ml distintos
 - A 25 μ l de muestra de enzima PLC añádanse 5 μ l de NaAc o 7 μ l de tampón MES, y mézclese
 - Añádanse 25 μ l de sobrenadante de *Pichia pastoris* que contiene proteasa, y mézclese
 - Añádanse 2 μ l de azida sódica al 5%, y mézclese
- 5
- Colóquense los tubos en una rejilla portatubos flotante en un vaso de precipitados de agua previamente calentado, en una incubadora humidificada
 - Los controles incluyen PLC + tampón + dH₂O y *Pichia* SN + tampón + dH₂O
 - Incúbese durante 0-24 horas, muestreando a múltiples puntos de tiempo si se desea

Detección:

- 10
- Visualícese en SDS-PAGE mezclando muestras 1:2 con tampón de muestras que contiene 5 mM de EDTA, caliéntese hasta 100°C, 4 minutos, enfríese, centrifúguese, mézclese, cárguense 5 μ l de muestra por línea, tíñase con Coomassie.
 - Las muestras y los puntos de tiempo también se pueden tomar directamente para el ensayo de actividad de PLC estándar.
- 15
- Resultados: Se hicieron correr los geles de SDS-PAGE, y los resultados se ilustran en la Figura 17, la cual muestra los resultados de los experimentos de digestión *in vitro*, en los que las variantes de fosfolipasa C se incubaron en extractos de proteasa bruta durante un tiempo de hasta 22 h a 37°C. Cada mutante de PLC se nombró según el aminoácido encontrado en la posición "X" de la secuencia "DXD" (aspartato en la posición de aminoácidos 63-cualquier aminoácido en la posición de aminoácidos 131-aspartato en la posición de aminoácidos 134). Los geles
- 20
- muestran la estabilidad o sensibilidad de la proteína mutante de PLC expresada tras la incubación con proteasa bruta. Un mutante estable muestra una banda de PLC de intensidad de tinción similar en el "-" (control sin reacción de proteasa) y el "+" (la reacción contiene proteasa). Un mutante más sensible a proteasa mostrará una reducción en la intensidad de tinción de la banda de proteína PLC en la línea "=" en comparación con la línea "-".

EJEMPLO 5: PROCEDIMIENTO PARA LA EXPRESIÓN DE NIVEL ELEVADO ESTABLE DE PLC

- 25
- La descripción proporciona un procedimiento de fermentación para la expresión estable, de nivel elevado, y la actividad específica elevada de enzimas de fosfolipasa, por ejemplo PLC, en cultivos de levadura, por ejemplo cultivos de *Pichia pastoris*. Las enzimas producidas mediante este método se pueden usar, por ejemplo, en el refinamiento de aceite vegetal, tal como aceite de haba de soja, de cáñola, de girasol o de otros aceites.

- 30
- La descripción también proporciona un procedimiento de producción que comprende características que permiten la producción de fosfolipasa activa, por ejemplo PLC, en un cultivo de célula de levadura, por ejemplo *Pichia pastoris*, como cultivos discontinuos alimentados, a una escala de g/l. La expresión heteróloga de la proteína PLC activa en cultivos microbianos se ha descrito ocasionalmente en la bibliografía sólo a escala de mg/l. El procedimiento de la presente descripción se basa, entre otros, en el hallazgo de que la expresión de la proteína PLC en cultivos de
- 35
- Pichia* altera la capacidad de captación de MeOH, pero ninguna otra característica de crecimiento fisiológico estudiada. Contrariamente a la expresión de proteínas heterólogas convencional en cultivos de *Pichia*, se necesitan tasas de coalimentación elevadas (glucosa/o glicerol). Además de mejorar las características de producción enzimática, una mayor coalimentación elimina también la expresión de la actividad de proteasa general, que está correlacionada con la degradación de PLC. Además, se pueden resolver las malas características de utilización de MeOH, mejorando adicionalmente de ese modo las características de producción, al producir PLC en cepas de
- 40
- Pichia* con un fenotipo Mut⁺ sin comprometer los retos de escalabilidad normalmente asociados con un fenotipo Mut⁺ (y por lo tanto no usados a escala industrial). De este modo, este procedimiento mejora la producción de PLC activa en >50 veces (desde 100 U/ml usando métodos convencionales hasta >5000 U/ml de caldo completo; >5 g/l de proteína) en comparación con las condiciones que normalmente se aplican en sistemas de *Pichia* de escala industrial. Además, debido a que PLC es una metaloenzima que requiere la unión de cinc para el plegamiento y actividad apropiados, la descripción comprende una suplementación de cinc. Esta estrategia de suplementación de cinc para los cultivos de la invención hace a la actividad de PLC casi completamente estable (< 5% de pérdida de actividad) como un caldo completo, por ejemplo a 4°C durante > 5 días. Esto ayuda significativamente al procedimiento de recuperación, puesto que 1) la producción de la actividad proteica inestable continúa empeorando durante el procedimiento de recuperación, y 2) permite una mayor flexibilidad de procesamiento, especialmente a
- 50
- gran escala.

Ensayo de microplaca de triptofanil aminopeptidasa

La descripción proporciona un ensayo de microplaca de triptofanil aminopeptidasa, que se desarrolló para la determinación de las actividades relativas de triptofanil aminopeptidasa en muestras de punto de tiempo de

ES 2 451 266 T3

fermentación de *Pichia*. La capacidad de producción de este ensayo es suficiente para el muestreo de múltiples puntos de tiempo de numerosas fermentaciones.

Materiales y métodos

Tampón:

- 5 ○ 15 mM de NaPO₄, 2 mM de MnCl₂, pH 7,5, ac.

Sustrato:

- HTrp-AMC (Bachem, I1670)

Disolución de sustrato:

- Disuélvase el sustrato hasta 10 mM en metanol
- 10 ○ Añádase 100 µl de sustrato 10 mM a 6 ml de tampón

Muestras:

- Puntos de tiempo de fermentación de *Pichia*
- Centrifúguese para eliminar células

Preparación de microplacas:

- 15 ○ Tómense partes alícuotas de 90 µl de disolución de sustrato por pocillo de 96 pocillos negros para cada réplica de muestra, blancos y referencias
- Colóquese la microplaca en una etapa de lector de microplacas fluorescente (por ejemplo SpectraMax, Molecular Dynamics)

Adición de las muestras y cinética de la reacción:

- 20 ○ Ajustese el lector de microplacas fluorescente:
 - Ej. 350 nm/Em. 460 nm; corte automático (455 nm); PMT medio; 3 lecturas por pocillo; autocalibrar "on"
 - RT
 - Transcurso de tiempo 0-30 minutos; léase cada 30 segundos
- 25 ○ Enciéndase la función de mezclado de la placa del instrumento para mezclar durante 5 segundos antes de la primera lectura
- Tómense partes alícuotas de muestras en un formato de 96 pocillos, y úsese una pipeta de múltiples canales para transferir las muestras a 10 µl por pocillo
- Sin la tapa, sustitúyase la microplaca en el lector de microplacas
- Comiencese a leer

- 30 Dependiendo de la actividad inherente de muestras desconocidas, puede ser deseable variar la dilución de la muestra, la duración del ensayo y el muestreo cinético, todas variables que se pueden determinar mediante cribado normal.

Se ha demostrado que el sustrato es muy estable en estas condiciones, y un blanco de control negativo no debería mostrar incremento en la absorbancia a lo largo del tiempo.

- 35 Ensayo de microplaca de Bodipy BSA proteasa

La descripción proporciona un ensayo de microplacas de Bodipy BSA proteasa para ayudar a la determinación de la actividad de proteasa general en muestras de puntos de tiempo de fermentación de *Pichia*. La capacidad de producción de este ensayo es suficiente para muestrear múltiples puntos de tiempo de numerosas fermentaciones.

Materiales y métodos

- 40 Sustrato:

- DQ BSA green (Molecular Probes, D 12050)

ES 2 451 266 T3

Disolución de sustrato:

- Disuélvanse los contenidos de un vial de sustrato (1 mg) en 1 ml de agua que contiene azida sódica al 0,1%

Muestras:

- 5 ○ Puntos de tiempo de fermentación de *Pichia*
- Centrifúguese para eliminar células.

Control positivo:

- 0,2 mg/ml de subtilisina (Sigma, P5380) en 50 mM de NaPO₄, pH 7,5
- Dilúyase en serie en agua

10 Preparación de la microplaca:

- Tómense partes alícuotas de 90 µl de disolución de sustrato por pocillo de 96 pocillos negros para cada réplica de muestra, blancos y referencias

Adición de muestra y reacción:

- 15 ○ Tómense partes alícuotas de muestras en un formato de 96 pocillos y úsese una pipeta de múltiples canales para transferir muestras a 10 µl por pocillo
- Vuélvase a colocar la cubierta de la microplaca, envuélvase con papel metálico y colóquese en una incubadora humidificada a 37°C, y déjese incubar 3-4 horas o toda la noche.

Medida de la fluorescencia:

- Ajustese el lector de microplacas fluorescente (SpectraMax):
- 20 ○ Ej. 495 nm/Em. 525 nm; corte automático (515 nm); PMT bajo; 3 lecturas por pocillo; autocalibrar "on"
- RT

Se seleccionó bodipy BSA como sustrato de proteasa general. La falta de hidrólisis de bodipy BSA no indica la ausencia de proteasa o proteasas, pero se ha demostrado que se correlaciona con la hidrólisis de la enzima PLC y la pérdida de actividad de PLC. Se ha demostrado que BSA se puede sustituir por bodipy ovoalbúmina o caseína.

- 25 Es útil caracterizar la actividad de proteasa a lo largo del transcurso de tiempo de fermentación, puesto que la actividad puede ser temporal y transitoria.

Se ha demostrado que el sustrato es muy estable en estas condiciones, y un blanco de control negativo no debería mostrar incremento en la absorbancia con el tiempo.

Medida de la actividad de PLC en caldo o sobrenadante de cultivo completo:

- 30 La descripción proporciona un ensayo de la medida de actividad de PLC en caldo o sobrenadante de cultivo completo; esto es una modificación de un método descrito, por ejemplo, por Edward A. Dennis (1973) Kinetic dependence of phospholipase A2 activity on the detergent Triton X-100. J. Lipid Res. 14:152-159, USP 24/NF 19, Pancrealipase-Assay for lipase activity. Página 1256-1257. El ensayo de la medida de actividad de PLC comprende:

Disoluciones:

- 35 Disolución de sulfato de cinc 100 mM
- Disolución de cloruro de calcio 100 mM
- Disolución de sustrato (20 mM de fosfatidilcolina, 40 mM de Triton X-100, 5 mM de cloruro de calcio)
- Tampón de dilución (0,1% de Triton X-100, sulfato de cinc 1 mM, goma arábiga al 1%)

Procedimiento de ensayo:

- 40 - Prepárense las diluciones de las muestras a ensayar usando el tampón de dilución (goma arábiga al 1,0%, Triton X-100 al 1,0%, sulfato de cinc 1 mM). Prepárense las diluciones inmediatamente antes del ensayo, usando tampón enfriado con hielo, y almacénense en un baño de hielo hasta que se usen.

- 5 - Transfíranse 20 ml de la disolución de sustrato a una vasija de vidrio encamisada de alrededor de 50 ml de capacidad, cuya cámara exterior está conectada a un baño de agua controlado termostáticamente. Cúbrase la mezcla, y agítese continuamente con un dispositivo de agitación mecánica. Con la mezcla mantenida a una temperatura de $37 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$, valórese previamente el sustrato con KOH VS 0,01 N, a partir de una microbureta insertada a través de una abertura en la cubierta, para ajustar el pH a 7,3. Añádanse 50 μl de dilución enzimática, y después continúese añadiendo automáticamente KOH VS 0,01 N durante 6 minutos para mantener el pH a 7.

10 Además, electroforesis en gel de PAGE estándar, análisis de transferencia Western y Northern en cultivos de fermentadores, así como técnicas de análisis estándar para parámetros de fermentación en línea/fuera de línea (niveles de biomasa, análisis de gases, etc.).

Generación de la cepa de *Pichia* de fenotipo Mut⁺

15 La descripción proporciona células, sistemas celulares y métodos para expresar fosfolipasa C que comprenden usar una cepa de *Pichia* con un fenotipo Mut⁺. El método comprende insertar un ácido nucleico que codifica PLC heterólogo en la cepa de *Pichia*. La célula se cultiva entonces en condiciones mediante las cuales se expresa la PLC. El método puede comprender además suplementar las condiciones de cultivo con cinc.

Estos métodos, células y sistemas celulares usan SEQ ID NO:2, que es una metaloenzima que requiere cinc. Se usan 3 moles/mol. Tuvo un MW de aproximadamente 28 kDa y un pI de aproximadamente 5,2, y tiene una tolerancia ancha del sustrato: PC > PE > PS >> PI. La enzima sin procesar tuvo una secuencia señal de 24 aminoácidos, una prosequencia de 13 aminoácidos, y una enzima "madura" de 245 restos de aminoácidos.

20 Las cepas de *Pichia Mut*⁺ tienen dos copias de genes de alcohol oxidasa (AOX), AOX1 y AOX2, afectadas durante la transformación ("Mut" representa "Utilización de Metanol"), según lo siguiente:

- Mut⁺
 - Suceso de cruzamiento individual, genes AOX1 y AOX2 intactos
 - Crecimiento y expresión en metanol solo. Posible coalimentación
- 25 • Mut^s
 - Suceso de cruzamiento doble interrumpe el gen AOX1
 - Crecimiento y expresión mejorada con coalimentación
- Mut⁻
 - Suceso de recombinación interrumpe los genes AOX1 y 2
- 30 • No se puede metabolizar metanol, requiere coalimentación

En resumen: Mut⁻ < Mut^s_{plc} < Mut^s/Mut⁺_{plc} < Mut⁺

Hubo diferencias de fermentación entre Mut⁺ y Mut^s, incluyendo:

- Concentración de inducción óptima de metanol
- Velocidad de consumo de oxígeno
- 35 • Mut⁺ crece más deprisa que Mut^s en metanol debido a la capacidad de captación más rápida
- Facilidad de período de transición tras la inducción
- Mut⁺ no se usa para la expresión a gran escala
 - Capacidad de aireación/enfriamiento, sensibilidad a MeOH

40 La ruta de utilización de metanol en *Pichia pastoris* es bien conocida en la técnica. La alcohol oxidasa (AOX) cataliza la conversión de metanol en formaldehído; de este modo, si AOX está sobreexpresada, da como resultado una célula de levadura "avinagrada".

Un protocolo de fermentación ejemplar para *Pichia pastoris* usado comprende:

- Cultivo de semillas (matraz o tanque)
 - Fermentación discontinua en medio rico para potenciar la biomasa

- Cultivo de fermentador alimentado discontinuo
 - Fase discontinua (glicerol)
 - Crecimiento de biomasa a medida que se consume la fuente de carbono.
 - Fase de alimentación de glucosa o glicerol
 - Adición de alimentación disparada por contenido de D.O. o alimentación lineal/exponencial
 - Crecimiento hasta suficiente biomasa para la inducción y expresión (ausencia de etanol, limitado C)
- 5
- Inducción de metanol
 - Adición de alimentación regulada (% de D.O., sensor de MeOH, RQ) o perfiles de alimentación preestablecidos
 - Coalimentación con glucosa o glicerol dependiente de parámetros de fenotipo y expresión
 - Inducción de Mut⁺ a 1-3 g/l de MeOH
 - Inducción de Mut^s a 4-7 g/l de MeOH
- 10

La Figura 18 ilustra los resultados de un cultivo de fermentador discontinuo, como se discute anteriormente, usando solamente glicerol. La actividad de proteasa es de una proteasa endógena en *Pichia*. La fermentación discontinua puede ser medio rico para potenciar la biomasa. Como se señala en la Fig. 18, el incremento progresivo en la actividad de proteasa, comenzando a alrededor de 69 horas, corresponde a una disminución progresiva en la actividad de PLC. Una mayor velocidad de coalimentación de glicerol (glyc) mejora la expresión de PLC activa y disminuye (elimina) la producción de proteasa, como ilustra la siguiente tabla resumen de datos:

Velocidad de coalimentación (ml/min)	Fuente de C antes/después de inducción	OD de la inducción	Actividad de PLCMeOH consumido (U/ml sup)	Bodipy proteasa (I)	OD final	
0,5	Glic/Glic		100	1	Sí	450
1,5	Glic/Glic		1100	1,7	No	680
2	Glic/Glic	250-300	1550	1,3	No	860
2,5	Glic/Glic		1550	1,4	No	900
3	Glic/Glic		1715	1,4	No	820
1,5	Gluc/Gluc	250-300	180	0,5	No	520
1,5	Glyc/Gluc		616	1,3	No	730
3	Glic/Glic	100	949-1529	0,8-1,4	No	998
2,5	Glic/Glic		229-729	0,4	No	963

Estos estudios se realizaron en fermentadores BB de 30 l con DSD-PLC. Se midió la OUR, o Velocidad de Captación de Oxígeno ("OUR") en volumen, como un indicador de la "salud general del cultivo" o como "biomarcador" para la buena expresión. La Figura 19 ilustra los resultados de tal estudio, una comparación del perfil de OUR de cultivos de *P. pastoris* MutS 30 L que producen DSD-PLC, usando 1700 U/ml, 1100 U/ml y 100 U/ml de PLC, 30°C, coalimentación de glicerol, como se discute anteriormente.

La Figura 20 ilustra una comparación del perfil de consumo de metanol en cultivos de *P. pastoris* MutS 30 L que producen DSD-PLC, pH 6,2 (1100 U/ml y 100 U/ml de PLC), o una proteína heteróloga, con una coalimentación de glicerol, como se discute anteriormente. Esto fue una alimentación de MeOH llevada a cabo según demanda, y el nivel de MeOH residual se controló a 4 g/l.

Además, el fenotipo Mut⁺ mejora la expresión de PLC activa y potencia la captación de MeOH, como resume esta tabla de datos:

ES 2 451 266 T3

Mut	Velocidad de coalimentación (ml/min)	OD de la inducción	Actividad de PLC (U/ml sup)	MeOH consumido (l)	Bodipy proteasa	OD final
S	0,5	250-300	100	1	Sí	450
	1,5		1100	1,7	No	680
	2		1550	1,3	No	860
	2,5		1550	1,4	No	900
	3		1715	1,4	No	820
	0,5		1001	5,6	Sí	871
+	0,5		1200	7	No	908
	1		1786	5,9	No	988
	1		2010	6,8	No	930
	1	250-300	1768	7,9	No	700
	1,5		2669	10	No	701
	1,5		2693	7,1	No	818
	1,5		2597	8,1	No	804
	2		2154	8,3	No	752
	1,5		1164	7,1	No	807
	1,5		1220	6,9	No	799
	1,5	250-300	945	2,1	Sí*	726
1,5		784	3	Sí*	685	

5 PLC no parece afectar a las características de crecimiento fisiológico de esta cepa de fenotipo Mut⁺ - que expresa PLC recombinante SEQ ID NO:2, en un número de copias 6X, los datos ilustrados en la Figura 21, un perfil de OUR como se expone en la descripción de la figura. Esto es una alimentación de MeOH realizada según suministro, sin glucosa residual o MeOH en cultivos Mut⁺.

10 Adicionalmente, la calidad de la proteína PLC producida es impredeciblemente variable, por ejemplo << o >> 50% de la proteína PLC total es activa, como se ilustra mediante la representación de los resultados de SDS-PAGE, en la Figura 22. El sumario de datos de la gráfica del perfil de OUR (discutido anteriormente) se inserta en la sección superior de la ilustración de SDS-PAGE. El control se designa mediante JG = 0,5 µl 1,6 mg ml⁻¹. No hubo correlación con la actividad de proteasa o de aminopeptidasa. Se localizó intracelularmente una cantidad significativa de PLC activa, como se ilustra en la Figura 23 (que también muestra el protocolo del estudio), en el que se detectó intracelularmente >700 U/ml de PLC (en Fig. 23, PLC (SEQ ID NO:2) + un péptido señal alfa (de *Saccharomyces*) + glucosilación). Los cambios morfológicos se correlacionaron con la concentración de PLC activa, como se ilustra en la Figura 24. La magnitud del cambio morfológico dependió de la cepa y de la fuente de C.

15 Un aumento de Zn no reavivó la expresión en una cepa de *Pichia* que tiene un número de copias 2X Mut⁺ SEQ ID NO:2 con mutación DSD, como se resume en la gráfica de datos, más abajo (exceso de alrededor de 1X suministrado vía coalimentación) (la primera fila superior es el control de vector vacío). El aumento de Zn no mejoró la estabilidad durante el almacenamiento como la robustez del caldo completo (nivel de actividad similar tras >100 h a 4°C) y robustez global del procedimiento.

Zn	MeOH (l)	Base (l)	Glicerol al 70% (v/v) (l)	OD600	PLC (U/ml)
1X (2,2 mM)	7,1	2,3	9,6	765	0
0,2X	7,4	2,1	8,6	731	392

1X	7,1	2,8	9,0	776	2700
4X	6,1	2,2	10	780	2448
12X	6,4	2,3	9,8	776	2498

La Figura 25 resume gráficamente los datos que muestran el estado de un comportamiento de producción de PLC a TFT (tiempo de fermentación total) de 95 h en *Pichia*. Las cinco barras en el lado derecho de la gráfica muestran los resultados de la “cepa Zeo”, o adaptación a zeocina de la cepa de *Pichia pastoris* que produce PLC. Esta cepa es una cepa sin marcador resistente a antibióticos que expresa como gen heterólogo una PLC descrita aquí (SEQ ID NO:2) en una cepa de *Pichia pastoris*. Se ha demostrado que adaptando la cepa con zeocina, un antibiótico, se puede obtener una nueva cepa estable con un nivel de expresión enormemente mejorado para la proteína de interés.

La cepa sin marcador resistente a antibióticos original, cepa #1 (que contiene SEQ ID NO:2), se hizo crecer en una serie de etapas de dilución, cada vez con una concentración creciente de zeocina, que es un antibiótico. En cada etapa, una porción del cultivo de la etapa previa se diluyó hasta una densidad óptica de 600 nm (OD600) de 1,0 con medio reciente, y se añadió una cantidad creciente de zeocina al nuevo cultivo durante otras 24 horas de crecimiento. En la etapa final, se usó una concentración de zeocina de 200 ug/ml, y el cultivo final se extendió en una placa MD/YPD para permitir que crecieran colonias individuales. Se encontró que las colonias del cultivo de la etapa final muestran tolerancia elevada a zeocina, mientras que la cepa progenitora muestra una tolerancia muy pequeña. Una de las colonias, cepa #2 (que contiene SEQ ID NO:2), mostró una mejora drástica (alrededor de 70% mayor) en la expresión de PLC en comparación con la cepa de PLC original, cepa #1. También se demostró que la cepa #2 es estable tanto en tolerancia a zeocina como en expresión de PLC tras una pasada de generación 40, indicando que la nueva cepa adquirió el rasgo “permanente” de expresión elevada de PLC y tolerancia elevada a zeocina.

Se logró un nivel elevado de actividad de PLC usando la “cepa Zeo” (adaptación de *Pichia* a zeocina): 4100 u/ml logrados en minitanques. Este resultado procede de la cepa de *Pichia* que comprende 6x DSD SEQ ID NO:2. De forma breve, esta cepa que expresa SEQ ID NO:2 se “adaptó” haciéndola crecer en una serie de etapas, cada una con una concentración creciente de zeocina. Aparentemente, este procedimiento de adaptación forzó algunos cambios (a nivel molecular o genético) a la cepa/constructo, y dio como resultado una mejora significativa del nivel de actividad de PLC. Los resultados ejemplares son:

- Tanque 1, 2 y 4 (representando cada uno diferentes colonias) se comportaron todos ellos de forma superior a la cepa que expresa SEQ ID NO:2 preadaptada, teniendo el tanque 1 y 4 4100 u/ml, y el tanque 2 teniendo 3500 u/ml.
- Tanque 1 y 4 tuvieron alrededor de 3000 u/ml tan pronto como en 75 h, representando una acumulación de actividad mucho más rápida en comparación con la cepa que expresa SEQ ID NO:2 preadaptada original (que está normalmente muy por debajo de 2000 u/ml en ese momento).

Los detalles del diseño experimental y resultado son:

Razón teórica de la adaptación a zeocina:

La etapa más temprana del trabajo sobre la expresión de PLC se realizó en el vector pPICZa de *Pichia*, que contiene el marcador de resistencia a zeocina. De este modo, la zeocina se usó para la selección de la transformación. Más tarde, se cambió al constructo de versión sin AMR, para desarrollar candidatos de productos comerciales. Mientras se realizaban fermentaciones en minitanques, se observó una caída significativa del nivel de actividad de PLC obtenido usando los constructos sin AMR: la actividad del sobrenadante alcanzó 4000 u/ml en los constructos de pPICZa-DSD, mientras que sólo se obtuvo aprox. 2000 u/ml en el 2x DSD. También se observaron con los constructos sin AMR diferencias fisiológicas significativas, por ejemplo menores velocidades de consumo de metanol y mucha más lisis celular, especialmente cuando se ensayan constructos de un mayor número de copias (5x, 6x) usando los mismos protocolos de fermentación.

Siendo una de las diferencias aparentes entre el constructo pPIZa y el constructo sin AMR el uso de zeocina en la transformación, se planteó la cuestión de qué han podido sufrir las células con selección de zeocina. La descripción proporciona el crecimiento del constructo sin AMR en presencia de zeocina – las células sufren entonces ciertos cambios beneficiosos para la expresión de PLC.

Experimento de adaptación a zeocina en 2x DSD:

En primer lugar se usó el experimento con 2x DSD (ya que fue la molécula de transferencia en ese momento). El estudio comenzó con una concentración de zeocina de 1 ug/ml (“zeo 1”), y el cultivo creció durante ~24 h. A partir de ahí, se llevó a cabo un incremento por etapas de la concentración de zeocina hasta zeo 5, zeo 10, zeo 15, zeo 20,

zeo 40, zeo 60, zeo 80, zeo 100 y finalmente hasta zeo 200 (zeo 100 se usa normalmente para selección de la transformación). Se usó medio reciente en cada etapa, y el cultivo de la etapa previa se usó para inocular el cultivo de la siguiente etapa con OD de 1,0, y se hizo crecer durante ~24 h. Los cultivos de cada etapa también se extendieron en placas YPD para la conservación y para obtener colonias individuales.

5 Resultados de fermentación en minitanques de colonias adaptadas a zeo:

Para evaluar los efectos de la adaptación a zeocina, se recogió una docena de colonias de cultivos zeo 200 y zeo 100 (que se extendieron en placas YPD), y se cribaron con minitanques. Los resultados se resumen en la presentación 6. Se pudo encontrar varias colonias que superaron significativamente al constructo original (cepa de *Pichia* que comprende SEQ ID NO:2). Entre ellas, la colonia #5 del cultivo zeo 200 mostró una mejora de alrededor del 50% en el nivel de actividad de PLC. Observaciones en el cribado:

- No hubo diferencias aparentes en los perfiles de crecimiento entre los cultivos adaptados a zeo y la cepa original que expresa SEQ ID NO:2.
- Aunque no se ensayó extensamente la estabilidad de los cultivos adaptados, se volvieron a extender varias veces en placas YPD y/o MD sin la presencia de zeocina. Toda fermentación también se realizó sin la presencia de zeocina.
- Hubo variaciones aparentes de una colonia a otra, tanto en el crecimiento como en la expresión de PLC.
- Ciertos problemas técnicos con la fermentación pueden ser parcialmente responsables de las variaciones.

Experimento de adaptación a zeocina en 6x DSD:

Alentados por los resultados de 2x DSD adaptada a zeo, se llevó a cabo entonces el mismo experimento en 6x DSD (que en ese momento se determinó que era superior a 2x DSD). Se comenzó con una concentración de zeocina de 5 ug/ml ("zeo 5"), y el cultivo se hizo crecer durante ~24 h. A partir de ahí, se llevó a cabo un incremento por etapas de la concentración de zeocina hasta zeo 15, zeo 30, zeo 50, zeo 100 y finalmente hasta zeo 200. Al igual que con 2x DSD, se usó medio reciente en cada etapa, y el cultivo de la etapa previa se usó para inocular el cultivo de la siguiente etapa con OD de 1,0, y se hizo crecer durante ~24 h. Los cultivos de cada etapa también se extendieron en placas YPD para la conservación y para obtener colonias individuales.

Resultados de minitanques de colonias 6x DSD adaptadas a zeo:

Se recogieron seis colonias del cultivo zeo 200 (que se extendió en placa MD) y se ensayaron junto con la cepa original que expresa SEQ ID NO:2, en los minitanques. Las observaciones clave son como siguen:

- Las tres colonias (tanque 1, 2 y 4) superaron a la cepa original que expresa SEQ ID NO:2, teniendo el tanque 1 y 4 4100 u/ml, y teniendo el tanque 2 3500 u/ml.
- El tanque 1 y 4 tuvieron alrededor de 3000 u/ml tan pronto como en 75 h, representando una acumulación de actividad mucho más rápida en comparación con la cepa que expresa SEQ ID NO:2 (que normalmente está muy por debajo de 2000 u/ml en ese momento).
- El nivel de proteína PLC también parece ser mayor en los tanques 1, 2 y 4 en comparación con el experimento de 3000 u/ml en el tanque de 10 l (véase presentación 4). De este modo no está claro si la actividad específica aparente es mayor en los tanques 1, 2 y 4, es decir, si la PLC que se produce es diferente de aquella de la cepa original que expresa SEQ ID NO:2.
- El control, tanque 7 y 8, no obtuvo 3000 u/ml este tiempo. No está claro si el tanque 1, 2 y 4 pueden ser capaces de alcanzar incluso un mayor nivel. Obsérvese que el porcentaje de incremento (35%, 4100 u/ml frente a 3000 u/ml) es más pequeño que el cultivo adaptado 2x.
- En la Figura 26 se encuentra un resumen del cribado de expresión a partir de las colonias adaptadas a zeocina 6x DSD. El mayor nivel de actividad observado con la cepa original fue ~3000 u/ml (minitanque y 10 l); el nivel alcanzado con 6x DSD adaptada a zeocina fue 4100 u/ml (incremento de ~35%). La Figura 27 ilustra datos que muestran que el nivel de proteína PLC fue mayor en los tanques 1, 2 y 4 en comparación con el experimento de 3000 u/ml en el tanque de 10 l (y condiciones del tanque), como se discute anteriormente (la carga de gel fue a 1,0 ul de caldo diluido 5X, 0,2 ul de caldo completo). La Figura 28 muestra la comparación del crecimiento de colonias adaptadas a zeocina frente al control. Las colonias 6x DSD adaptadas a zeocina tienen un perfil de crecimiento similar en comparación con la cepa original que expresa SEQ ID NO:2 (6x DSD).

La Qp de proteína segregada en cultivos de levadura aerobios limitados por C es generalmente 0,5-2,5 mg/g.h-1 a $\mu = 0,10 \text{ h}^{-1}$. Basado en el contenido proteico de 400 mg/g DW, la "carga metabólica" es < 10% de la tasa de producción de proteína global. El nivel de ARNm de PLC permanece elevado durante la fermentación, y no se

correlaciona con la expresión. En base a 5 g/l (150 g) de proteína PLC, menos de 0,1 moles de C/h del total de 5 moles de C/h (~2% de C total consumido) pasa a carbono de PLC, y ~25% pasa a biomasa. La actividad de PLC no parece impactar a las características fisiológicas de crecimiento generales en estas condiciones de producción (excepto que se vea afectada la capacidad de utilización de MeOH).

- 5 En resumen, se proporcionan sistemas de células de levadura resistentes a zeocina, tales como células de levadura, estirpes celulares y/o células individuales, para expresar una proteína heteróloga (por ejemplo, una enzima, tal como una PLC) obtenida mediante un procedimiento que comprende las etapas de proporcionar una célula de *Pichia sp* (por ejemplo, *P. pastoris*) que comprende un ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, un vector que comprende una secuencia codificante de enzima; un ORF enlazado operablemente a un promotor) capaz de expresar una proteína heteróloga; cultivar la célula o células en condiciones que comprenden zeocina a una concentración inicial (una concentración suficientemente baja tal que algunas células sobreviven, pero suficientemente elevada para seleccionar células resistentes a antibiótico); seleccionar células resistentes a la concentración inicial de zeocina, y volver a cultivar en condiciones que comprenden una mayor concentración de zeocina; y seleccionar las células resistentes a la mayor concentración de zeocina. La invención también proporciona células de levadura, estirpes celulares y/o células individuales obtenidas mediante este procedimiento. El cribado habitual puede determinar qué concentración inicial de antibiótico usar, cuántas rondas de selección son necesarias, o se desean, y cuán rápidamente incrementar concentraciones de antibiótico entre rondas de selección.

EJEMPLO 6: PLC TERMOESTABLE

- 20 La descripción proporciona enzimas de fosfolipasa termoestables. Se demostró la termoestabilidad para la enzima ejemplar que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO:2. La termoestabilidad de fosfolípidos comparables se demostró usando SEQ ID NO:2. La actividad de SEQ ID NO:2 se ensayó en dos sistemas diferentes:

- 25 acuoso y en aceite. En el sistema acuoso, se usó un sustrato sustituto (p-nppc) para medir la actividad; la enzima comenzó a perder actividad a 86°C. Sin embargo, en los ensayos en aceite, la enzima mostró buena actividad a la hora de hidrolizar sustratos de PC y PE presentes en el aceite de soja a 85°C. Se comprobó T_m de la misma enzima, y se encontró que fue 86°C @ 15 mg/ml, y no reversible.

- 30 La Figura 29 ilustra los resultados de un experimento de calentamiento a 85°C con 10 U de SEQ ID NO:2, con las condiciones indicadas en la figura. La Figura 30 ilustra datos de RMN que resumen este experimento de calentamiento. Las Figuras 31, 32 y 33 ilustran datos que resumen la estabilidad térmica de SEQ ID NO:2 usando p-NPPC, a las condiciones mostradas en la figura. La Figura 34 ilustra datos del análisis de DSC que muestran la termoestabilidad de SEQ ID NO:2, con la enzima a una concentración de 15 mg/ml y la T_m a 86°C.

Ejemplo 7: Modificaciones a una PLC de la invención

- 35 La enzima de fosfolipasa C modificada discutida en el Ejemplo 4 (SEQ ID NO:177, codificada por SEQ ID NO:178) es la subsecuencia enzimáticamente activa de una secuencia más larga (SEQ ID NO:176). SEQ ID NO:176 tiene una secuencia líder de restos 1 a 37 (en negrita) de SEQ ID NO:2. SEQ ID NO:176, como se codifica mediante SEQ ID NO:177, se usó como un molde para la modificación posterior usando tecnología GSSM. Las posiciones están numeradas partiendo de la metionina N-terminal. Las mutaciones discutidas en el Ejemplo 4 están subrayadas y en negrita (numeradas aquí como N100D, N1685 y N171D).

MKKKVLALAA MVALAAPVQS VVFAQTNNSE SPAPILRSA EDKHNEGINS
HLWIVNRAID IMSRNTTIVN PNETALLNEW RADLENGIYS ADYENPYDD
STYASHFYDP DTGTTYIPFA KHAKETGAKY FNLAGQAYQN QDMQQAFFYL
GLSLHYLGDV NQPMHAASFT DLSYPMGFHS KYENFVDTIK NNYIVSDSNG
YWNWKGANPE DWIEGAAVAA KQDYPGVVND TTKDWFVCAA VSQEYADKWR
AEVTPVTGKR LMEAQRVTAG YIHLWFDYV NR (SEQ ID NO:176)

WSA EDKHNEGINS
HLWIVNRAID IMSRNTTIVN PNETALLNEW RADLENGIYS ADYENPYDD
STYASHFYDP DTGTTYIPFA KHAKETGAKY FNLAGQAYQN QDMQQAFFYL
GLSLHYLGDV NQPMHAASFT DLSYPMGFHS KYENFVDTIK NNYIVSDSNG
YWNWKGANPE DWIEGAAVAA KQDYPGVVND TTKDWFVCAA VSQEYADKWR
AEVTPVTGKR LMEAQRVTAG YIHLWFDYV NR (SEQ ID NO:175)

ATGAAAAGAAAGTATTAGCACTAGCAGCTATGGTTGCTTTAGCTGCGC
CAGTTCAAAGTGTAGTATTTGCACAAACAATAATAGTGAAAGTCCTGC
ACCGATTTTAAGATGGTCAGCTGAGGATAAGCATAATGAGGGGATTAAC
TCTCATTGTGGATTGTAAATCGTGCAATTGACATCATGTCTCGTAATA
CAACGATTGTGAATCCGAATGAACTGCATTATTAATGAGTGGCGTGC
TGATTTAGAAAATGGTATTTATTCTGCTGATTACGAGAATCCTTATTAT
GATGATAGTACATATGCTTCTCACTTTTATGATCCGGATACTGGAACAA
CATATATTCCTTTTGCGAAACATGCAAAGAAACAGGCGCAAAATATTT
TAACCTTGCTGGTCAAGCATAACAAAATCAAGATATGCAGCAAGCATTC
TTCTACTTAGGATTATCGCTTCATTATTTAGGAGATGTGAATCAGCCAA
TGCATGCAGCATCTTTTACGGATCTTTCTTATCCAATGGGTTTCCATTC
TAAATACGAAAATTTGTTGATACAATAAAAAATAACTATATTGTTTCA
GATAGCAATGGATATTGGAATTGGAAGGAGCAAACCCAGAAGATTGGA
TTGAAGGAGCAGCGGTAGCAGCTAAACAAGATTATCCTGGCGTTGTGAA
CGATACGACAAAAGATTGGTTTGTAAAAGCAGCCGTATCTCAAGAATAT
GCAGATAAATGGCGTGCGGAAGTAACACCGGTGACAGGAAAGCGTTTAA
TGGAAGCGCAGCGGTTACAGCTGGTTATATTCATTTGTGGTTTGATAC
GTATGTAAATCGCTAA (SEQ ID NO:177)

TGGTCAGCTGAGGATAAGCATAATGAGGGGATTAACCTCTCATTGTGGA
 TTGTAAATCGTGCAATTGACATCATGTCTCGTAATACAACGATTGTGAA
 TCCGAATGAAACTGCATTATTTAAATGAGTGGCGTGCTGATTTAGAAAAT
 GGTATTTATTCTGCTGATTACGAGAATCCTTATTATGATGATAGTACAT
 5 ATGCTTCTCACTTTTATGATCCGGATACTGGAACAACATATATTCCTTT
 TGCGAAACATGCAAAAGAAACAGGCGCAAAATATTTTAAACCTTGCTGGT
 CAAGCATAACCAAAATCAAGATATGCAGCAAGCATTCTTCTACTTAGGAT
 TATCGCTTCATTATTTAGGAGATGTGAATCAGCCAATGCATGCAGCATC
 TTTTACGGATCTTTCTTATCCAATGGGTTTCCATTCTAAATACGAAAAT
 TTTGTTGATACAATAAAAAATAACTATATTGTTTCAGATAGCAATGGAT
 ATTGGAATTGGAAAGGAGCAAACCCAGAAGATTGGATTGAAGGAGCAGC
 GGTAGCAGCTAAACAAGATTATCTGGCGTTGTGAACGATACGACAAAA
 GATTGGTTTGTAAAAGCAGCCGTATCTCAAGAATATGCAGATAAATGGC
 GTGCGGAAGTAACACCGGTGACAGGAAAGCGTTTAAATGGAAGCGCAGCG
 CGTTACAGCTGGTTATATTCATTTGTGGTTTGATACGTATGTAAATCGC
 TAA (SEQ ID NO:178)

Se realizaron mutaciones de un solo resto usando métodos de Gene Site Saturation Mutagenesis (GSSM) descritos anteriormente y ensayados para la actividad de fosfolipasa. Con fines de cribado, el vector de expresión fue pASK en el hospedante de *E. coli* Top10. Se seleccionaron los resultados de GSSM a partir de un cribado primario para el que se usó una emulsión de PA/PI como el sustrato, y las muestras se analizaron mediante LCMS. Estos resultados primarios se confirmaron entonces en aceite de haba de soja y se analizaron mediante RMN ³¹P y HPLC.

El ensayo de aceite de haba de soja y el procedimiento para preparar las muestras para el análisis mediante RMN son como sigue:

El detergente para RMN se obtuvo disolviendo 25 g de ácido desoxicólico, 5,84 g de EDTA, 5,45 g de base Tris en 900 ml de agua, ajustando después el pH hasta 10,5 usando peletes de KOH. El patrón interno de RMN fue 50 mM de TIP y 12,5 mM de TBP en isopropanol de grado HPLC. El óxido de deuterio (D, 99,9%) poco paramagnético procedió de Cambridge Isotope Laboratories Inc. (DLM – 11-100). El control de RMN fue Avanti Lecithin (aceite estándar de referencia de fosfolípidos de soja mixtos de International Lecithin & Phospholipids Society), Avanti Polar Lipids Inc, # 95309.

Los patrones y las muestras se prepararon como sigue:

Mézclase a conciencia un lote de aceite de haba de soja bruto

Dispéñese 1 ml de aceite en un tubo de 2 ml, y añádanse 60 ul de enzima purificada (para controles, 18 Unidades) o lisado celular puro (para cribar mutantes), y mézclase durante 15 segundos. Las Unidades se definen como hidrólisis de 1 µmol de PC por minuto a 37°C a pH 7,3.

Incúbese a 60°C durante 48 horas en una termomezcladora, agitando a 14000 rpm, y sometiendo a vórtice de forma intermitente.

Tras la incubación, mézclense las muestras a conciencia usando un vórtice

Pésense 250 mg (+/- 0,2 mg) de cada muestra en un tubo de 2 ml, y pésese un control de RMN de 10 mg (+/- 0,1 mg) de Avanti Lecithin.

Añádanse 900 ul de detergente para RMN, y después añádanse 100 ul de D₂O a cada muestra. Mézclense las muestras a conciencia sometiéndolas a vórtice y agitando en termomezcladora Eppendorf, a 30-37°C y 14000 rpm durante 30 minutos

Centrifúguese a 13.000 RPM durante 10 minutos

5 Retírese con cuidado la capa superior oleosa

Añádanse 750 ul de hexano a cada muestra y sométase a vórtice suavemente*

Centrifúguese a 13.000 RPM durante 10 minutos

Elimínense cuidadosamente 600 ul de la capa acuosa inferior y transfíranse a un nuevo tubo. Añádanse 25 ul de patrón interno, y mézclese bien

10 Transfíranse 500 ul a un tubo de RMN de 5 mm

La liberación de DAG se midió mediante HPLC cuantitativa según el siguiente protocolo:

La disolución de muestra fue muestras de aceite de ~50 ul y 950 ul de hexano/isopropanol (9:1) hasta obtener 1 ml. Las disoluciones patrón fueron, por ejemplo, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, y 4 mg/ml de aceite Enova™. El aceite Enova es un aceite con contenido elevado de DAG, que tiene una distribución de ácidos grasos similar a un aceite vegetal normal (1,3-DAG y 1,2-DAG).

15

Ajustes de HPLC:

Columna: Chromegasphere™ SI-60, 15 cmx4,6 mm

Temperatura: 40°C

Caudal: 2 ml/min.

20 Velocidad de inyección: 20 ul

Fase móvil A: hexano

Fase móvil B: hexano/isopropanol/acetato de etilo/ácido fórmico = 800:100:100:1

Gradiente de elución:

Tiempo (min.)	0	8	8,5	15	15,1	19
%B	2	35	98	98	2	2

25 Ajustes de ELSD: Un ajuste ejemplar fue temperatura 40°C, ganancia 5, y nitrógeno gaseoso a 3,5 bares. El pico de DAG se identificó por comparando el tiempo de retención con el del patrón. La cuantificación se basó en la relación entre la respuesta del detector (área del pico) y la concentración de analito.

Basándose en datos de RMN y de HPLC, se seleccionaron las mutaciones mostradas en la Tabla 5 más abajo. La Tabla 5 indica el aminoácido de partida, el número de posición del cambio de aminoácido, y el aminoácido cambiado. La tabla también indica el codón original, el codón de sustitución y otros codones para el mismo cambio de aminoácido. Por ejemplo, la segunda fila, "E41A", indica que el aminoácido en la posición 41 fue originalmente "E" (ácido glutámico), pero se cambió a "A" (alanina). El codón original para el cambio E41A fue "GAG", pero se cambió a "GCA". Sin embargo, también se pudieron haber usado los codones "GCG", "GCC" o "GCT". Las variantes de codones como se exponen en la Tabla 5 que produjeron variantes (de SEQ ID NO:176) con la mejor variación o "mejora" con respecto al "tipo salvaje" (SEQ ID NO:176) para la hidrólisis de PA. La invención proporciona ácidos nucleicos, y los polinucleótidos que los codifican, que comprenden una, varias o todas las variaciones, o el equivalente de todas las variaciones, expuestas en la Tabla 5.

En la Figura 35, se da la fracción en peso de la especie de fosfolípido (PL) individual con respecto al PL total que queda tras la reacción, reflejando la especificidad de los mutantes por la especie particular. Aquí, las especies fueron ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina (PC). "TIP" se refiere al patrón interno de RMN. El "DAG liberado" se midió mediante HPLC, y refleja valores relativos entre muestras y controles de 1,3-DAG y 1,2-DAG totales. El control positivo fue una muestra pura de mutante E41A descrito previamente en Tan et al., Biochemistry 37:4275-4279 (1998). Los resultados indican que los mutantes liberan bien DAG y tienen buena actividad sobre diversas especies, incluyendo fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), comparable o mejor que el molde (SEQ ID NO:176). Por ejemplo, D100L y D100M muestran actividad particular sobre PA. Q265R

45

ES 2 451 266 T3

muestra actividad particular sobre PI. Estas mutaciones se pueden combinar para proporcionar enzimas que tienen actividades deseadas sobre diversos sustratos.

Tabla 5: Resultados de GSSM

Resultados de GSSM para PLC	Codon original	Cambia a	Otros codones que codifican el mismo AA "cambiado a"	AA original	AA cambiado a	Localización de mutación del codón
E41A	GAG	GCA	GCG, GCC, GCT	E	A	41
E41W	GAG	TGG	-	E	W	41
E41F	GAG	TTC	TTT	E	F	41
E41Y	GAG	TAC	TAT	E	Y	41
E41R	GAG	CGT	CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	E	R	41
E94R	GAG	CGG	CGC, CGA, CGT, AGA, AGG	E	R	94
D100L	GAT	TTG	CTC, TTA, CTT, CTA, CTG	D	L	100
D100M	GAT	ATG	-	D	M	100
D100Y	GAT	TAT	TAC	D	Y	100
D100F	GAT	TTT	TTC	D	F	100
D100W	GAT	TGG	-	D	W	100
A104L	GCT	CTT	CTC, TTA, TTG, CTA, CTG	A	L	104
D111R	GAT	AGG	CGC, CGA, CGT, AGA, CGG	D	R	111
T112R	ACT	CGG	CGC, CGA, CGT, AGA, AGG	T	R	112
Y116W	TAT	TGG	-	Y	W	116
I117W	ATT	TGG	-	I	W	117
P118W	CCT	TGG	-	P	W	118
E125K	GAA	AAG	AAA	E	K	125
S168N	TCT	AAC	AAT	N	S	168
D171V	GAT	GTG	GTT, GTC, GTA	D	V	171
D171E	GAT	GAG	GAA	D	E	171
M176W	ATG	TGG	-	M	W	176
D230H	GAT	CAT	CAC	D	H	230
D230R	GAT	CGT	CGC, CGA,	D	R	230

Resultados de GSSM para PLC	Codon original	Cambia a	Otros codones que codifican el mismo AA "cambiado a"	AA original	AA cambiado a	Localización de mutación del codón
			CGG, AGA, AGG			
D234W	GAT	TGG	-	D	W	234
D234V	GAT	GTG	GTT, GTC, GTA	D	V	234
D234G	GAT	GGT	GGC, GGA, GGG	D	G	234
D234R	GAT	CGG	CGC, CGA, CGT, AGA, AGG	D	R	234
D234K	GAT	AAG	AAA	D	K	234
Q265R	CAG	CGT	CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Q	R	265

5 En consecuencia, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que comprenden la secuencia SEQ ID NO:177 o SEQ ID NO:178 que tienen una, dos o más mutaciones de ácido nucleico que codifican las mutaciones de aminoácidos enunciadas anteriormente, tales como los cambios de codón descritos aquí; estos ácidos nucleicos y polipéptidos se proporcionan adicionalmente en realizaciones descritas aquí.

10 Después de que se cribaron los resultados de GSSM y se seleccionaron los resultados más importantes (véase Tabla 5), se realizaron ensayos de caracterización adicionales sobre placas de yema de huevo a fin de estrechar el número de mutantes de GSSM individuales llevados adelante para la combinación usando tecnología GeneReassembly. La Tabla 7 muestra los datos del ensayo de yema de huevo (ensayo de yema de huevo descrito más abajo), junto con los resultados de ensayos de aceite y determinación de actividad residual de tolerancia térmica. La Figura 36 ilustra los mutantes de GSSM individuales que se seleccionaron para la inclusión en el procedimiento de GeneReassembly. GeneReassembly se llevó a cabo como se describió previamente.

15 La Tabla 6, más abajo, enumera 288 secuencias polipeptídicas ejemplares, que se crearon mediante combinación de GeneReassembly de los mutantes de GSSM individuales seleccionados. Todos son variantes de la secuencia de aminoácidos de partida SEQ ID NO:176 (la secuencia de "tipo salvaje" o "WT").

Para ayudar a leer la Tabla 6, por ejemplo, para la fosfolipasa ejemplar de la invención caracterizada como fosfolipasa 1 desprendida (segunda fila):

- el resto de aminoácido de tipo salvaje "E", o ácido glutámico (glu) en la posición 41 del resto, se modifica a un "Y", o resto de tirosina (tyr);
- 20 - el resto de aminoácido de tipo salvaje "N", o asparagina (asp) en la posición 100 del resto, se modifica a un "M", o resto de metionina (met);
- el resto de aminoácido de tipo salvaje "N", o asparagina (asp) en la posición 168 del resto, se modifica a un "S", o resto de serina (ser);
- 25 - el resto de aminoácido de tipo salvaje "N", o asparagina (asp) en la posición 171 del resto, se modifica a un "N"; y
- el resto de aminoácido de tipo salvaje "M", o metionina (met) en la posición 176 del resto, se modifica a un "M".

Nota: La fosfolipasa desprendida 172 (fila 173, en negrita), no es una fosfolipasa ejemplar de la invención, es la secuencia de fosfolipasa de partida SEQ ID NO:2 (véase el Ejemplo 4).

30 Tabla 6: Librería de fosfolipasas que resulta de la combinación de GeneReassembly de mutantes de GSSM individuales

ES 2 451 266 T3

Fosfolipasa desprendida	E41	N100	N168	N171	M176
1	Y	M	S	N	M
2	F	W	S	E	M
3	A	M	N	E	W
4	Y	F	S	E	M
5	Y	Y	S	N	M
6	R	F	N	E	M
7	E	Y	N	E	M
8	E	F	N	N	W
9	A	W	S	E	M
10	Y	Y	S	N	W
11	E	L	S	N	W
12	A	F	N	N	M
13	W	M	N	N	M
14	W	Y	S	E	M
15	R	L	N	E	W
16	W	W	S	E	W
17	W	N	S	N	M
18	W	L	N	E	M
19	R	N	N	E	M
20	F	N	N	N	W
21	Y	N	S	E	M
22	R	N	S	N	W
23	F	Y	S	N	W
24	F	L	N	E	W
25	A	N	N	E	M
26	A	W	N	N	M
27	W	M	N	E	W
28	F	L	S	E	W
29	Y	F	S	N	M
30	F	F	N	N	M
31	E	W	N	E	M
32	E	W	N	N	W
33	E	W	S	E	M
34	E	Y	S	N	M

ES 2 451 266 T3

Fosfolipasa desprendida	E41	N100	N168	N171	M176
35	E	N	S	N	M
36	E	L	N	E	W
37	Y	M	N	E	M
38	F	N	S	N	W
39	W	N	N	E	W
40	E	M	S	N	M
41	Y	N	S	N	M
42	Y	Y	N	E	M
43	Y	L	N	E	M
44	F	M	N	N	W
45	F	N	S	E	M
46	F	M	S	N	W
47	E	F	S	N	W
48	W	Y	N	E	W
49	F	F	N	E	M
50	R	M	S	N	W
51	A	N	N	E	w
52	R	W	S	N	M
53	R	L	S	N	M
54	R	W	N	E	M
55	F	W	N	N	M
56	E	L	N	N	W
57	E	L	S	E	M
58	A	Y	S	N	W
59	E	Y	S	N	W
60	W	N	N	E	M
61	W	N	N	N	W
62	A	F	S	N	M
63	Y	M	S	E	W
64	R	F	S	N	M
65	A	M	N	N	M
66	F	N	N	E	M
67	E	M	N	E	M
68	E	Y	S	E	M

ES 2 451 266 T3

Fosfolipasa desprendida	E41	N100	N168	N171	M176
69	E	F	S	E	M
70	E	W	S	N	M
71	F	W	S	N	W
72	E	W	N	E	W
73	Y	L	N	N	W
74	Y	N	S	N	W
75	A	Y	S	E	W
76	E	F	S	N	M
77	W	L	S	N	M
78	Y	N	N	E	M
79	E	F	N	E	M
80	W	N	S	E	M
81	E	M	S	E	M
82	W	N	S	N	W
83	E	W	S	N	W
84	Y	M	N	E	W
85	E	Y	N	N	W
86	F	M	N	E	W
87	R	L	S	E	W
88	W	F	S	N	M
89	E	L	S	N	M
90	E	L	N	E	M
91	Y	F	N	N	W
92	Y	L	S	E	M
93	A	N	S	N	W
94	E	N	N	N	W
95	E	M	S	N	W
96	R	N	N	E	W
97	E	M	N	E	W
98	F	W	S	E	W
99	W	W	N	N	M
100	W	N	N	N	M
101	E	N	S	E	W
102	R	W	S	E	W

ES 2 451 266 T3

Fosfolipasa desprendida	E41	N100	N168	N171	M176
103	A	W	S	E	W
104	A	Y	S	E	M
105	F	Y	S	E	W
106	A	Y	N	N	W
107	R	N	S	N	M
108	F	F	N	N	W
109	Y	N	N	E	W
110	E	W	S	E	W
111	R	N	S	E	M
112	E	L	N	N	M
113	E	N	S	N	W
114	R	W	S	N	W
115	F	W	N	E	M
116	Y	Y	N	E	W
117	F	Y	N	N	W
118	W	Y	S	N	W
119	A	N	S	N	M
120	A	L	S	N	W
121	E	Y	N	E	W
122	E	Y	S	E	W
123	W	N	S	E	W
124	E	M	N	N	M
125	E	N	N	E	M
126	Y	W	N	E	W
127	A	W	N	N	W
128	Y	Y	S	E	M
129	W	Y	N	N	W
130	F	Y	N	E	M
131	A	N	S	E	M
132	A	L	S	E	W
133	E	F	N	E	W
134	R	N	S	E	W
135	F	N	S	E	W
136	E	W	N	N	M

ES 2 451 266 T3

Fosfolipasa desprendida	E41	N100	N168	N171	M176
137	E	N	N	E	W
138	W	W	N	E	W
139	Y	W	S	N	W
140	W	Y	N	E	M
141	R	Y	S	N	W
142	F	Y	S	N	M
143	Y	F	S	N	W
144	R	L	N	E	M
145	F	N	N	E	W
146	Y	N	S	E	W
147	R	N	N	N	M
148	E	Y	N	N	M
149	R	W	S	E	M
150	Y	W	N	N	W
151	A	W	S	N	W
152	R	Y	S	E	M
153	R	Y	N	E	M
154	W	Y	S	E	W
155	A	Y	N	E	W
156	Y	M	N	N	W
157	Y	F	N	N	M
158	A	N	S	E	W
159	Y	N	N	N	M
160	E	F	N	N	M
161	Y	W	S	E	M
162	Y	W	N	E	M
163	W	W	N	N	W
164	F	Y	N	E	W
165	W	Y	S	N	M
166	A	Y	N	E	M
167	F	F	S	E	W
168	W	L	S	E	M
169	Y	Y	S	E	W
170	E	L	S	E	W

ES 2 451 266 T3

Fosfolipasa desprendida	E41	N100	N168	N171	M176
171	F	N	N	N	M
172	E	N	N	N	M
173	W	W	S	E	M
174	A	W	N	E	M
175	R	Y	N	N	W
176	A	Y	S	N	M
177	R	Y	S	N	M
178	R	Y	S	E	W
179	R	M	N	E	W
180	W	F	N	E	M
181	E	F	S	E	W
182	E	M	S	E	W
183	A	N	N	N	M
184	E	N	S	E	M
185	F	W	N	N	W
186	F	W	S	N	M
187	R	Y	N	E	W
188	Y	Y	N	N	W
189	F	Y	S	E	M
190	F	N	S	N	M
191	R	F	S	E	W
192	F	L	S	N	W
193	W	Y	N	N	M
194	A	L	N	N	M
195	F	L	N	N	M
196	A	F	S	E	W
197	W	F	S	E	W
198	A	F	N	E	W
199	R	L	S	N	W
200	W	L	N	E	W
201	Y	L	S	N	W
202	R	M	N	E	M
203	A	M	S	E	W
204	Y	W	S	N	M

ES 2 451 266 T3

Fosfolipasa desprendida	E41	N100	N168	N171	M176
205	R	Y	N	N	M
206	Y	M	N	N	M
207	W	M	N	N	W
208	F	F	S	E	M
209	Y	F	S	E	W
210	W	F	S	E	M
211	W	L	S	N	W
212	R	L	N	N	W
213	W	L	N	N	W
214	W	M	S	N	W
215	W	M	S	E	W
216	R	W	N	E	W
217	R	L	N	N	M
218	R	F	N	N	M
219	A	N	N	N	W
220	Y	F	N	E	M
221	W	F	N	N	W
222	R	F	S	E	M
223	F	L	S	N	M
224	F	L	S	E	M
225	A	M	S	E	M
226	A	M	S	N	M
227	R	M	S	E	M
228	R	W	N	N	W
229	A	Y	N	N	M
230	Y	W	N	N	M
231	E	M	N	N	W
232	A	F	S	E	M
233	W	F	N	E	W
234	W	F	S	N	W
235	A	L	S	E	M
236	Y	L	N	E	W
237	F	M	S	E	M
238	W	M	S	E	M

ES 2 451 266 T3

Fosfolipasa desprendida	E41	N100	N168	N171	M176
239	F	M	S	E	W
240	Y	W	S	E	W
241	W	F	N	N	M
242	W	L	N	N	M
243	R	M	N	N	W
244	R	F	N	N	W
245	A	F	N	N	W
246	F	F	N	E	W
247	A	L	N	E	W
248	Y	L	S	N	M
249	F	M	S	N	M
250	Y	M	S	E	M
251	F	M	N	E	M
252	F	W	N	E	W
253	Y	L	N	N	M
254	R	W	N	N	M
255	Y	N	N	N	W
256	R	F	S	N	W
257	A	F	S	N	W
258	A	F	N	E	M
259	A	L	N	N	W
260	A	L	N	E	M
261	R	M	S	E	W
262	W	M	S	N	M
263	R	M	S	N	M
264	A	W	S	N	M
265	R	M	N	N	M
266	F	Y	N	N	M
267	A	M	N	N	W
268	F	F	S	N	M
269	Y	F	N	E	W
270	F	L	N	E	M
271	Y	L	S	E	W
272	F	L	N	N	W

Fosfolipasa desprendida	E41	N100	N168	N171	M176
273	Y	M	S	N	W
274	A	M	N	E	M
275	A	W	N	E	W
276	W	W	S	N	W
277	F	M	N	N	M
278	Y	Y	N	N	M
279	R	N	N	N	W
280	F	F	S	N	W
281	R	F	N	E	W
282	A	L	S	N	M
283	W	L	S	E	W
284	R	L	S	E	M
285	W	M	N	E	M
286	A	M	S	N	W
287	W	W	N	E	M
288	W	W	S	N	M

5 La Tabla 7 resume los resultados de ensayos que analizan diversa actividad enzimática, y el comportamiento del sistema de expresión, de enzimas ejemplares (y en el caso del sistema de expresión de *Pichia pastoris* – la actividad de expresión de los ácidos nucleicos que las codifican), siendo todos los polipéptidos variantes de secuencia de la secuencia de fosfolipasa de partida SEQ ID NO:176 (codificada, por ejemplo, por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO:177). Para ayudar a leer la tabla de la Tabla 7, por ejemplo, en la fila E41A, esta fila caracteriza la enzima ejemplar que tiene SEQ ID NO:176 pero con el “E”, o ácido glutámico (glu) en la posición 41 de aminoácidos, sustituido por un “A”, o alanina (ala); etc.

Tabla 7: ANÁLISIS DE ACTIVIDAD Y SUMARIO

Mutantes GSSM de PLC	# de resto de aminoácido del mutante de GSSM	Cambio de aminoácido GSSM	Ensayo de aceite	Expresión de <i>Pichia pastoris</i>	Actividad Residual Porcentaje de tolerancia térmica	
			% de hidrólisis de PA a 24 h	Actividad en placas de yema de huevo	Proteína expresada en E. coli	Proteína expresada en <i>Pichia pastoris</i>
Aceite bruto			0			
E41E	41	Tipo salvaje	20	Activa	81%	100%
E41A	41	A	29	Activa	83%	99%
E41W	41	w	31	Activa	94%	N/A
E41F	41	F	68	Inactiva	80%	N/A
E41Y	41	Y	69	Inactiva	89%	N/A
E41R	41	R	66	Activa	78%	104%
E94R	94	R	23	Activa	N/A	N/A

ES 2 451 266 T3

Mutantes GSSM de PLC	# de resto de aminoácido del mutante de GSSM	Cambio de aminoácido GSSM	Ensayo de aceite	Expresión de <i>Pichia pastoris</i>	Actividad Residual Porcentaje de tolerancia térmica	
			% de hidrólisis de PA a 24 h	Actividad en placas de yema de huevo	Proteína expresada en E. coli	Proteína expresada en <i>Pichia pastoris</i>
D100L	100	L	45	Activa	N/A	87%
D100M	100	M	48	Activa	N/A	104%
D100Y	100	Y	57	Activa	N/A	105%
D100F	100	F	59	Activa	43%	92%
D100W	100	W	61	Activa	N/A	91%
A104L	104	L	26	Activa	115%	86%
D111R	111	R	27	Activa	N/A	99%
T112R	112	R	23	Activa	107%	92%
Y116W	116	w	23	Activa	118%	102%
I117W	117	W	15	Activa	109%	102%
P118W	118	w	17	Activa	N/A	N/A
E125K	125	K	15	Activa	99%	86%
D171V	171	V	29	Activa	N/A	106%
D171E	171	E	44	Activa	N/A	110%
M176W	176	W	42	Activa	101%	101%
D230H	230	H	21	Activa	N/A	97%
D230R	230	R	14	Activa	107%	104%
D234W	234	W	10	Activa	101%	98%
D234V	234	V	0	Activa	109%	102%
D234G	234	G	3	Activa	109%	114%
D234R	234	R	27	Activa	114%	90%
D234K	234	K	23	Activa	N/A	101%
Q265R	265	R	0	Inactiva	N/A	N/A
E41A NNN	41, 100, 168, 171	A, N, N, N	72		63%	
E41A NKN	41, 100, 168, 171	A, N, K, N	75		65%	
E41A NRN	41, 100, 168, 171	A, N, R, N	79		75%	
E41A NSN	41, 100, 168, 171	A, N, S, N	72		85%	

Ensayo de yema de huevo

ES 2 451 266 T3

El ensayo de yema de huevo se realiza como sigue:

Se preparan placas de agar con yema de huevo añadiendo fosfatidilcolina de yema de huevo al 0,5% (en peso) a medios antes de someter a autoclave. Las placas son más uniformes si la fosfatidilcolina se dispersa con una mezcladora de cizallamiento elevado antes de someter el medio a autoclave.

- 5 Los pocillos se perforan en el agar, y se cargan en los pocillos volúmenes iguales (por ejemplo, 2 ml) de diluciones en serie de muestras, incluyendo control positivo.

Las placas se dejan durante 3-12 horas a 37°C, tiempo durante el cual la enzima se difunde fuera de los pocillos, hidroliza la lecitina de yema de huevo y forma zonas de precipitación debido a la formación de diacilglicerol.

- 10 El área en el anillo de precipitación, medida como diámetro anular o valor de densidad integrado (IDV), se representa gráficamente frente a la curva patrón para el control positivo, para determinar la actividad de la muestra de fosfolipasa. Todo el procedimiento se puede usar para determinar la actividad de PLC desconocida de una muestra. El método es semicuantitativo.

Fosfatidilcolina (PC): de Sigma, número de catálogo P 5394

- 15 PC de yema de huevo seca, tipo X-E, aprox. 60% PC mediante TLC.

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico aislado, sintético o recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico:

(a) que codifica un polipéptido que tiene actividad de fosfolipasa, y

5 (i) que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o 100% de una identidad de secuencia con SEC ID NO:177, y que tiene una mutación que codifica E41W, E41F o E41Y,

(ii) se hibrida en condiciones restrictivas al complemento de un ácido nucleico que comprende SEC ID NO:177, y que tiene una mutación que codifica E41W, E41F, o E41Y,

10 en el que las condiciones restrictivas incluyen una etapa de lavado que comprende un lavado en 0,2X SSC a una temperatura de alrededor de 65°C durante alrededor de 15 minutos;

(b) la secuencia de ácido nucleico de (a) que codifica un polipéptido que tiene actividad de fosfolipasa pero que carece de: una secuencia señal o secuencia proproteínica, o una secuencia promotora homóloga;

15 (c) el ácido nucleico de (a) o (b) que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa y que codifica adicionalmente una secuencia de aminoácidos, o el ácido nucleico de (a) o (b) que comprende una secuencia nucleotídica heteróloga;

(d) el ácido nucleico de (c), en el que la secuencia de aminoácidos heteróloga comprende, o consiste, en una secuencia que codifica una secuencia señal heteróloga, o una etiqueta o un epítipo, o la secuencia nucleotídica heteróloga comprende una secuencia promotora heteróloga;

20 (e) el ácido nucleico aislado, sintético o recombinante de uno cualquiera de (a) a (d), en el que los restos nucleotídicos en un sitio de comienzo transcripcional críptico se modifican para eliminar la mayoría o toda la producción de un transcrito truncado;

(f) el ácido nucleico aislado, sintético o recombinante de (e), en el que las modificaciones de restos nucleotídicos en el sitio de comienzo transcripcional críptico comprenden una alteración en un sitio de unión al ribosoma (RBS); o

25 (g) una secuencia de ácido nucleico completamente complementaria a la secuencia nucleotídica de cualquiera de (a) a (f).

2. El ácido nucleico aislado, sintético o recombinante de la reivindicación 1, en el que el ácido nucleico comprende una o más mutaciones que codifican E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K y/o Q265R o una combinación de las mismas.

3. Un vector, casete de expresión o vehículo de clonación: (a) que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2; o, (b) el vector, casete de expresión o vehículo de clonación de (a) que comprende o contenido en vector vírico, un plásmido, un fago, un fagómido, un cósmido, un fósido, un bacteriófago, un cromosoma artificial, un vector adenovírico, un vector retrovírico o un vector vírico adenoasociado, o un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un plásmido, un vector derivado del bacteriófago P1 (PAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), o un cromosoma artificial de mamífero (MAC).

4. Una célula hospedante o una célula transformada: (a) que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2, o el vector, casete de expresión o vehículo de clonación de la reivindicación 3; o, (b) la célula hospedante o una célula transformada de (a), en el que la célula es una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal.

5. Un animal no humano transgénico: (a) que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2; el vector, casete de expresión o vehículo de clonación de la reivindicación 3; o la célula hospedante o una célula transformada de la reivindicación 4; o (b) el animal no humano transgénico de (a), en el que el animal es un ratón, una rata, una cabra, un conejo, una oveja, un cerdo o una vaca.

45 6. Una planta o semilla transgénica: (a) que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2; el vector, casete de expresión o vehículo de clonación de la reivindicación 3; o la célula hospedante o una célula transformada de la reivindicación 4; (b) la planta transgénica de (a), en el que la planta es una planta de maíz, una planta de sorgo, una planta de patata, una planta de tomate, una planta de trigo, una planta oleaginosa, una planta de colza, una planta de haba de soja, una planta de arroz, una planta de cebada, un pasto, una semilla de algodón, una palma, una planta de sésamo, una planta de cacahuete, una planta de girasol o una planta de tabaco; (c) la semilla transgénica de (a), en el que la semilla transgénica es una semilla de maíz, una pepita de trigo, una semilla oleaginosa, una colza, una semilla de haba de soja, una pepita de palma, una semilla de girasol, una

semilla de sésamo, un arroz, una cebada, un cacahuete, una semilla de algodón, una palma, un cacahuete, una semilla de sésamo, una semilla de girasol, o una semilla de planta de tabaco.

7. Un polipéptido aislado, sintético o recombinante que tiene actividad de fosfolipasa, y:

- 5 (a) que comprende una secuencia de aminoácidos (i) que tiene al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o 100% de identidad de secuencia con SEC ID NO:176, y que tiene al menos una de las mutaciones de aminoácidos de E41W, E41F o E41Y, en el que las identidades de secuencia se pueden determinar mediante análisis con un algoritmo de comparación de secuencias, o mediante inspección visual; o, (ii) codificado por el ácido nucleico de la reivindicación 1;
- 10 (b) que comprende el polipéptido de (a) pero que carece de una secuencia señal o secuencia propeptídica;
- (c) que comprende además una secuencia de aminoácidos heteróloga;
- (d) que comprende el polipéptido de (c), en el que la secuencia de aminoácidos heteróloga comprende, o consiste, en una secuencia señal heteróloga, o una etiqueta o un epítipo;
- 15 (e) (i) que comprende el polipéptido de uno de (a) a (d), en el que el polipéptido está glucosilado, o el polipéptido comprende al menos un sitio de glucosilación, (ii) el polipéptido de (i), en el que la glucosilación es una glucosilación enlazada mediante N o una glucosilación enlazada mediante O; (iii) el polipéptido de (i) o (ii), en el que el polipéptido se glucosila después de ser expresado en una célula de levadura; o (iv) el polipéptido de (iii), en el que la célula de levadura es una *P. pastoris* o una *S. pombe*; o
- 20 (f) el polipéptido de uno cualquiera de (a) a (e), en el que (i) el polipéptido comprende además restos de aminoácidos adicionales entre una secuencia señal y la enzima, o (ii) el polipéptido de (i), en el que los restos de aminoácidos adicionales comprenden Glu-Ala.

8. El polipéptido aislado, sintético o recombinante de la reivindicación 7, en el que el polipéptido comprende una o más mutaciones E94R, D100L, D100M, D100Y, D100F, D100W, A104L, D111R, T112R, Y116W, I117W, P118W, E125K, S168N, D171V, D171E, M176W, D230H, D230R, D234W, D234V, D234G, D234R, D234K y/o Q265R, o una combinación de las mismas.

25

9. El polipéptido aislado, sintético o recombinante de la reivindicación 7, que comprende el aminoácido de SEC ID NO: 176 y que tiene las siguientes mutaciones: E41Y, D100F, S168N, D171N y M176W.

10. Un método para producir un polipéptido recombinante, que comprende:

- 30 (A) (a) proporcionar un ácido nucleico, en el que el ácido nucleico comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2; y (b) expresar el ácido nucleico de la etapa (a) en condiciones que permiten la expresión del polipéptido, produciendo de ese modo un polipéptido recombinante; o
- (B) el método de (A), que comprende además transformar una célula hospedante con el ácido nucleico de la etapa (a), seguido de la expresión del ácido nucleico de la etapa (a), produciendo de ese modo un polipéptido recombinante en una célula transformada.

35 11. Un método para generar una variante de un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de fosfolipasa, que comprende:

- (A)
- (a) proporcionar un ácido nucleico molde que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2; y
- 40 (b) modificar, suprimir o añadir uno o más nucleótidos en la secuencia molde, o una combinación de los mismos, para generar una variante del ácido nucleico molde.
- (B) el método de (A), que comprende además expresar el ácido nucleico variante para generar un polipéptido de fosfolipasa variante;
- 45 (C) el método de cualquiera de (A) o (B), en el que el método se repite iterativamente hasta que se produce una fosfolipasa que tiene una actividad alterada o diferente, o una estabilidad alterada o diferente de la de un polipéptido codificado por el ácido nucleico molde, o se produce una estructura secundaria alterada o diferente de la de un polipéptido codificado por el ácido nucleico molde, o se produce una modificación post-traducciona alterada o diferente de la de un polipéptido codificado por el ácido nucleico molde, o se produce un uso de codones alterado o diferente del de un polipéptido codificado por el ácido nucleico molde;

(D) el método de (A), (B) o (C), en el que el polipéptido de fosfolipasa variante tiene mayor glucosilación en comparación con la fosfolipasa codificada por un ácido nucleico molde; o

(E) el método de (A), (B) o (C), en el que el polipéptido de fosfolipasa variante tiene mayor expresión en comparación con la fosfolipasa codificada por un ácido nucleico molde.

5 12. Un método para modificar codones en un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fosfolipasa, comprendiendo el método:

(a) proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido con actividad de fosfolipasa que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2; y

10 (b) identificar un codón en el ácido nucleico de la etapa (a) y sustituirlo por un codón diferente que codifica el mismo aminoácido que el codón sustituido, modificando de ese modo codones en un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa.

13. Un método para hidrolizar, romper, licuar o disgregar una composición que comprende fosfolípidos, que comprende:

(A)

15 (a) proporcionar el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, o el polipéptido que tiene actividad de fosfolipasa codificado por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2;

(b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido; y

20 (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) en condiciones en las que el polipéptido hidroliza, rompe, licua o disgrega la composición que comprende fosfolípidos.

(B) el método de (A), en el que la composición comprende una bicapa lipídica o membrana que comprende fosfolípido; o

(C) el método de cualquiera de (A) o (B), en el que la composición comprende una célula vegetal, una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto, o una célula de animal.

25 14. Una composición o un producto de fabricación (a) que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, o el polipéptido que tiene actividad de fosfolipasa codificado por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2, (b) la composición de (a), en la que la composición una sustancia farmacéutica, un detergente, una biomasa, un biocombustible, un producto a base de petróleo, un soluble desecado de destilería (DDS), un grano desecado de destilería (DDG), un soluble de destilería condensado (CDS), un grano húmedo de destilería (DWG), o un grano desecado de destilería con solubles (DDGS).

30

15. Un método para desgomar un aceite o una grasa, que comprende:

(A)

35 (a) proporcionar un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, o el polipéptido que tiene actividad de fosfolipasa codificado por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2;

(b) proporcionar una composición que comprende una grasa o un aceite; y

(c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) y la composición de la etapa (b);

40 (B) el método de (A), en el que el polipéptido (a) está unido a un filtro, y la grasa o aceite se hace pasar a través del filtro; o (b) se añade a una disolución que comprende la grasa o aceite, y después la disolución se hace pasar a través de un filtro;

(C) el método de (A) o (B), en el que el polipéptido incrementa (a) la cantidad de aceites neutros en la composición tratada que comprende una grasa o aceite; o (b) la producción de diacilglicerol (DAG), para contribuir a la fase oleosa, o en el que el producto de aceite desgomado final está enriquecido en 1,3-DAG, o en el que el producto de grasa o aceite desgomado final comprende no menos de 1,0% de 1,3-DAG;

45 (D) el método de cualquiera de (A) a (C), que comprende además la adición de uno o más polipéptidos que tienen una proteasa, una amilasa, una lipasa, una cutinasa, otra fosfolipasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasas, una oxidasa, por ejemplo una lactasa, y/o una peroxidasa, o polipéptidos con actividad equivalente, o una combinación de las mismas, para romper adicionalmente la masa de goma y potenciar los rendimientos de aceite; o

(E) el método de cualquiera de (A) a (D), que comprende además la eliminación física de la goma producida por el método de desgomado mediante adición de una sustancia endurecedora, en el que la sustancia endurecedora es o comprende un talco.

16. Un procedimiento según la reivindicación 15, que comprende

5 (F) el método de (A) en el que, en la etapa (c), el polipéptido de la etapa (a) y la composición de la etapa (b) se ponen en contacto en condiciones en las que el polipéptido puede catalizar la hidrólisis de un fosfolípido en la composición durante un tiempo suficiente para reducir la masa de goma e incrementar los aceites neutros; or

10 (G) el método de (F), que comprende usar mezclamiento de cizallamiento elevado de la composición, seguido del mezclamiento sin cizallamiento o con poco cizallamiento con el polipéptido de (a) para permitir la puesta en contacto adecuada del fosfolípidos con el polipéptido.

17. Un método para convertir un fosfolípido no hidratable en una forma hidratable, que comprende:

(a) proporcionar un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, o el polipéptido que tiene actividad de fosfolipasa codificado por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2;

15 (b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido no hidratable; y

(c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) y la composición de la etapa (b) en condiciones en las que el polipéptido convierte el fosfolípido no hidratable en una forma hidratable.

18. Un método para refinar un aceite o grasa, que comprende:

(A)

20 (a) proporcionar un polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, o el polipéptido que tiene actividad de fosfolipasa codificado por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2;

(b) proporcionar una composición que comprende un aceite o una grasa; y

(c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b);

25 (B) el método de (A), en el que el refinado es un refinado físico;

(C) el método de (A), en el que el refinado es un refinado caústico;

(D) el método de (A), (B), o (C), en el que la composición de (b) se añade antes, durante o después del refinado;

30 (E) el método de cualquiera de (A) a (D), que comprende la adición de un ácido, una sustancia cáustica, un emulsionante o un desemulsionante;

(F) el método de cualquiera de (A) a (E), en el que el polipéptido se añade (a) durante el refinado caústico, y se añaden niveles variables de ácido o sustancia cáustica, dependiendo de los niveles de fósforo y de los niveles de ácidos grasos libres; (b) tras el refinado caústico: en una mezcladora intensa o mezcladora de retención antes de la separación; tras una etapa de calentamiento; en una centrifugadora; en una materia prima para jabón; en un agua de lavado; o durante las etapas de blanqueamiento o desodorización; (c) durante la trituración de una semilla u otra parte de la planta, o el polipéptido se añade tras la trituración o antes del refinado; o

(G) el método de cualquiera de (A) a (F), en el que el polipéptido es una disolución acuosa que se añade a la composición, en el que opcionalmente el nivel de agua está entre alrededor de 0,5 y 5%;

40 (H) el método de cualquiera de (A) a (G), que comprende la adición de calor o enfriamiento para promover la separación de una fase acuosa; o

(I) el método de cualquiera de (A) a (H), que comprende desgomar antes de la etapa de puesta en contacto, para recoger lecitina mediante lecitina mediante centrifugación, y después añadir una PLC, una PLC y/o una PLA para eliminar fosfolípidos no hidratables.

45 19. Un método para desacilar una cadena de ácido graso 2' o 3' de un lípido A, que comprende poner en contacto el lípido A con el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, o el polipéptido que tiene actividad de fosfolipasa codificado por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2.

20. Un método para obtener un biocombustible, que comprende:

(A)

(a) proporcionar el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, o el polipéptido que tiene actividad de fosfolipasa codificado por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1 o reivindicación 2;

5

(b) proporcionar una composición de biomasa;

(c) poner en contacto el polipéptido de (a) con la composición de biomasa de (b);

(B) el método de (A), en el que el biocombustible es o comprende un biodiésel; o

10

(C) el método de (A) o (B), en el que la composición de biomasa comprende un alga, un aceite vegetal, un aceite vegetal puro, un aceite vegetal virgen, un aceite vegetal residual, una grasa animal, una grasa, un sebo, una manteca o una grasa amarilla.

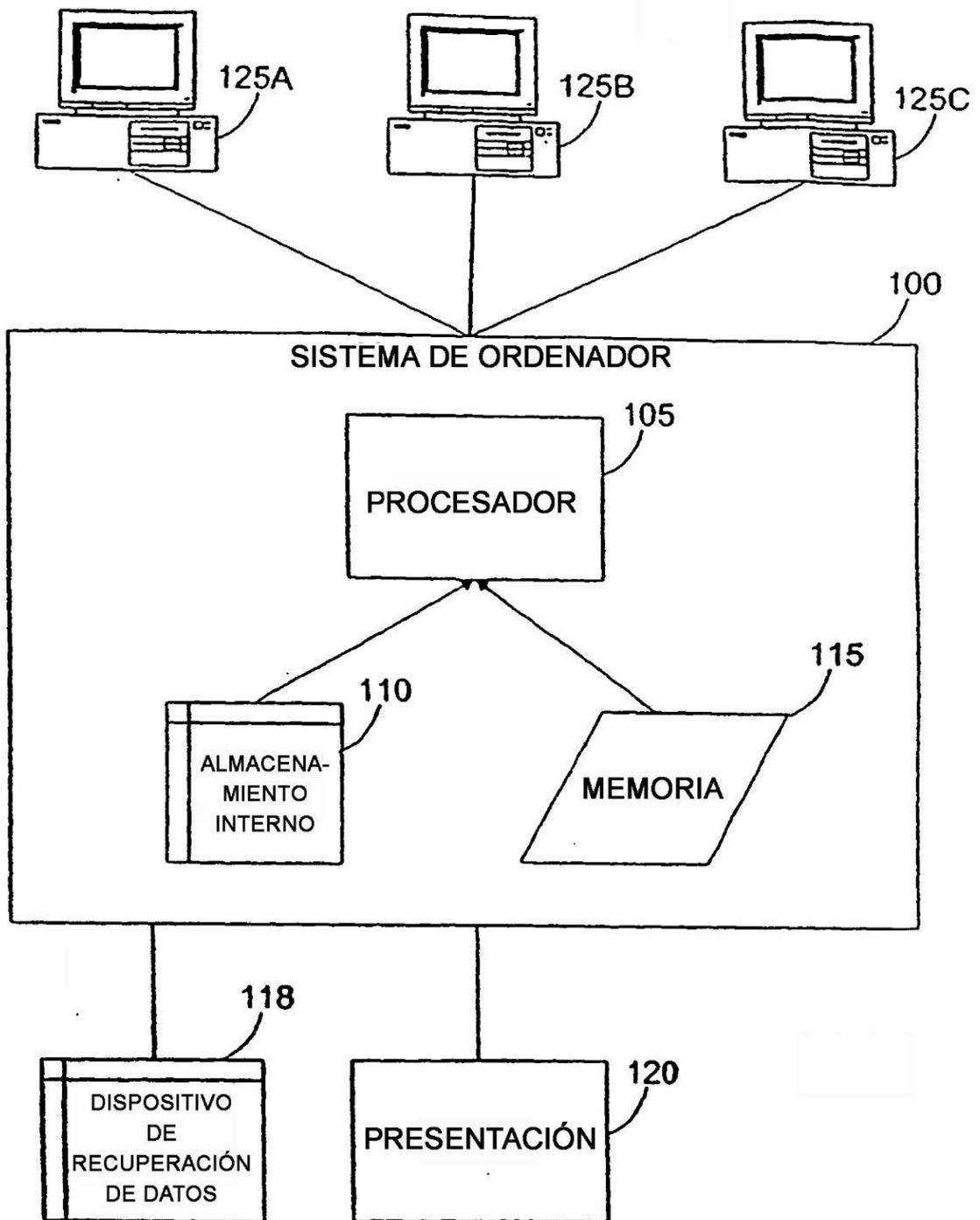


FIGURA 1

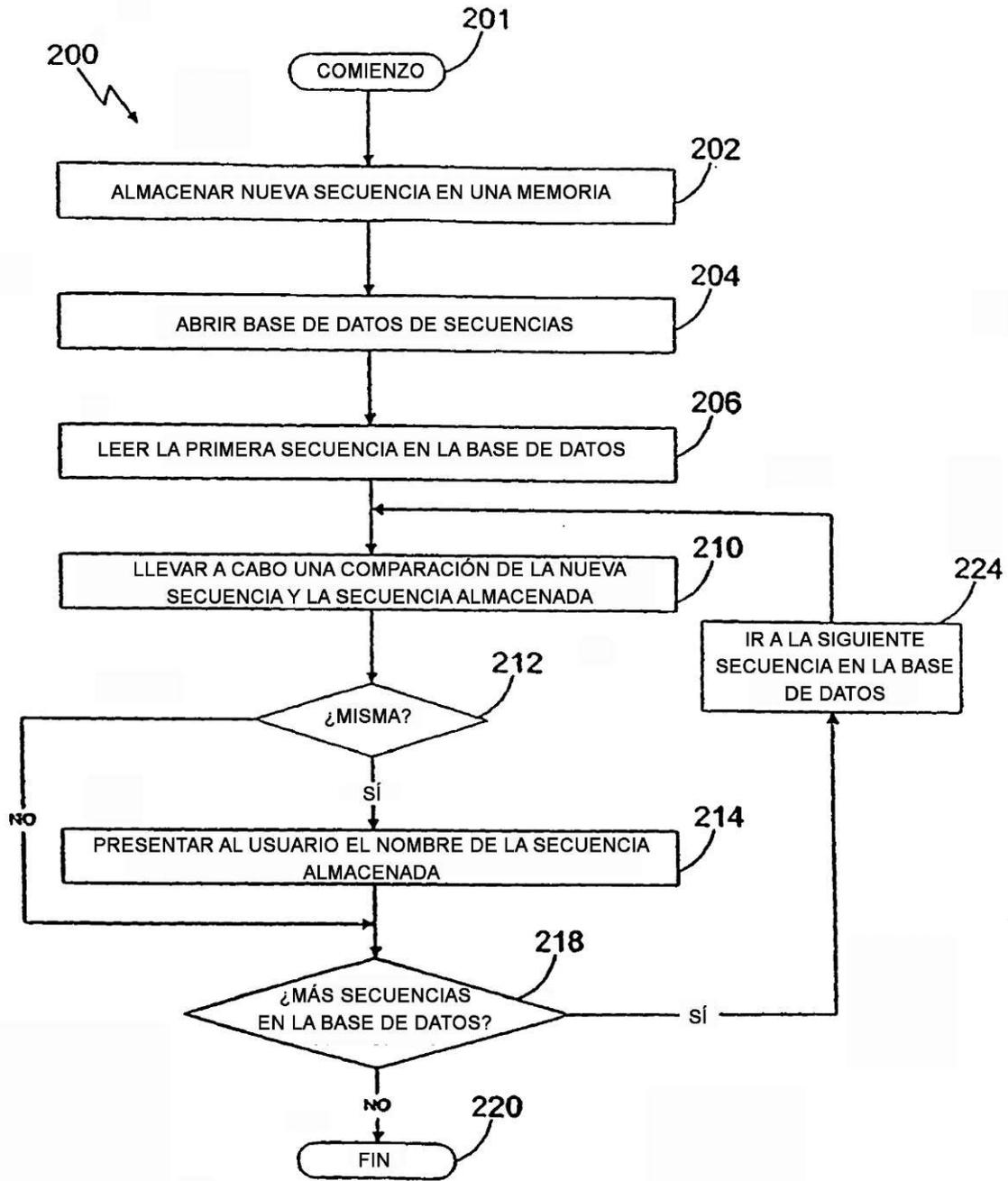


FIGURA 2

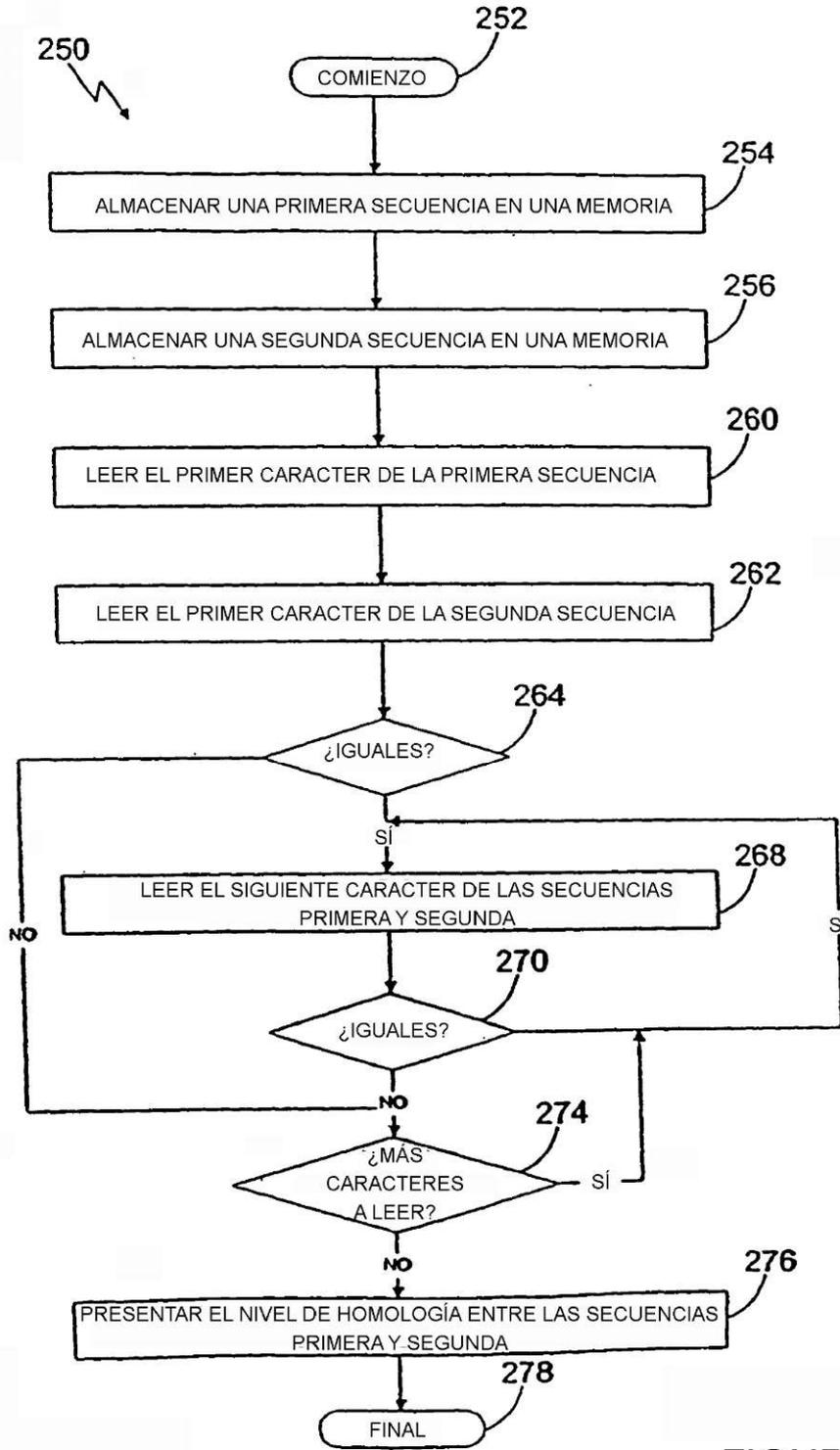


FIGURA 3

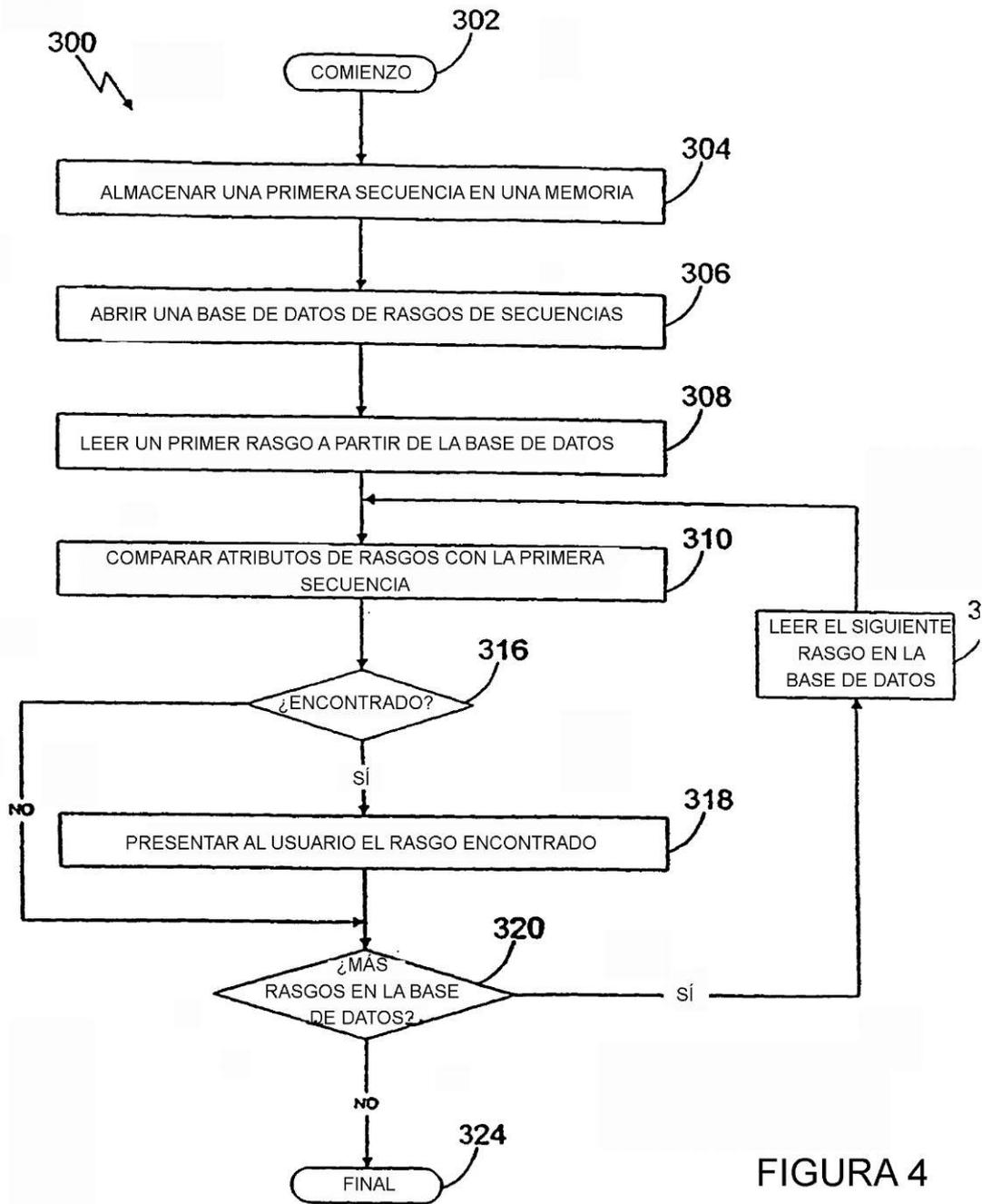


FIGURA 4

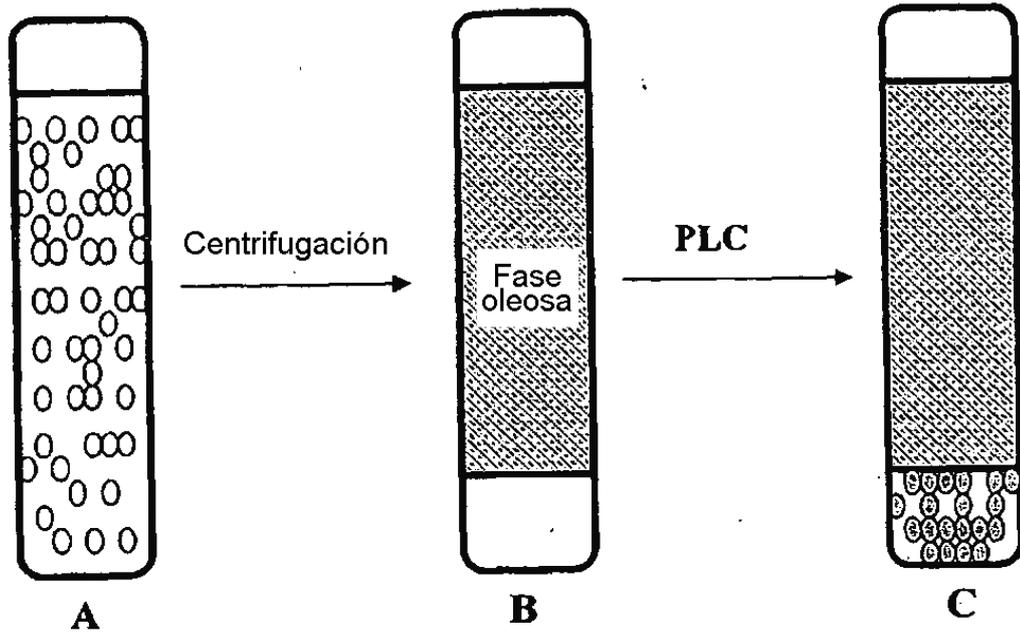


Figura 5

FIGURA 6

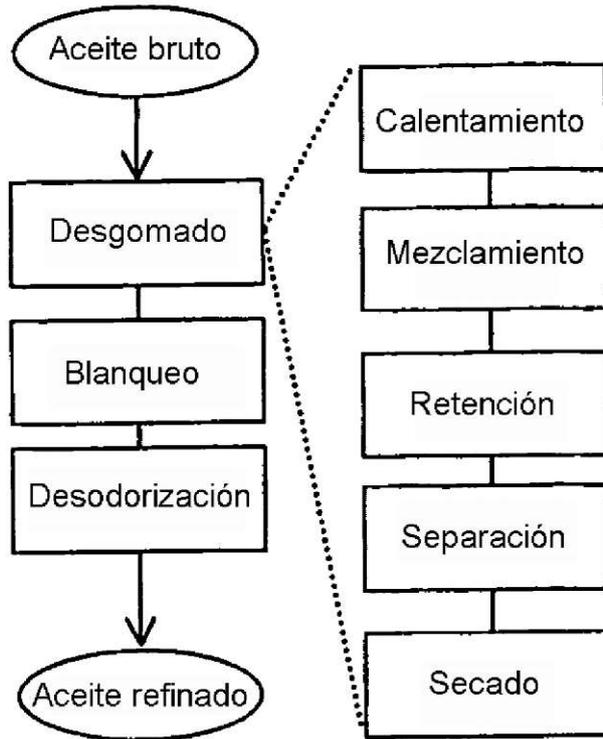


FIGURA 7

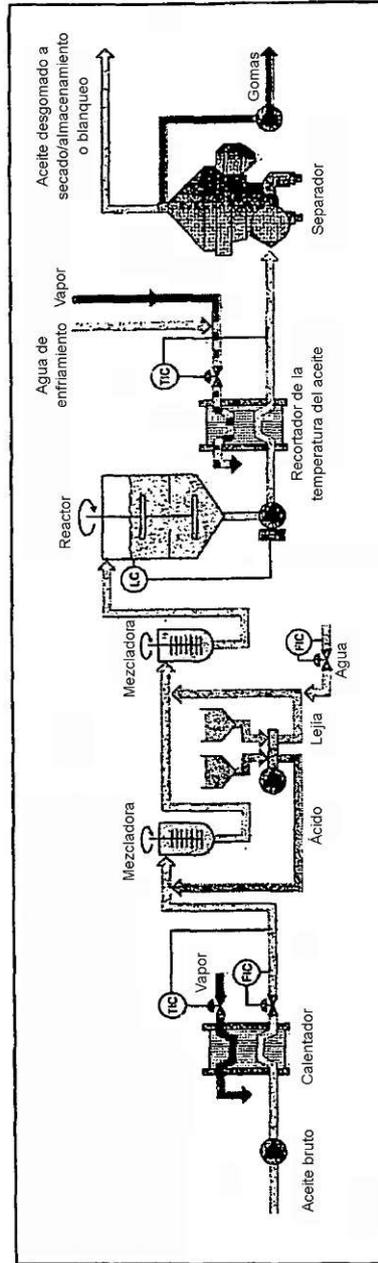


FIGURA 8

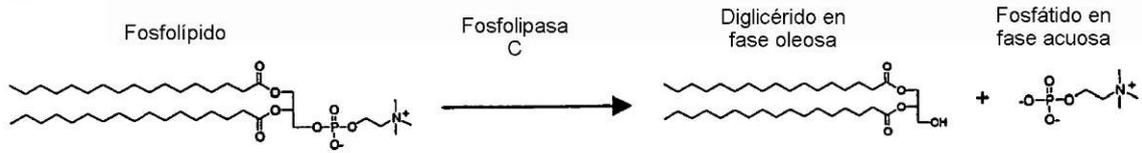


FIGURA 9

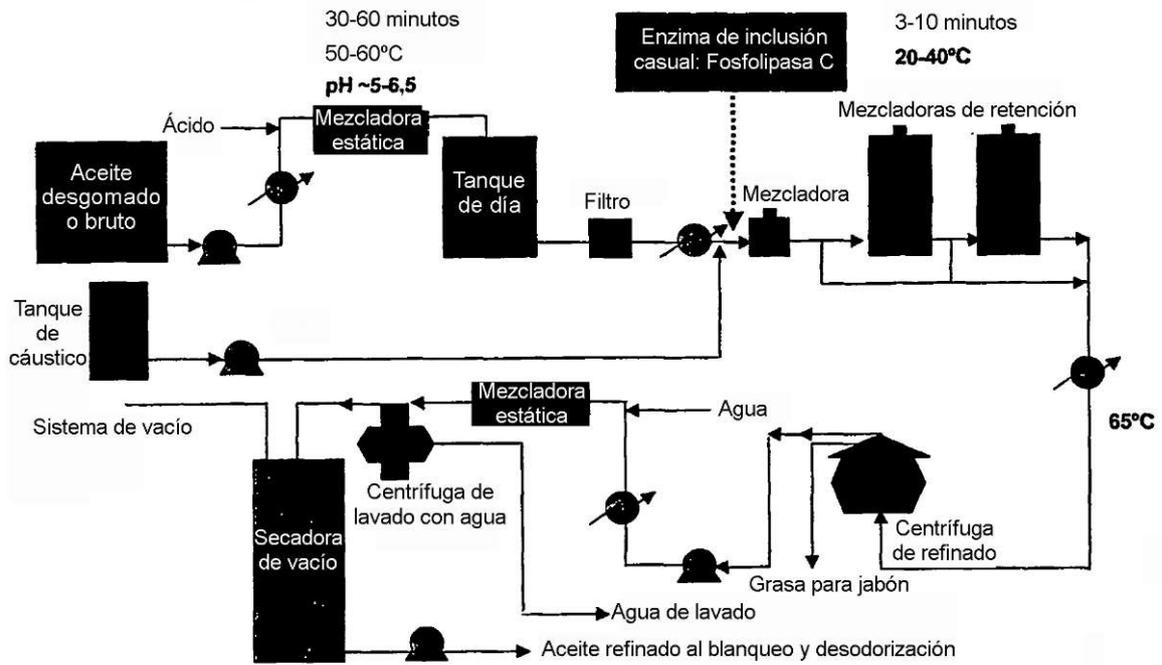
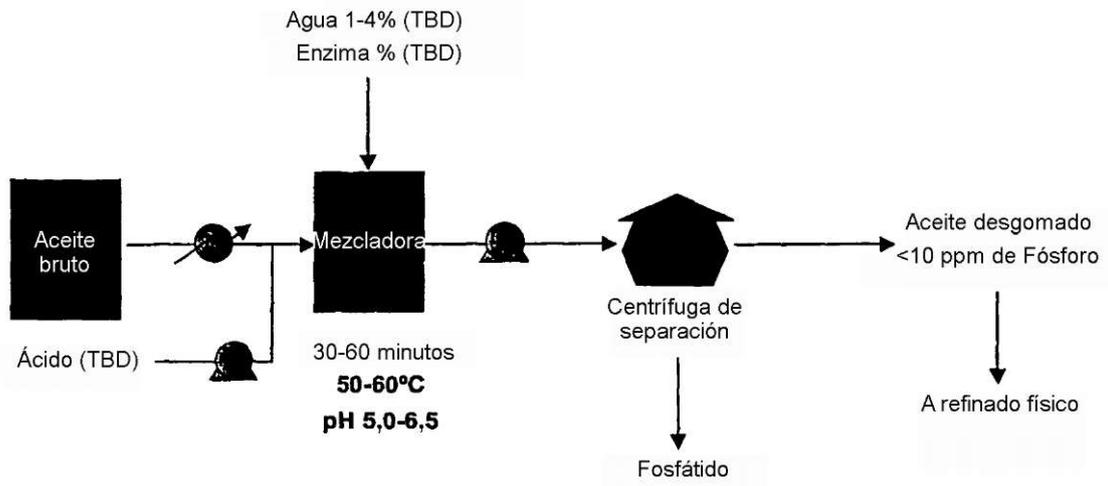


FIGURA 10



SEC ID	RESULTADO PÚBLICO MÁS ELEVADO	EVALOR PÚBLICO	DEFINICIÓN PÚBLICA	ORGANISMO PÚBLICO	NUMERO EC PÚBLICO	%ID PROTEINA PÚBLICA	%ID NUCLEÓTIDO PÚBLICO	LONGITUD DE SECUENCIA DIVERSA	LONGITUD DE SECUENCIA PÚBLICA
1,2	gj 2815227 emb CAA76148.1	e-94	Fosfolipasa C que degrada fosfatidilo	<i>Bacillus thuringiensis</i>	N/A	80.5	79.3	287	283
3,4	gj 2815227 emb CAA76148.1	e-94	Fosfolipasa C que degrada fosfatidilo	<i>Bacillus thuringiensis</i>	N/A	77.3	77	283	283
5,6	gj 130081 spP09598	e-134	Fosfolipasa C que degrada fosfatidilo	<i>Bacillus cereus</i>	N/A	77	76	280	272
7,8	gj 3044072 gb AAC 13276.1	e-97	Beta-hemolisina	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	N/A	54	33	330	329

FIGURA 11A

SEC ID NO:	Definición Genbank	Organismo	Número EC	Número de Proteína Gi	Evalor NR	Número de ADN Gi	Longitud de ADN	Longitud de proteína	Longitud de ADN público	Longitud de proteína pública	%ID Pública de Proteína
9, 10	beta-hemolisina - Staphylococcus aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.4.3	97786	9E-34	14647263	999	332	993	331	32
11, 12			3.4.21-	23474722	3E-52	14276066	1041	346	N/A	339	38
13, 14			3.4.21.-	23474722	7E-55	14530226	1038	345	N/A	339	38
15, 16	Proteína hipotética [Pseudomonas aeruginosa PA01]	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA01		15598123	1E-102	9949021	1344	447	1329	443	46
17, 18			3.1.1.4	23127917	4E-24	14670061	1137	378	N/A	391	29
19, 20				27367835	0	3746408	1248	415	N/A	417	72
21,22	fosfolipasa C [Aeromonas hydrophila]	<i>Aeromonas hydrophila</i>		3746953	1E-169	3746952	1716	571	1716	572	53
23, 24	proteína hipotética conservada [Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 33913]			21232725	2E-51	4753846	1473	490	1344	448	31
25, 26			3.4.21.-	23474722	4E-50	13938818	1098	365	N/A	339	36
27,28				23474722	4E-26	13173617	1287	428	N/A	339	27
29, 30	proteína hipotética conservada [Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 33913]			21233052	0.00007	14589793	753	250	1311	437	20
31,32	fosfolipasa C (EC 3.1.4.3) precursora - Bacillus cereus	<i>Bacillus cereus</i>	3.1.4.3	2126777	2E-48	11558558	1422	473	1776	592	32

FIGURA 11B

33, 34	proteína hipotética [Xanthomonas campestris]	Xanthomonas campestris		6689533	1E-18	1160468	792	263	855	285	30
35, 36	Secuencia 2 de documento US 5824864 parental			5972806	5E-14	2723462	1389	462	1230	410	20
37, 38	Fosfolipasa C [Aeromonas hydrophila]	Aeromonas hydrophila		3746953	1E-149	3746952	1329	443	1716	572	59
39, 40	proteína hipotética conservada [Pseudomonas aeruginosa PA01]	Pseudomonas aeruginosa PA01		15598123	1E-106	9949021	1335	444	1329	443	49
41, 42	proteína hipotética conservada [Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306]	Xanthomonas axonopodis pv. citri str. 306		21241345	2E-63	3885908	1419	472	1320	440	35
43, 44				23474722	4E-26	13529454	1287	428	N/A	339	27
45, 46			3.4.21.-	23474722	4E-55	14530226	1038	345	N/A	339	38
47, 48	proteína hipotética [Nostoc sp. PCC 7120]	Nostoc sp. PCC 7120		17230632	6E-25	6322016	1476	491	1365	455	23
49, 50				27367835	1E-166	10998526	1257	418	N/A	417	65
51, 52	proteína hipotética conservada [Xanthomonas campestris pv. campestris str. ATCC 33913]			21232725	2E-50	13122711	1482	493	1344	448	30
53, 54	proteína hipotética [Pseudomonas aeruginosa PA01]	Pseudomonas aeruginosa PA01		15598123	1E-16	13928640	1491	496	1329	443	22
55, 56			3.4.21.-	23474722	2E-53	8896126	1041	346	N/A	339	39

FIGURA 11C

57, 58	proteína hipotética (<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PA01)	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PA01		15598123	1E-18	3337392	1413	470	1329	443	22
59, 60			3.4.21.-	23474722	9E-56	14280415	1038	345	N/A	339	39
61, 62	lectinasa [<i>Vibrio</i> <i>mimicus</i>]			3746409	0	3746408	1257	418	1410	470	77
63,64				27367835	1E-173	3746408	1242	413	N/A	417	67
65, 66			3.1.1.4	23041851	3E-19	14993667	1164	387	N/A	337	32
67,68	proteína hipotética [<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PA01]	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PA01		15598123	9E-25	13880526	1419	472	1329	443	26
69, 70			3.4.21.-	23474722	9E-56	14530226	1038	345	N/A	339	38
71, 72	quitinasa (EC 3.2.1.14)A- <i>Pseudoalteromonas</i> sp. (cepa S9)	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	3.2.1.14	7521919	2E-28	7340814	3264	1088	3162	1054	11
73, 74	proteína hipotética conservada [<i>Xanthomonas</i> <i>campestris</i> pv. <i>campestris</i> str. ATCC 33913]			21233052	0.00007	14589793	753	250	1311	437	20
75, 76	proteína hipotética [<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PA01]	<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PA01		15598123	1E-22	13157620	1335	444	1329	443	21
77, 78			3.4.21.-	23474722	4E-52	14550312	1026	341	N/A	339	36
79, 80	fosfolipasa C [<i>Aeromonas hydrophila</i>]	<i>Aeromonas</i> <i>hydrophila</i>		3746953	1E-168	15022386	1701	566	1716	572	52

FIGURA 11D

81,82	FOSFOLIPASA C PRECURSORA (PLC) (FOSFATIDILCOLINA COLINAFOSFOHIDROLASA) (CEREOLISINA A)	<i>Bacillus cereus</i>	3.1.4.3	130081	1E-49	8570206	1422	473	849	283	26
83, 84	hemolisina [<i>Vibrio harveyi</i>]	<i>Vibrio harveyi</i>		10998525	5E-61	10716598	1290	429	1254	418	33
85, 86			3.4.21.-	23474722	1E-55	14530226	1038	345	N/A	339	38
87, 88			3.4.21.-	23041851	3E-12	11121040	870	289	N/A	337	28
89, 90	FOSFOLIPASA C PRECURSORA (PLC) (FOSFATIDILCOLINA COLINAFOSFOHIDROLASA) (CEREOLISINA A)	<i>Bacillus cereus</i>	3.1.4.3	130081	1E-49	8570206	1422	473	849	283	26
91,92			3.4.21.-	23474722	4E-54	3947685	1035	344	N/A	339	38
93, 94	beta-hemolisina - <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	3.1.4.3	97786	6E-95	3044071	963	320	993	331	54
95, 96			3.4.21.-	23474722	2E-52	13518253	1038	345	N/A	339	38
97, 98	fosfolipasa C (EC 3.1.4.3) precursora - <i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	3.1.4.3	2126777	2E-49	3766134	1422	473	1776	592	32
99, 100			3.1.1.4	23129073	4E-43	7544033	1053	350	N/A	698	34
101, 102			3.1.4.3	27466926	3E-73	5802872	996	331	N/A	334	45
103, 104	Y4ii [<i>Rhizobium</i> sp. NGR234]	<i>Rhizobium</i> sp. NGR234		16519782	3E-07	6755291	2205	734	2109	703	15
105, 106	Proteína relacionada con fosfolipasa C [<i>Clostridium</i> <i>acetobutylicum</i>]	<i>Clostridium</i> <i>acetobutylicum</i>		15894306	0.005	2182412	756	251	735	245	18

FIGURA 11E

SEC ID NO:	Descripción NR	Código de Acceso NR	E-valor NR	Organismo NR	Descripción de Proteína de Geneseq	Código de Acceso de Proteína de Geneseq	Valor de Proteína de Geneseq	Descripción de ADN de Geneseq	Código de Acceso de ADN de Geneseq	Valor de ADN de Geneseq	Nº EC Predicho	Longitud de ADN de Consulta	Longitud de Proteína de Consulta	Longitud de ADN de Geneseq o NR	Longitud de Proteína de Geneseq o NR	%ID de Proteína de Geneseq o NR	%ID de ADN de Geneseq o NR
107,108	1- fosfatidilinositol fosfodiesterasa precursora [Bacillus cereus]	30021654	0	ATCC 14579	Listeria monocytogenes	ABB47680	3E-18	Arabidopsis yellow stripe1-like 4	ABN85766	0.25	3.1.4.10	990	329	990	329	92	91
109,110	1- fosfatidilinositol fosfodiesterasa precursora [Bacillus cereus]	30021854	0	ATCC 14579	Listeria monocytogenes	ABB47680	6E-18	Arabidopsis yellow stripe1-like 4	ABN85766	0.25	3.1.4.10	990	329	990	329	92	92

FIGURA 11F

111, 112	fosfolipasa específica de fosfatidilinositol [Listeria seeligeri]	C2231002	8E-25	Listeria seeligeri monocytes #849.	ABB476802E-24	Secuencia#13 de humano aumentó en CC-RCC no agresivo	ABX744673.2	3.1.4.10828	275	963	320	31	42
113, 114	1-fosfatidilinositol fosfodiesterasa precursora [Bacillus cereus ATCC 14579]	300218541E-180	1E-180	Bacillus cereus ATCC 14579	ABB476808E-18	Arabidopsis yellow stripe-like 4 SEQ ID NO 10.	ABN857660.24	3.1.4.10981	326	990	329	92	92
115, 116	1-fosfatidilinositol fosfodiesterasa precursora [Bacillus cereus ATCC 14579]	300218541E-178	1E-178	Bacillus cereus ATCC 14579	ABB476802E-16	Secuencia de ADN relacionada con apoptosis murina	ABL013580.97	3.1.4.10987	328	990	329	89	90

FIGURA 11G

117, 118	1- fosfatidilinositol fosfoliesterasa precursora [Bacillus cereus ATCC 14579]	300218541E-179	Bacillus cereus ATCC 14579	Listeria monocytogenes proteina #849.	ABB476808E-16	Sonda de receptor central de cannabinoides humano, SEC ID NO:9.	47.08ABZ570170.97	3.1.4.10987	328	990	329	90	91
119, 120	1- fosfatidilinositol fosfoliesterasa precursora [Bacillus cereus ATCC 14579]	300218541E-178	Bacillus cereus ATCC 14579	Listeria monocytogenes proteina #849.	ABB476808E-16	Secuencia de ADN #201 relacionada con apoptosis murina	ABL013580.97	3.1.4.10987	328	990	329	89	90

FIGURA 11H

121, 122	1- fosfatidilinositol fosfoliesterasa precursora [Bacillus cereus ATCC 14579]	300218540	Bacillus cereus ATCC 14579	Listeria monocytogenes proteína #849.	ABB476803E-17	Arabidopsis yellow stripel-like 4 SEC ID NO 10.	0.016	3.1.4.10990	329	990	329	329	92	92
123, 124	Fosfolipasa [Bacillus cereus ATCC 14579]	C300188521E-137	Bacillus cereus ATCC 14579	Listeria monocytogenes proteína #849.	ABB476761E-49	SEC ID:505 Secuencia nucleotídica de antígeno asociado a cáncer de próstata humano	0.053	3.1.4.3	282	283	282	283	81	81
125, 126	Y4ii [Rhizobium sp. NGR234]	165197821E-69	Rhizobium sp. NGR23 4	ADN codifica nueva proteína de diagnóstico humana #20574.	ABG079330.045	Gen de M. capsulatus #766 para chip de ADN.	0.43	1710	569	2112	703	703	34	54

FIGURA 111

127. proteína 128 hipotética conservada [Porphyromonas gingivalis W83]	345414872E- 96	Porphyromonas gingivalis W83	Mycobacterium tuberculosis proteína 10.	ABJ04710	2E-14	Secuencia de ADNc NS humana SEC ID NO:76.	ABL398051	34.21. 1038	345	339	52
129. fosfolipasa C (EC 3.1.4.3) precursora Bacillus cereus.	2E- 50	Bacillus cereus	Listeria monocytogenes proteína #849.	ABB476762E-34	2E-34	SPTM polinucleótido secretor humano SEC ID NO 534.	ABZ359580.36	3.1.4.31434	477	592	31
131. alérgeno de látex de Hevea brasiliensis [Chromobacterium violaceum ATCC 12472]	344958964E- 51	Chromobacterium violaceum ATCC 12472	Arabidopsis thaliana fragmento de proteína SEC ID NO:76191.	AAG427874E-22	4E-22	Arabidopsis thaliana fragmento de proteína SEC ID NO:76191.	AAC424050.05883.1.1.4927	3.1.4.31434	308	322	37

FIGURA 11J

133, proteína 134 hipotética conservada [Porphyromonas gingivalis W83]	345414871E- 90	Porphyromonas gingivalis W83	Mycobacterium tuberculosis proteína 10.	ABJ04710	2E-20				3.4.21. 1053	350	339	50	
135, Y4ii [Rhizobium 136 sp. NGR234]	165197821E- 69	Rhizobium sp. NGR234	ADN que codifica nueva proteína de diagnóstico humana #20574.	ABG07933	1.5	AAS51470	1.7		1710	569	703	33	54

FIGURA 11K

137, proteína 138 hipotética conservada [Porphyromonas gingivalis W83]	34541487E- 97	Porphyromonas gingivalis W83	Mycobacterium tuberculosis proteína 10.	ABJ047102E-13	Secuencia de ADNc NS humana SEC ID NO:76.	ABL398051	3.4.21.	1038	345	339	53	
139, fosfolipasa C 140 [Aeromonas hydrophila].	3746953 1E- 180	Aeromonas hydrophila	Cebador de PCR para secuencia codificante de proteína de unión de topoisomerasa II.	AA031833.2	Oligonucleotido analizador de metilación del gen de angiotensina #2.	AAD283916.6		1692	563	572	53	58

FIGURA 11L

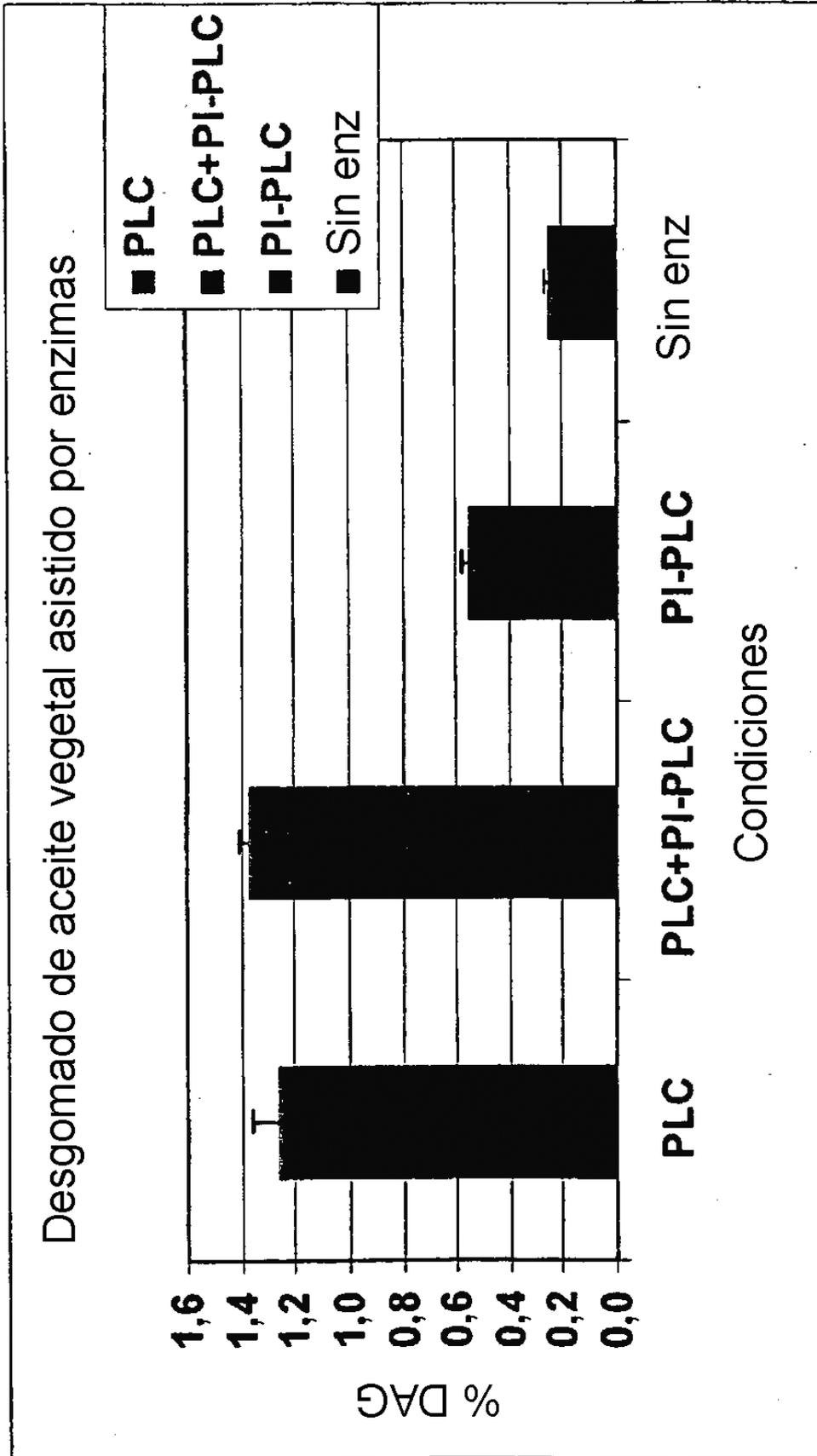


Figura 12

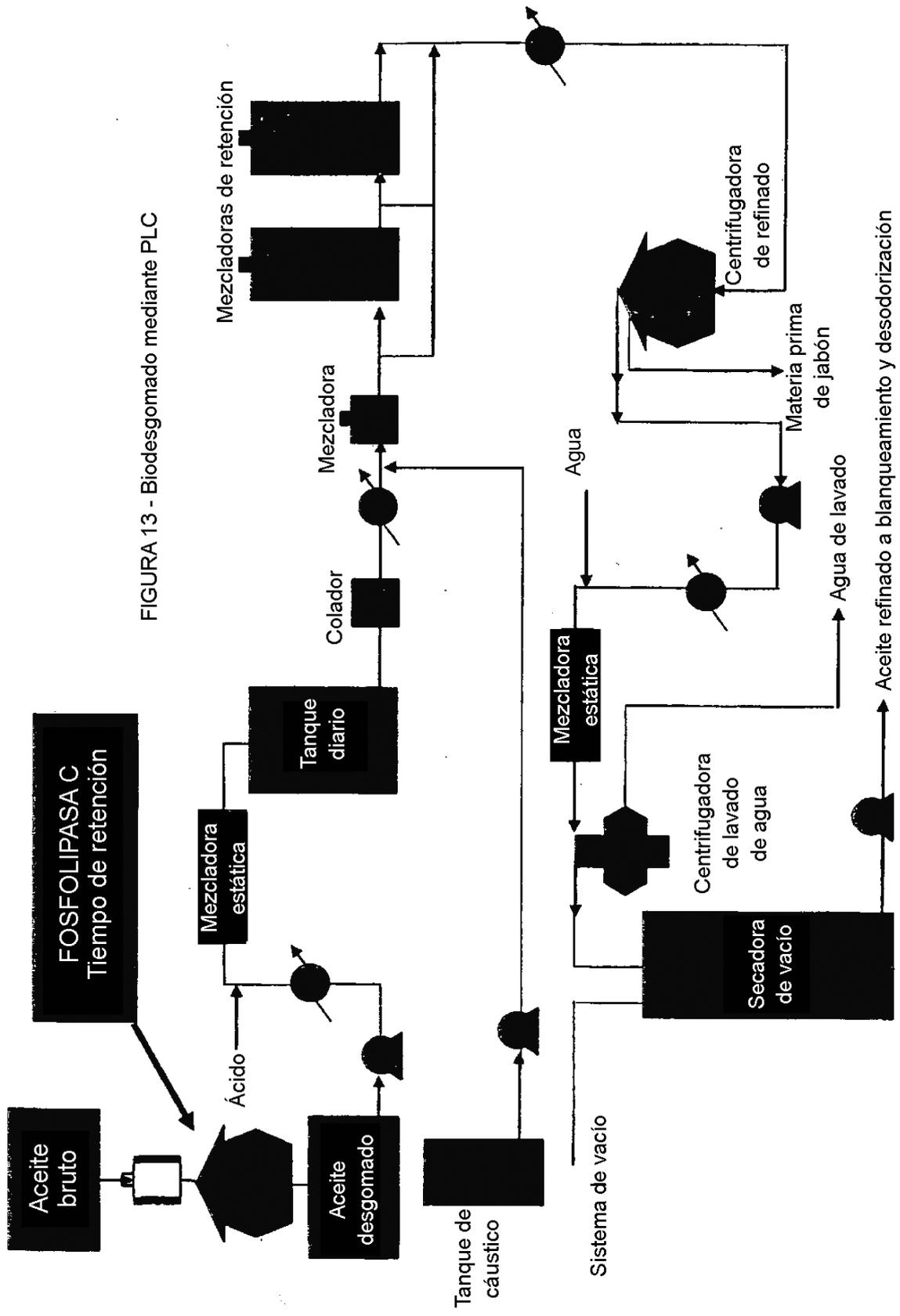


FIGURA 13 - Biodesgomado mediante PLC



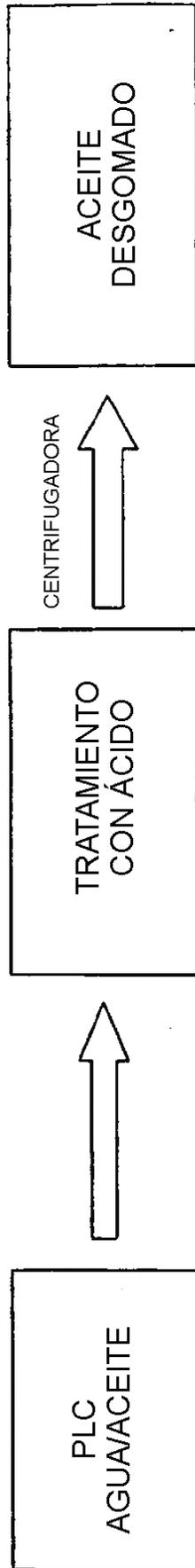
(Soja bruta): procedimiento de 2 etapas de centrifugación

FIGURA 14



(Soja bruta): procedimiento de 3 etapas de centrifugación

FIGURA 15



(Aceite de soja bruto) procedimiento de etapa de centrifugación con tratamiento con ácido

FIGURA 16

EXPOSICIÓN A PLC: *Pichia* SN; 37 °C; pH 5,2, 6 H

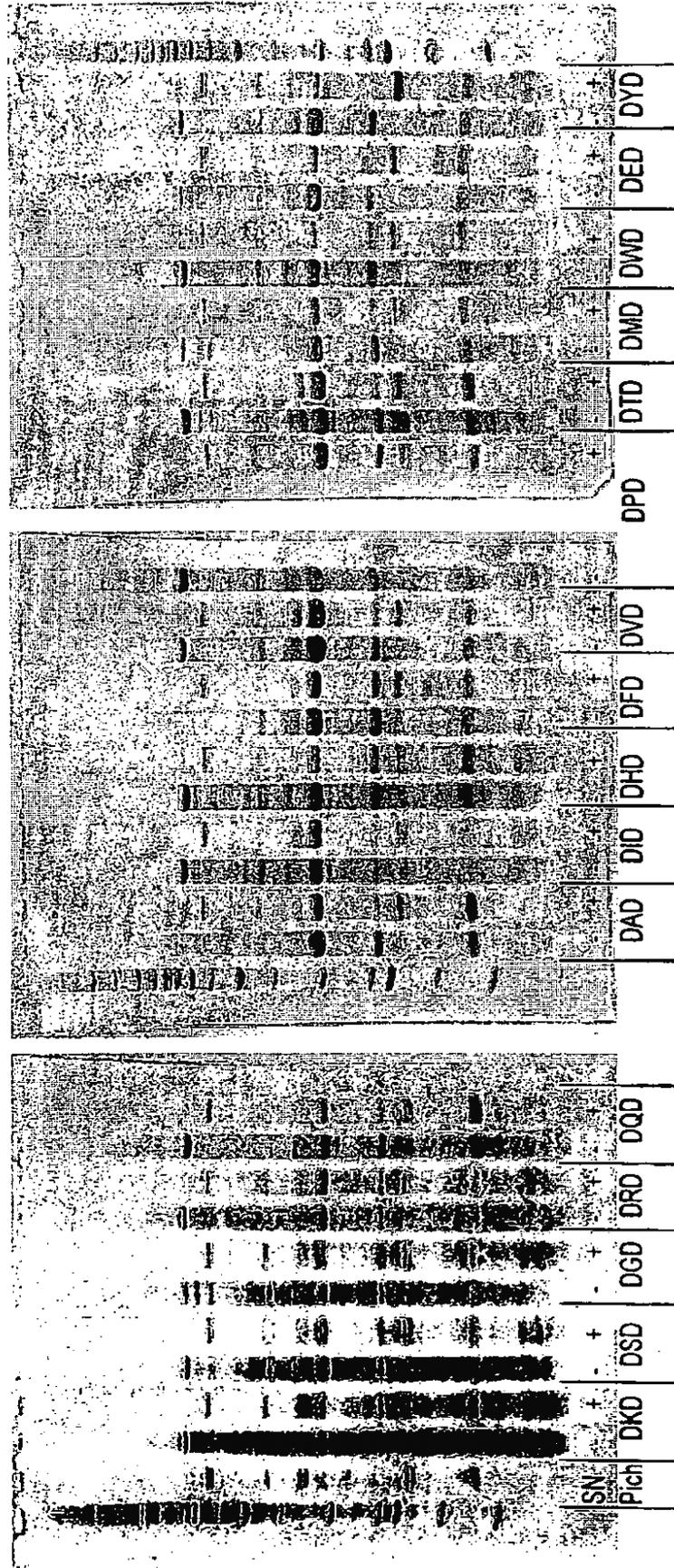


FIGURA 17A

EXPOSICIÓN A PLC: *Pichia* SN; 37 °C; pH 6,2 y 5,2, 22 H

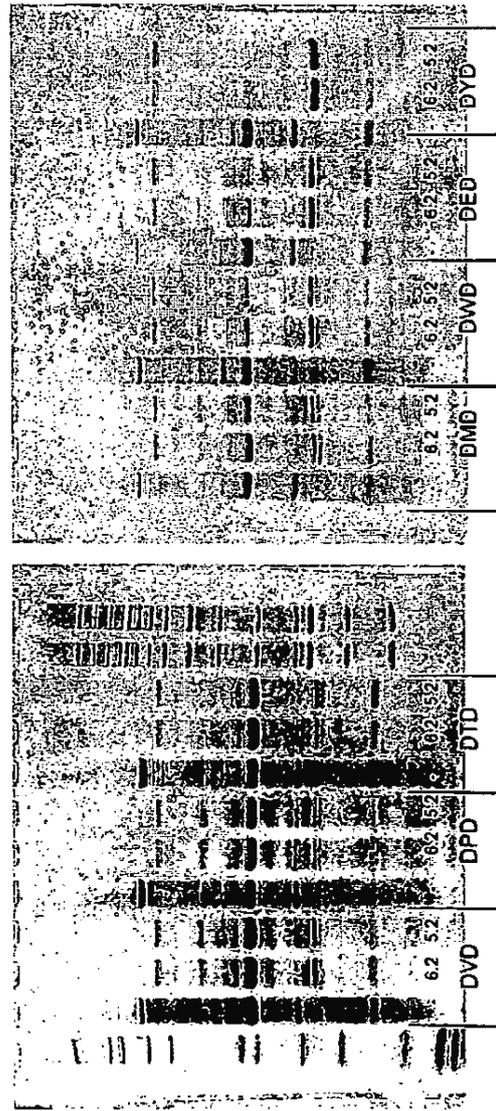
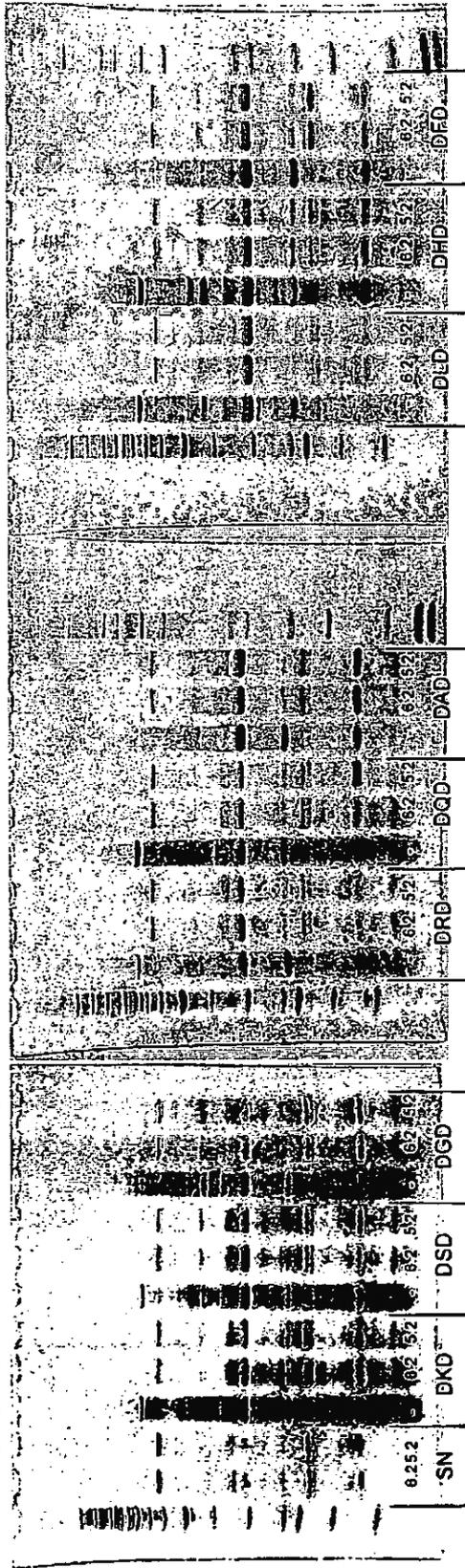


FIGURA 17B

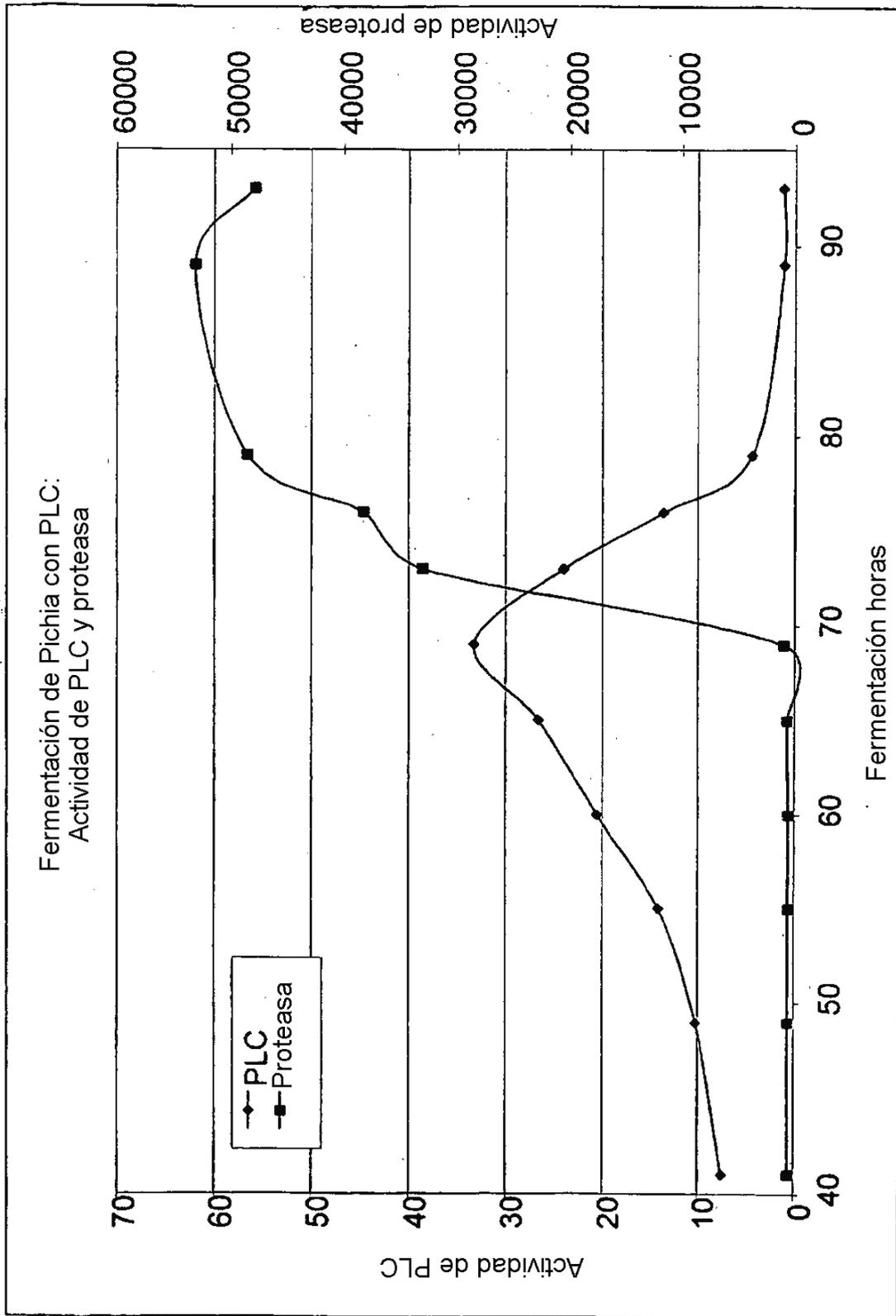


FIGURA 18

Comparación del perfil de OUR en cultivos *P.pastoris* Mut-s 30-L que producen PLC-DSD

(T = 30°C, 2 vvm, 1 bar, pH 6,2, coalimentación de glicerol)

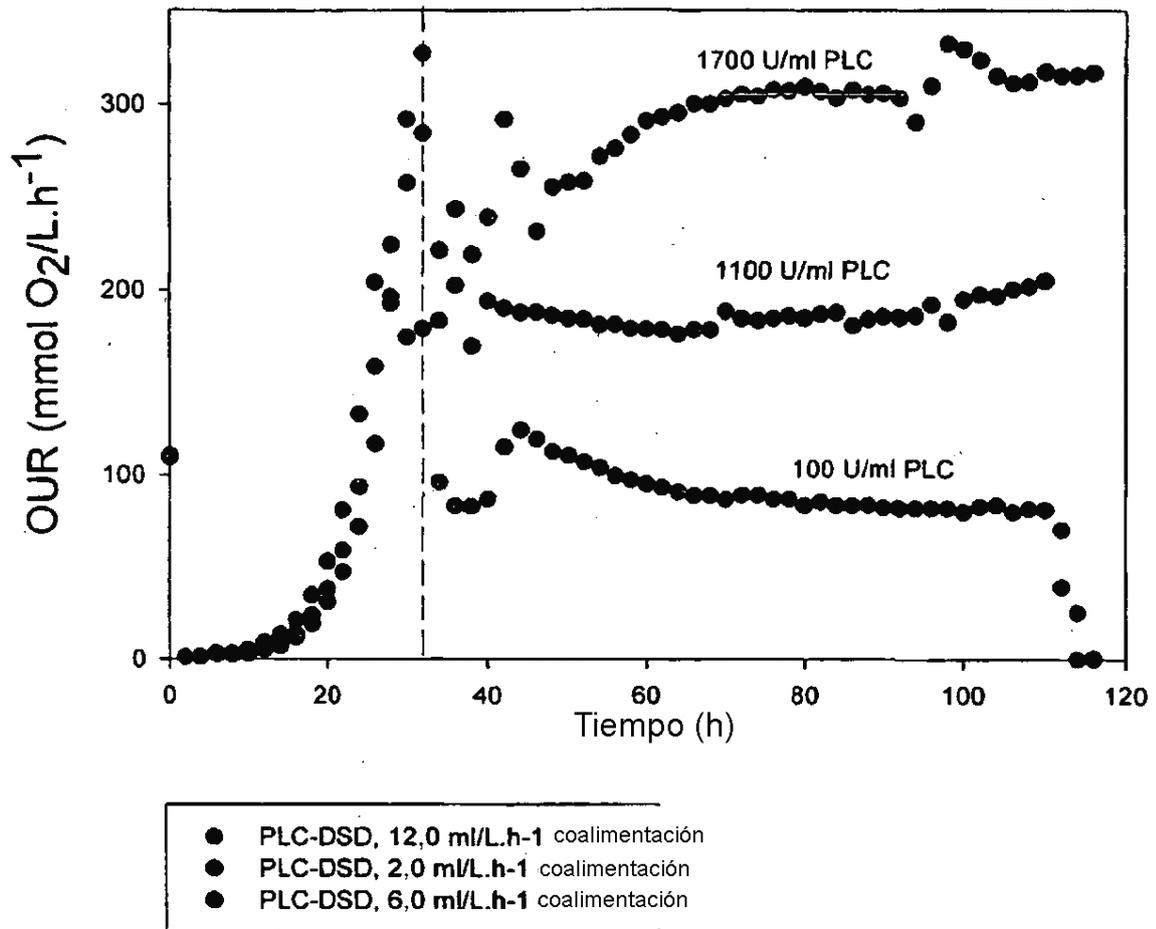
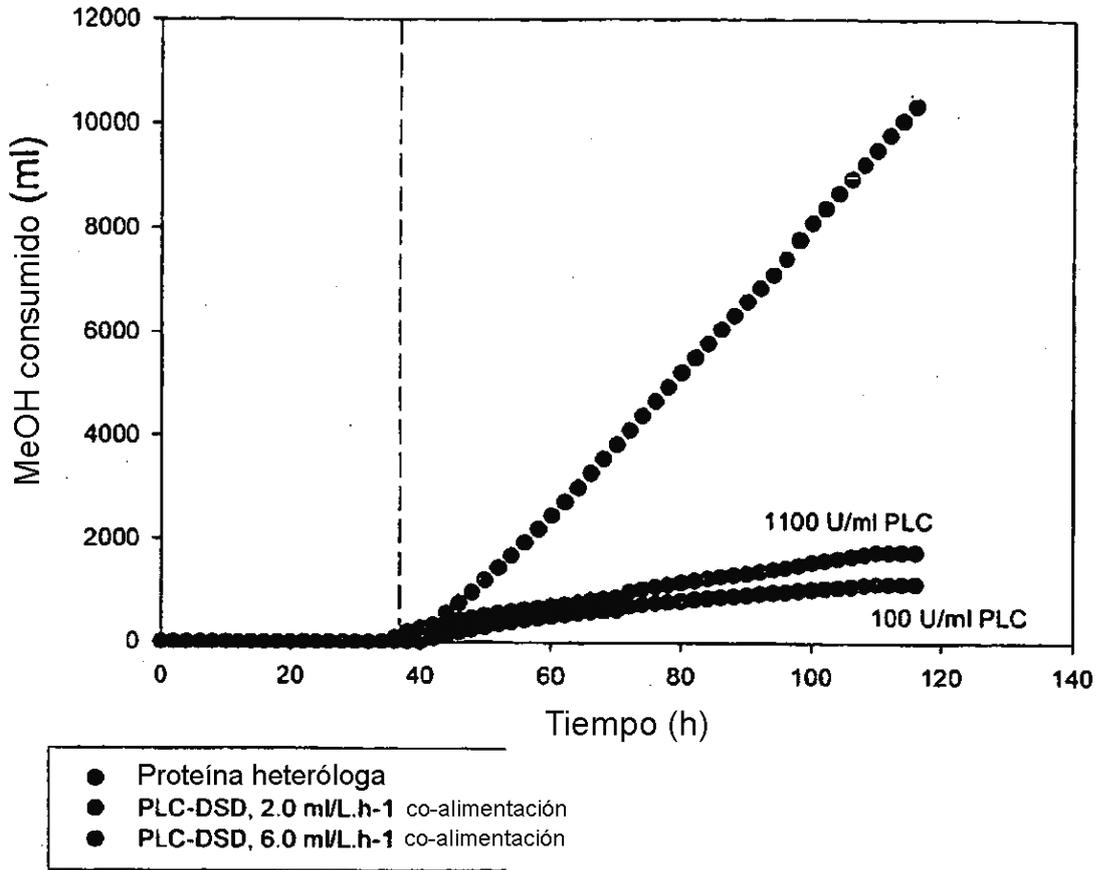


FIGURA 19

Comparación del perfil de consumo de MeOH en cultivos *P.pastoris* Mut-s 30-L que producen PLC-DSD (pH 6,2) o una proteína heteróloga

(T = 30°C, 2 vvm, 1 bar, coalimentación de glicerol)



Alimentación de MeOH según demana
 Nivel de MeOH residual controlado a 4 g/l

FIGURA 20

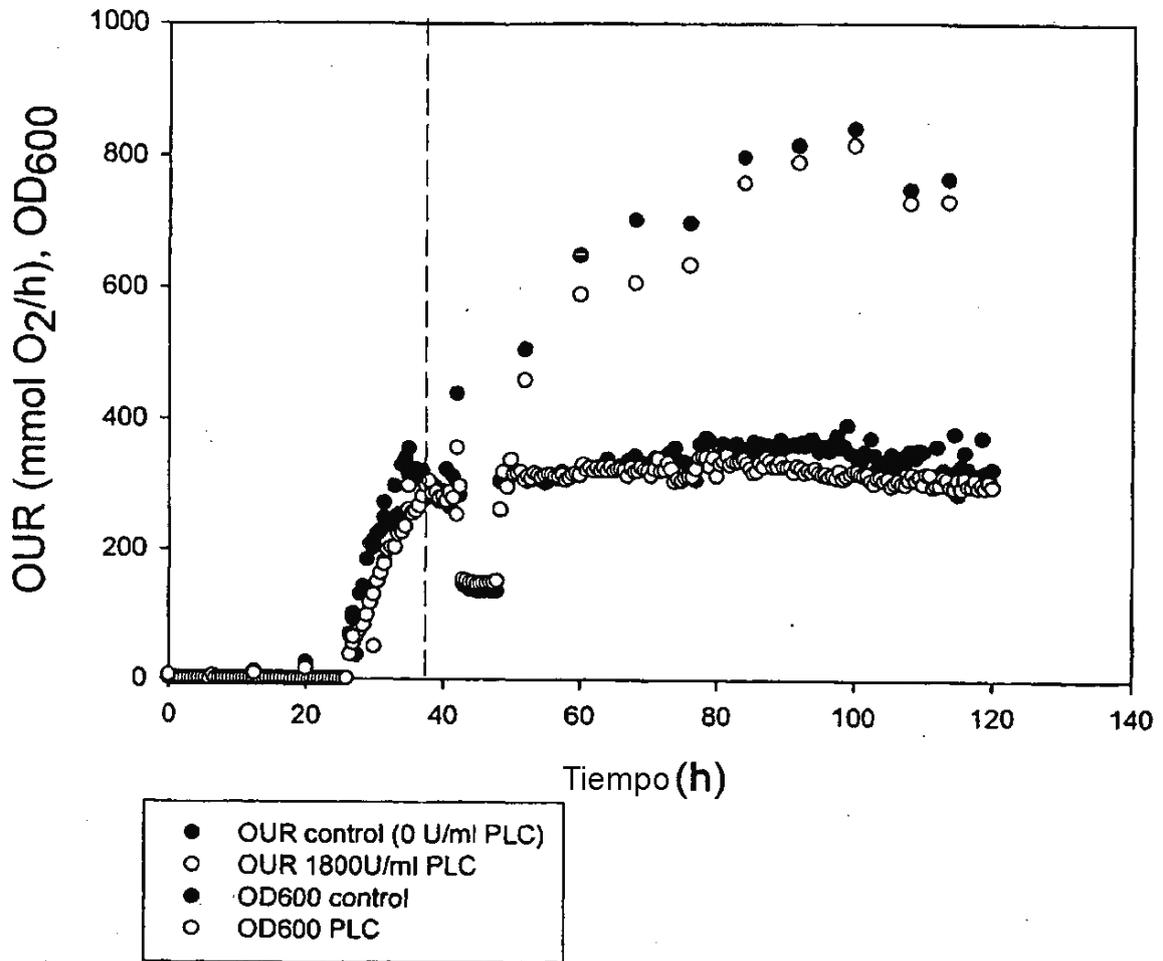


FIGURA 21

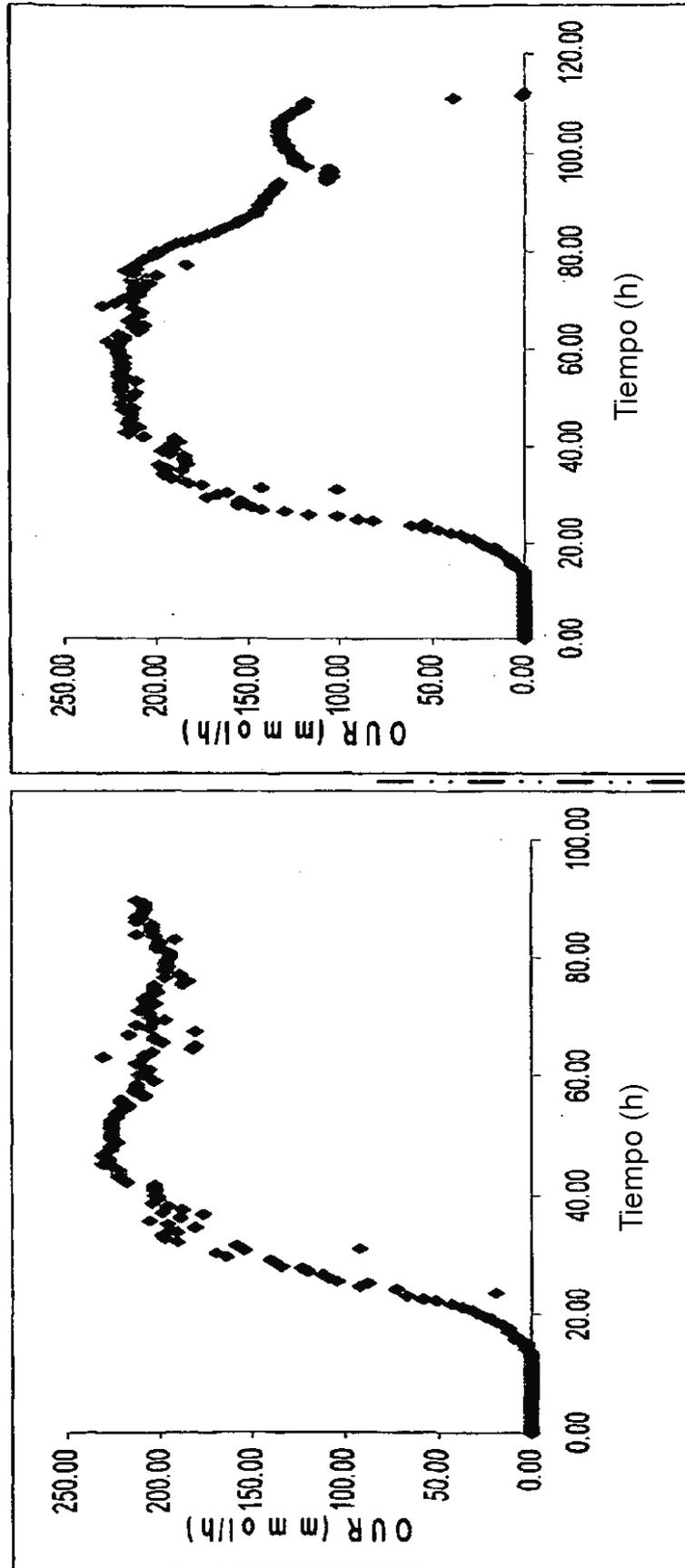


FIGURA 22A

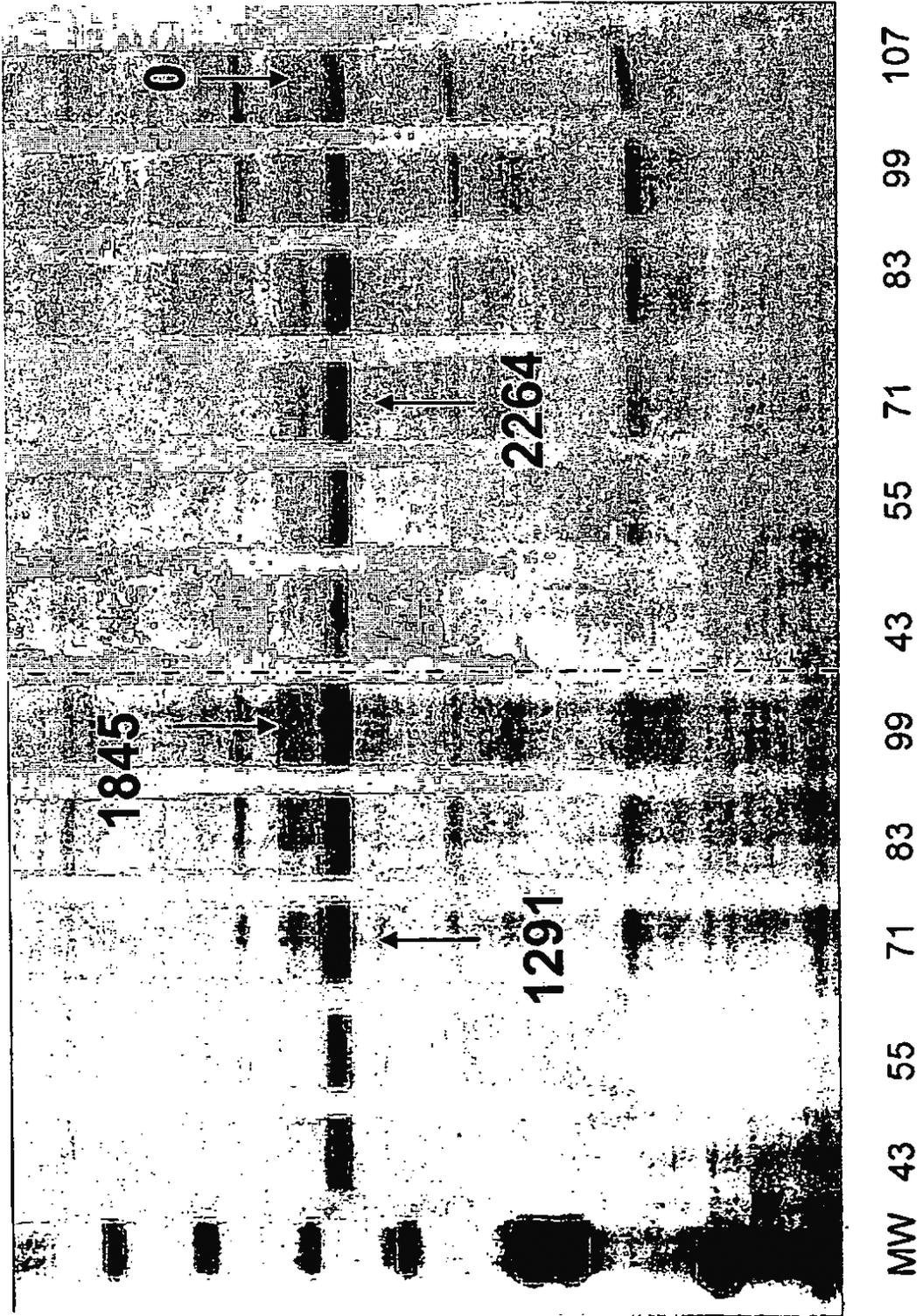
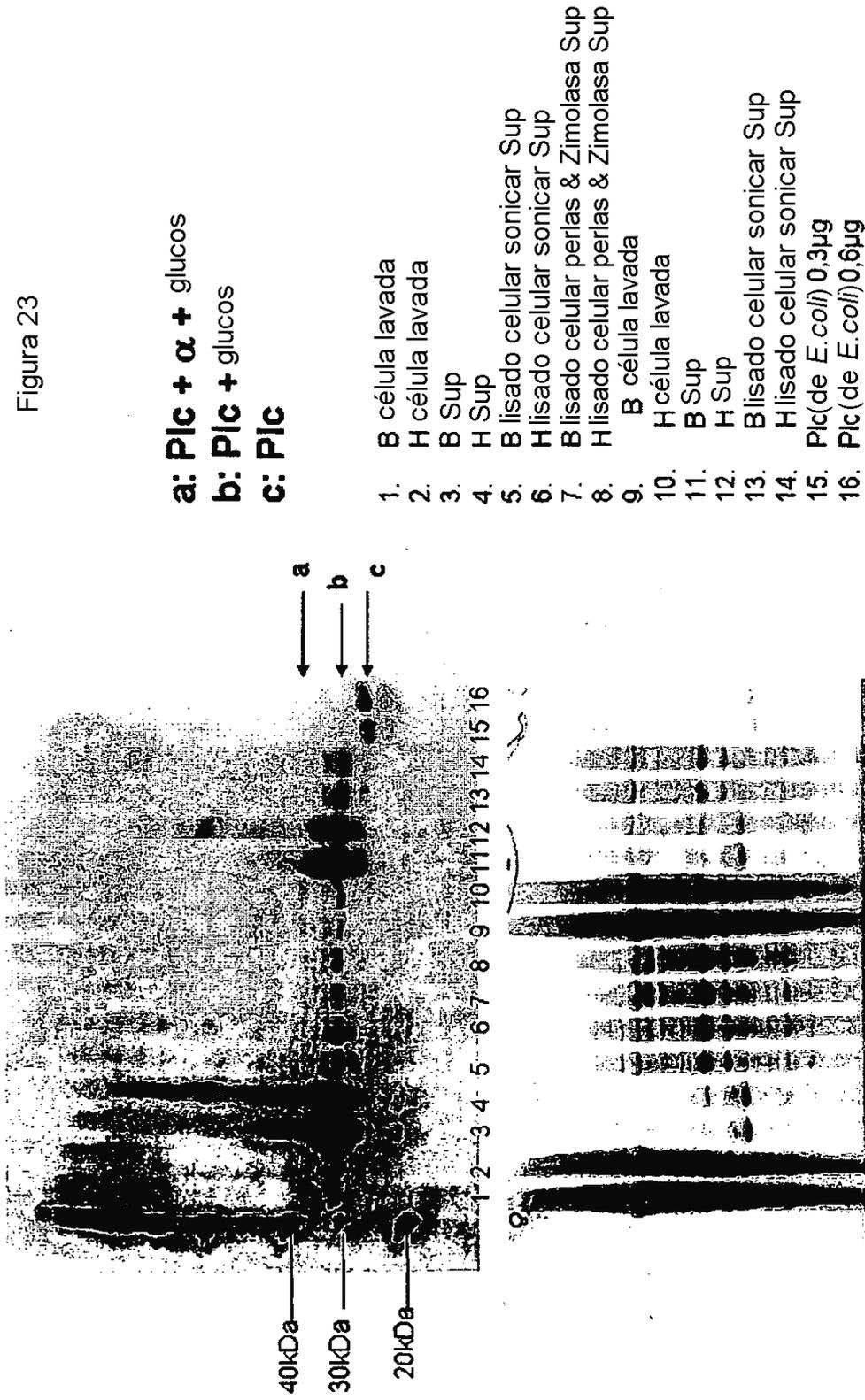


Figura 22B

Figura 23



1-8 1 μ l volumen de cultivo original
 9-14 0,5 μ l volumen de cultivo original

+ PLC (DAG etc.)



T = 30 h (en el punto de inducción)



T = 109 h (2339 U/ml PLC en sup)

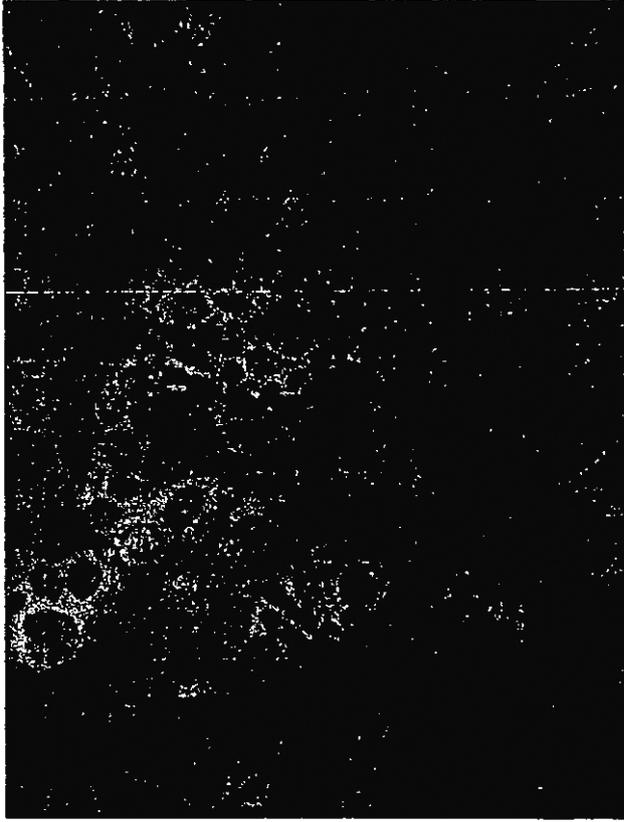
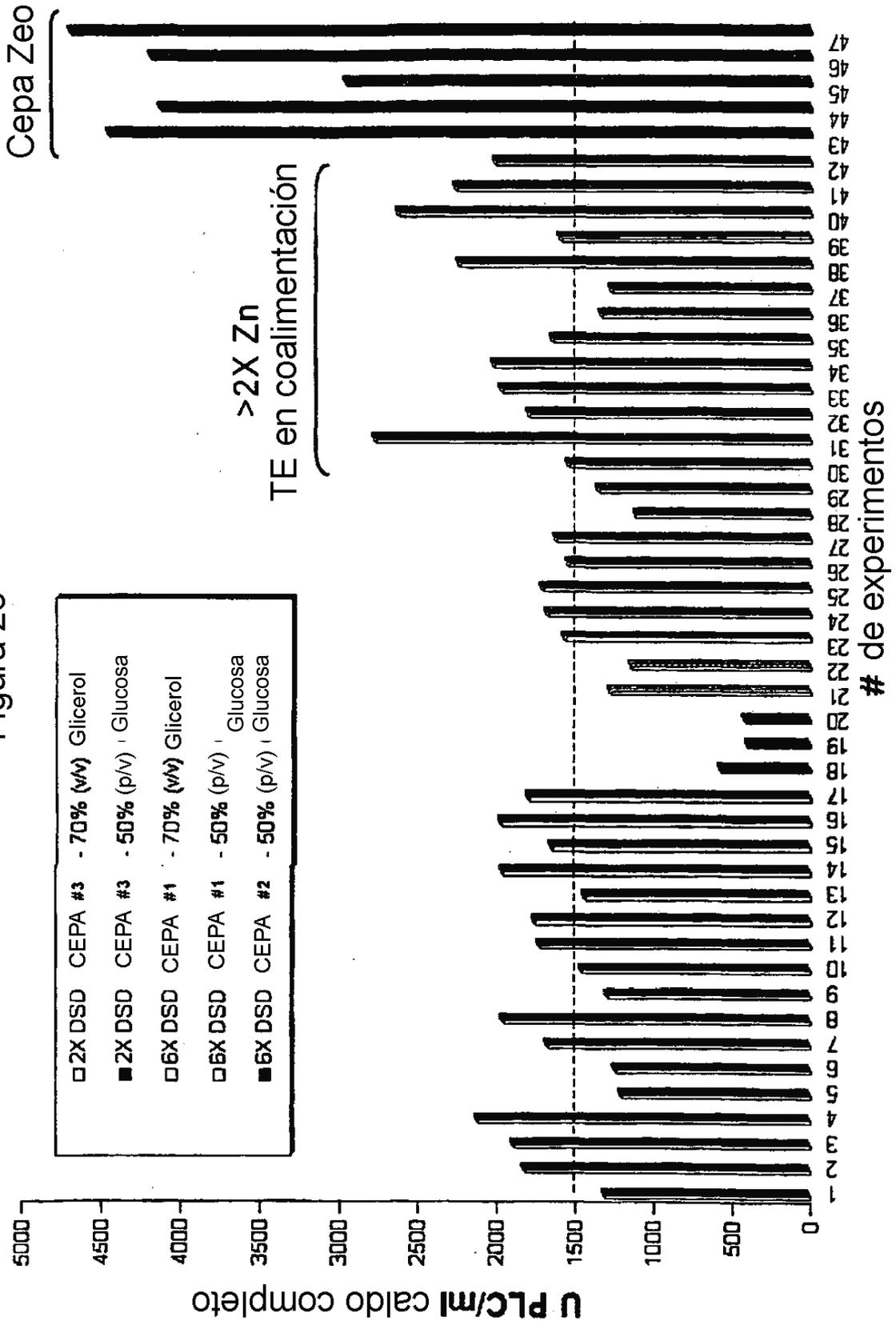


Figura 24

Figura 25

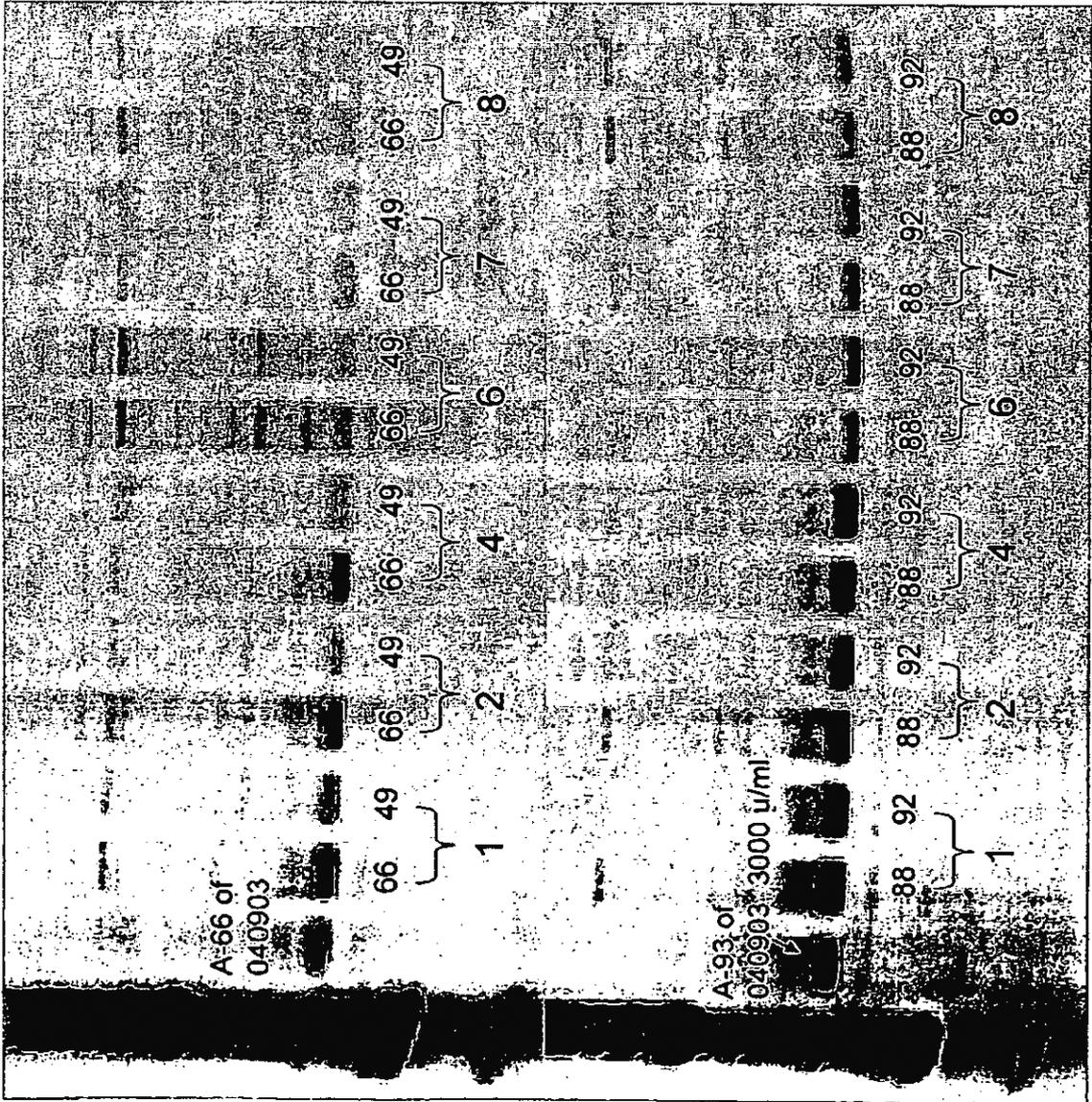


ES 2 451 266 T3

tanque	Condición	Caudal de MeOH	Alimentación de MeOH total	Caudal de glucosa	Alimentación de glucosa total	Alimentación de base total	OD600 (88 h)	pH stat U/ml (de caldo 5x)
1	Colonia #1 de cultivo zeo200, 6x DSD	0,6-1,2 ml/h	59 ml	1,8 ml/h	135,3 ml	55,5 ml	436	3119 a 75 h 3987 a 88 h 4138 a 92 h
2	Colonia #2 de cultivo zeo200, 6x DSD	0,6-1,2 ml/h	61 ml	1,8 ml/h	135,6 ml	56,1 ml	461	3511 a 92 h
4	Colonia #4 de cultivo zeo200, 6x DSD	0,6-1,2 ml/h	58 ml	1,8 ml/h	135,6 ml	56,1 ml	444	3354 a 75 h 3998 a 88 h 4133 a 92 h
6	Colonia #6 de cultivo zeo200, 6x DSD	0,6-1,2 ml/h	48 ml	1,8 ml/h	112,1 ml	40,2 ml	445	2117 a 92 h
7	BD15359, 6x DSD control	0,6-1,2 ml/h	56 ml	1,8 ml/h	135,1 ml	55,1 ml	436	2369 a 92 h
8	Duplicado del tanque 7	0,6-1,2 ml/h	53 ml	1,8 ml/h	132,7 ml	51,9 ml	428	1932 a 92 h

FIGURA 26

Experimento 101804, 6x DSD adaptada a zeocina



tanque	Condición
1	Colonia # 1 de cultivo zeo200 6x DSD
2	Colonia # 2 de cultivo zeo200 6x DSD
4	Colonia # 4 de cultivo zeo200 6x DSD
6	Colonia # 6 de cultivo zeo200 6x DSD
7	BD15359, 6x DSD control
8	Duplicado del tanque 7

Figura 27

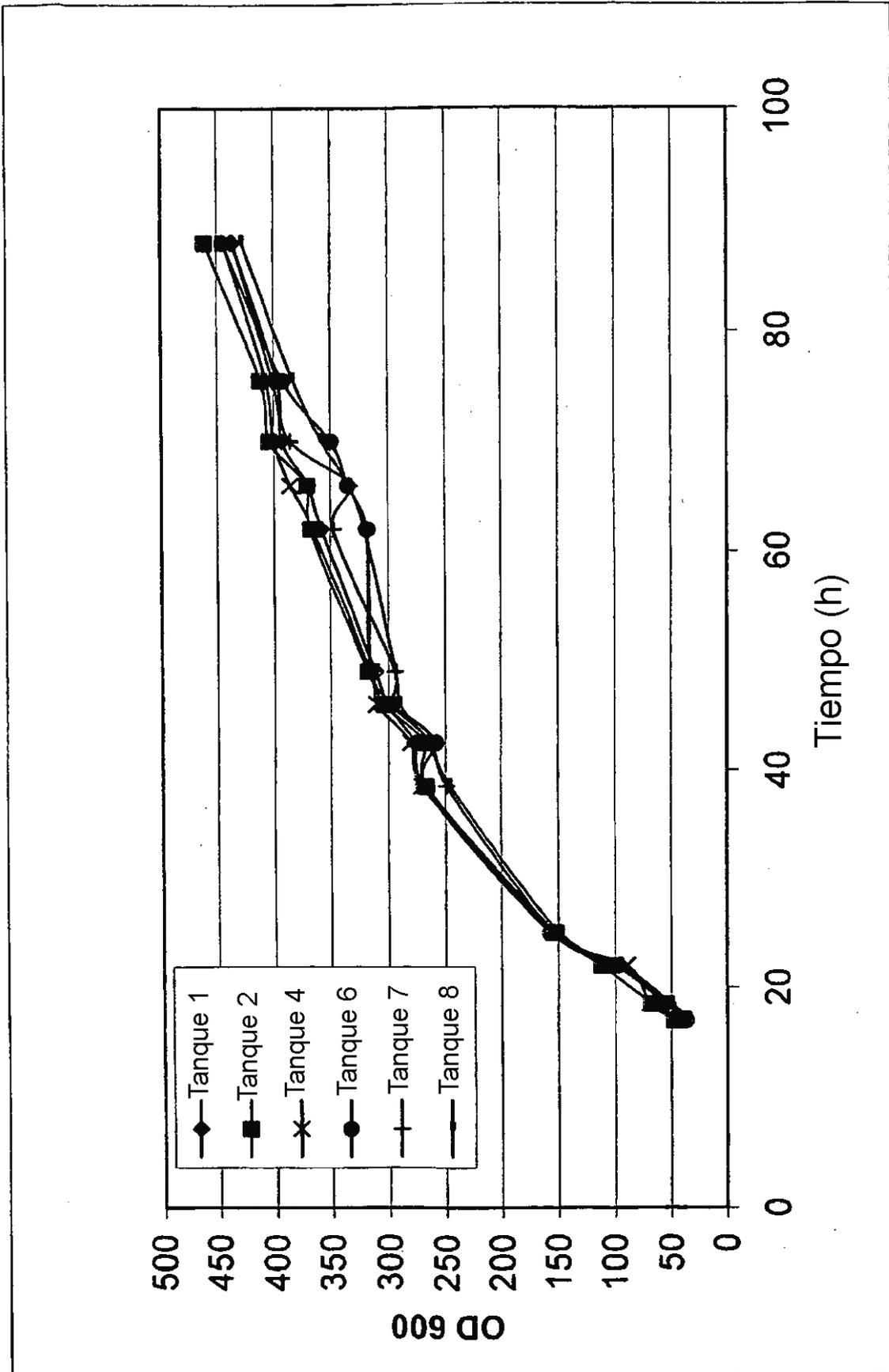
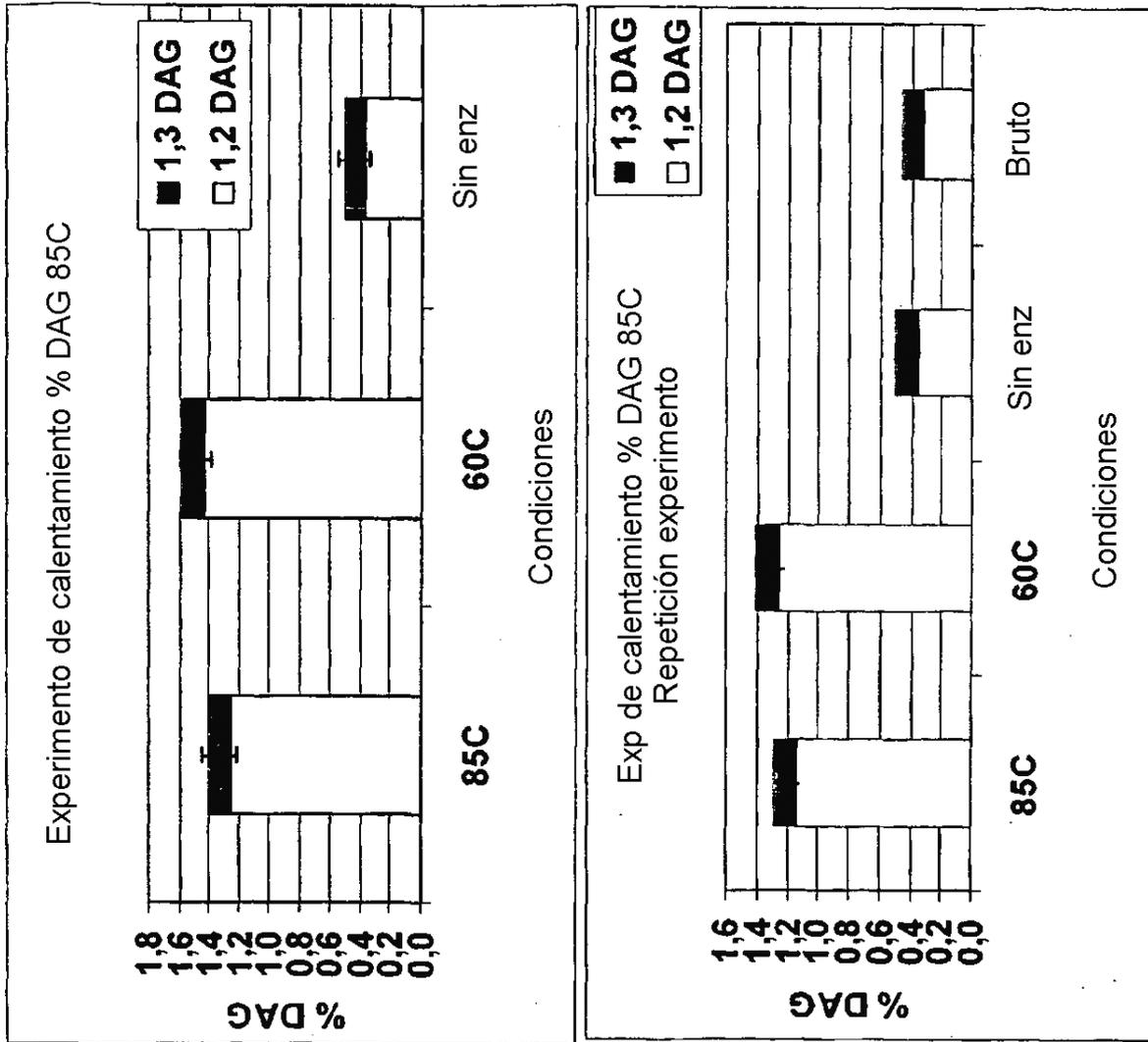


FIGURA 28

- 10U SEQ ID NO:2
- 30min a 60°C
- 15 min a 85°C
- 30 min a 60°C con dosis de enzima de 10U reciente

Conjunto de datos 1.27.04



Conjunto de datos 1.29.04

Figura 29

Experimento de calentamiento 85°C
Datos de RMN

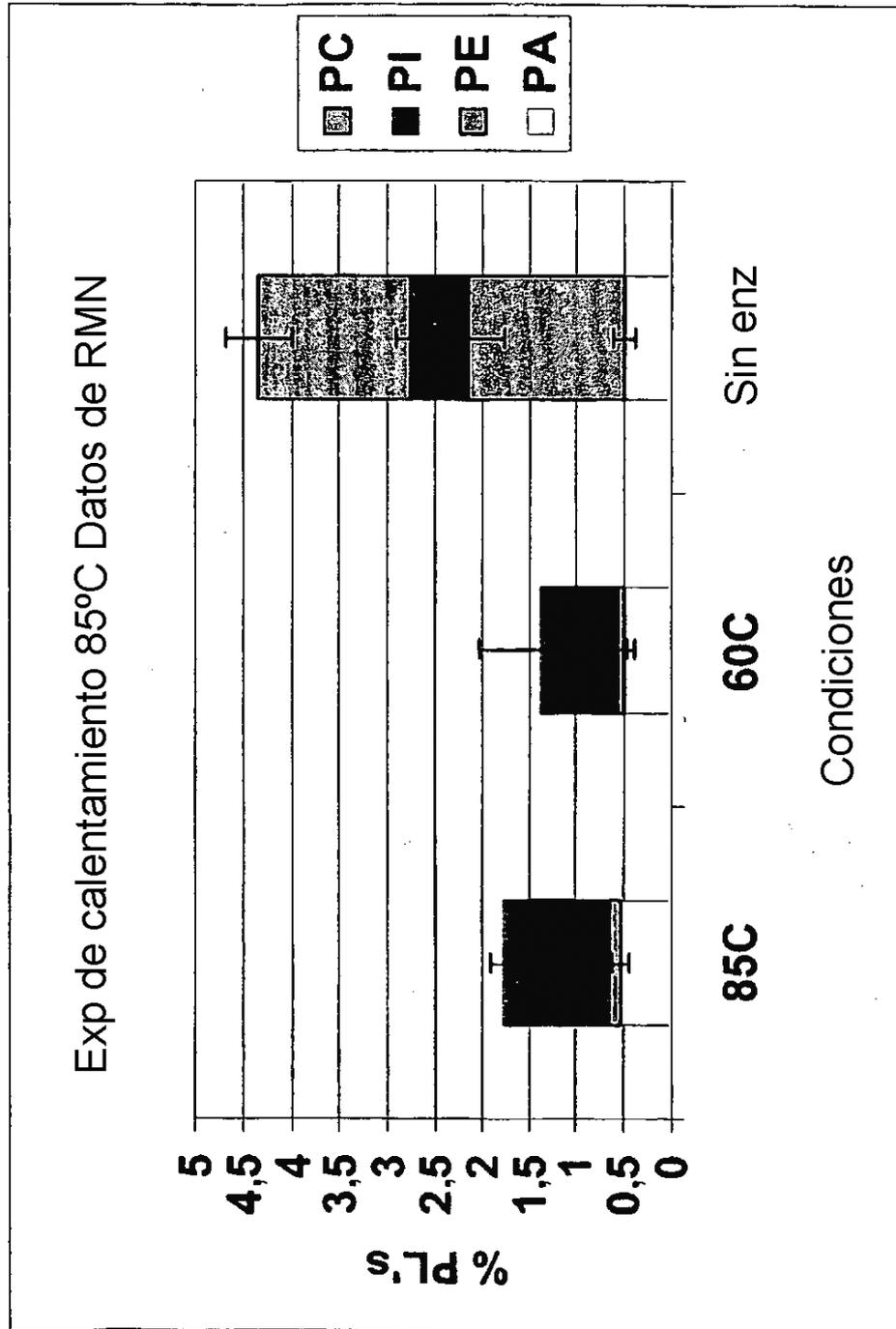


Figura 30

FIGURA 31

Estabilidad térmica de 3D PLC (SEC ID NO:2) usando p-NPPC

- 50 °C, 50 min
- 25 µL de enzima en 1 ml de p-NPPC 20 mM
- Enzima [] = 0,048 mU/mL

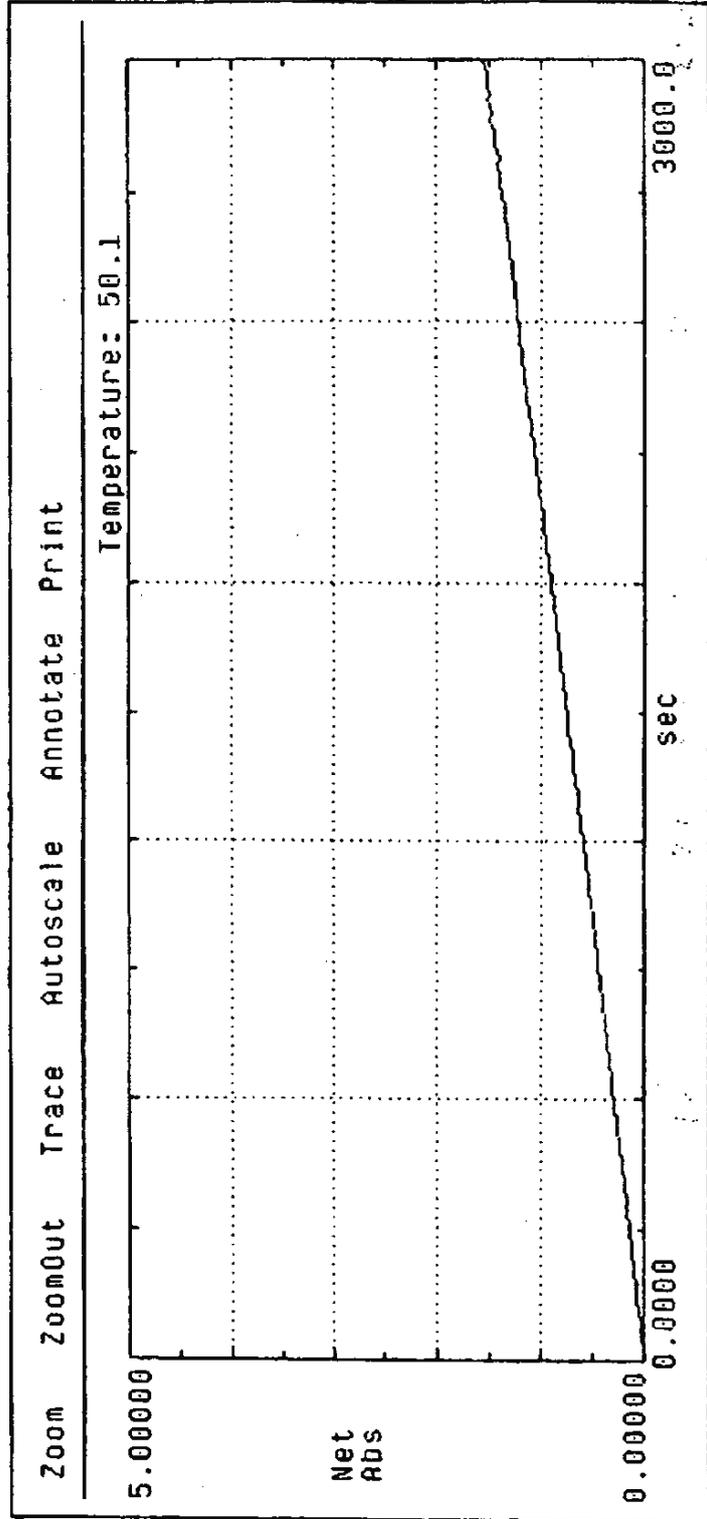


FIGURA 32

Estabilidad térmica de 3D PLC (SEC ID NO:2) usando p-NPPC, 65°C

- 65,1 °C, 50 min
- 25 µl de enzima en 1 ml de p-NPPC 20 mM
- enzima [] = 0,024 mU/ml

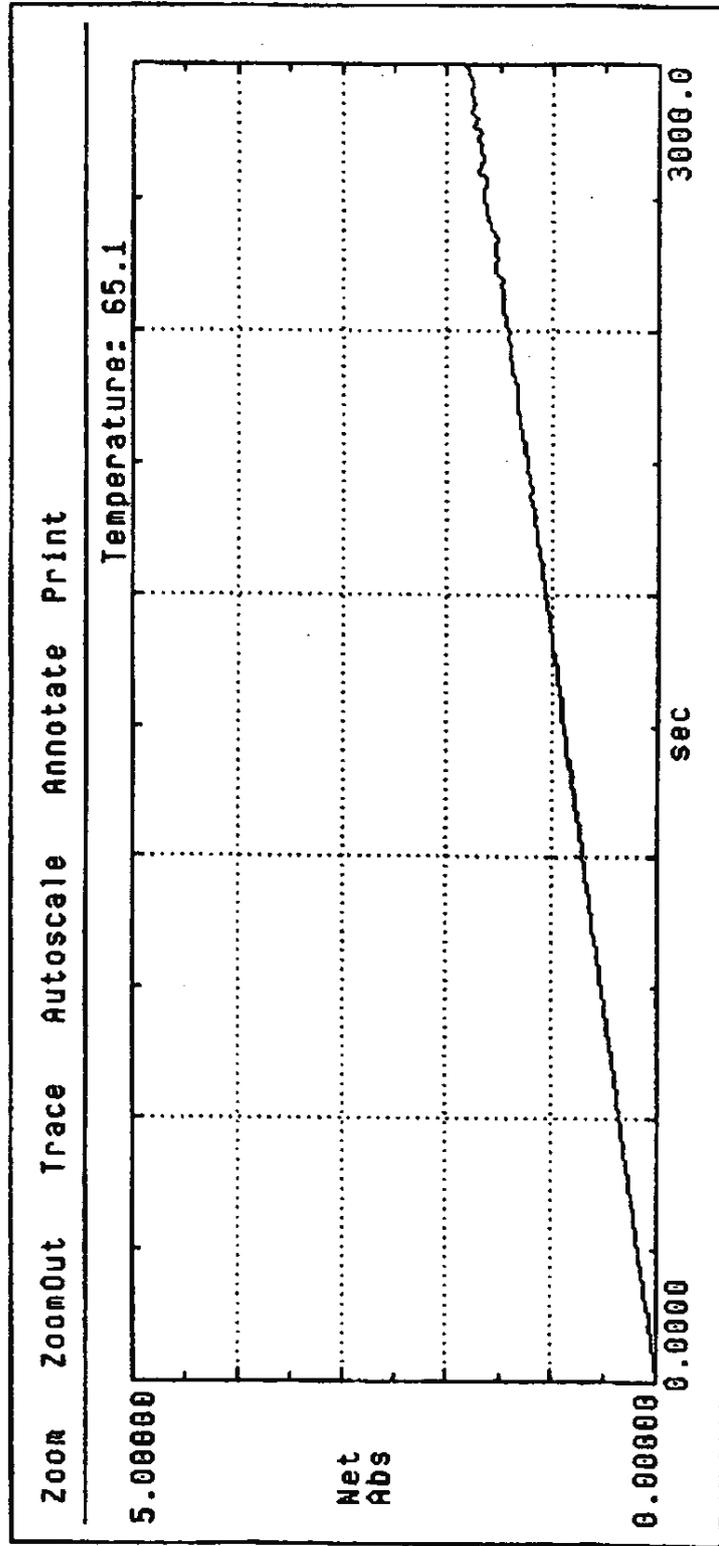


FIGURA 33

Estabilidad térmica de 3D PLC (SEC ID NO:2) usando p-NPPC, 80°C

- 80 °C, 50 min
- 25 µl de enzima en 1 ml de p-NPPC 20 mM
- enzima [] = 0,024 mU/ml

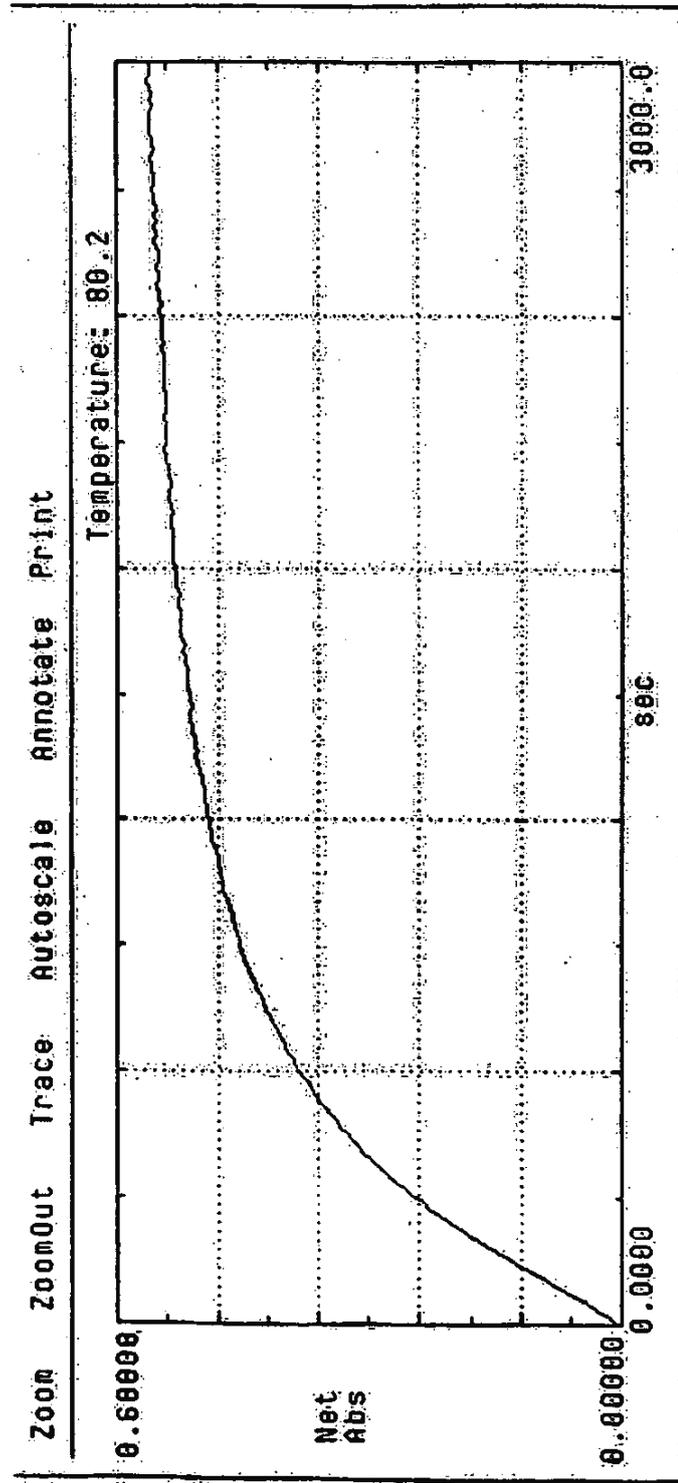
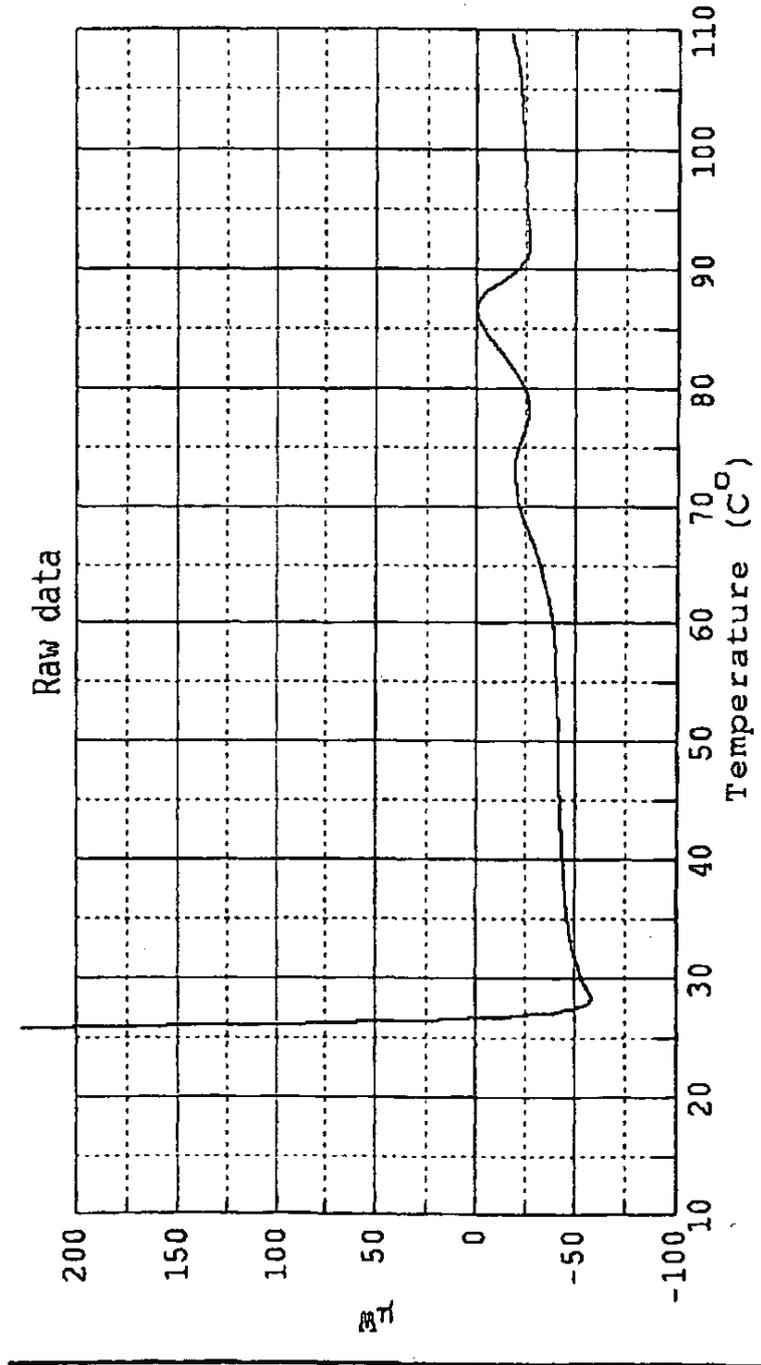


FIGURA 34
 Análisis de DSC de 3D PLC (SEC ID NO:2)

- Enzima [] = 15 mg/ml
- $T_m = 86\text{ }^\circ\text{C}$
- Reacción no reversible



ES 2 451 266 T3

mutación	codón original	codón mutado	Fracción en peso de PL total tras la reacción				PA (uM)	PI (uM)	PI/PA (uM)	(TIP/PI)/(P A/TIP)	OAG liberado (rel. mediante HPLC)
			PA	PE	PI	PC					
E41A	GAG	GCA	0,083	0,000	0,337	0,000	234	985	4,209	7,445	1,407
E41W	GAG	TGG	0,061	0,000	0,301	0,000	173	878	5,075	10,973	1,339
E41F	GAG	TTC									
E41Y	GAG	TAC									
E41R	GAG	CGT									
E94R	GAG	CGG	0,056	0,000	0,294	0,000	158	859	5,437	12,015	1,354
D100L	GAT	TTG	0,000	0,000	0,276	0,000	0	806	#DIV/0!	#DIV/0!	1,358
D100M	GAT	ATG	0,000	0,000	0,293	0,000	0	854	#DIV/0!	#DIV/0!	1,350
D100Y	GAT	TAT	0,044	0,000	0,359	0,000	124	1043	8,411	12,023	1,343
D100F	GAT	TTT	0,030	0,000	0,396	0,000	84	1150	13,690	17,307	1,338
D100W	GAT	TGG	0,034	0,000	0,270	0,000	97	792	8,165	21,728	1,226
A104L	GCT	CTT	0,069	0,000	0,318	0,000	195	926	4,749	9,388	1,273
D111R	GAT	AGG	0,096	0,000	0,374	0,000	268	1087	4,056	5,476	1,304
T112R	ACT	CGG	0,057	0,000	0,330	0,000	162	971	5,994	10,530	1,302
Y116W	TAT	TGG	0,086	0,000	0,428	0,000	245	1256	5,127	5,450	1,300
I117W	ATT	TGG	0,093	0,000	0,347	0,000	264	1018	3,856	6,288	1,288
P118W	CCT	TGG	0,051	0,000	0,292	0,000	143	851	5,951	14,102	1,376
E125K	GAA	AAG	0,067	0,000	0,301	0,000	189	875	4,630	9,938	1,352
D171V	GAT	GTG	0,052	0,000	0,338	0,000	145	986	6,800	12,003	1,430
D171E	GAT	GAG	0,074	0,000	0,317	0,000	209	927	4,435	8,391	1,463
M176W	ATG	TGG	0,021	0,000	0,359	0,000	59	1055	17,881	26,363	1,481
D230H	GAT	CAT	0,048	0,000	0,308	0,000	135	893	6,615	13,569	1,366
D230R	GAT	CGT	0,053	0,000	0,308	0,000	148	896	6,054	13,100	1,339

FIGURA 35-1

ES 2 451 266 T3

D234W GAT TGG	0,045	0,000	0,302	0,000	127	881	6,937	14,552	1.382
D234V GAT GTG	0,051	0,000	0,312	0,000	145	915	6,310	13,574	1.349
D234G GAT GGT	0,057	0,000	0,297	0,000	162	873	5,389	12,320	1.377
D234R GAT CGG	0,043	0,000	0,310	0,000	120	897	7,475	16,582	1.344
D234K GAT AAG	0,045	0,000	0,280	0,000	126	809	6,421	15,011	1.336
Q265R CAG CGT	0,074	0,000	0,000	0,000	209	0	0,000	#DIV/0!	1.441
progenitora (SEQ ID NO: 176)	0,072	0,000	0,278	0,000	205	816	3,980	9,948	1,338
progenitora (SEQ ID NO: 176)	0,082	0,000	0,280	0,000	230	811	3,526	9,186	1,428
Control positivo (E41A)	0,021	0,000	0,340	0,000	59	985	16,690	28,320	1,470
Control negativo	0,119	0,450	0,357	0,643	338	1049	3,104	4,672	0,466
Control negativo	0,096	0,346	0,234	0,517	270	681	2,522	9,093	0,417

FIGURA 35-2

FIGURA 36

Mutantes de GSSM seleccionados para inclusión en la librería GeneReassembly

