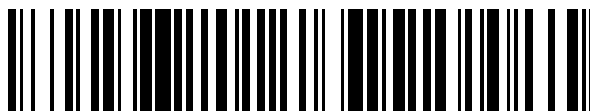


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 760**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/48** (2006.01)

**C12N 9/58** (2006.01)

**A23J 3/00** (2006.01)

**C12P 21/06** (2006.01)

**A23J 3/34** (2006.01)

**A23L 1/03** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2008 E 08749160 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2139996**

54 Título: **Peptidasas de basidiomicetos**

30 Prioridad:

**25.04.2007 EP 07008458**

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

**05.03.2015**

73 Titular/es:

**NESTEC S.A. (100.0%)  
Avenue Nestlé 55  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**LINKE, DIANA;  
KRINGS, ULRICH;  
ZORN, HOLGER;  
RABE, SWEN y  
ULMER, HELGE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 530 760 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

Peptidasas de basidiomicetos

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a enzimas peptidasas derivadas de los micelios de basidiomicetos, en particular a enzimas peptidasas específicas de gluten, a su método de producción y a su uso en la hidrólisis de proteínas.

## 10 Antecedentes de la invención

La hidrólisis de proteínas vegetales representa uno de los procesos más antiguos de la biotecnología alimenticia. Empíricamente realizado durante siglos en países asiáticos, la proteína de soja se hidroliza para producir, entre otros, *Shoyu*, una salsa de soja y un condimento habitual que en el mundo occidental ha llegado a ser casi sinónimo de cocina china. En estos procesos eternos, algunas veces tediosos, las actividades peptidolíticas requeridas proceden de una fermentación consecutiva de *Aspergilli*, de bacterias ácido lácticas y de levaduras que se desarrollan en sus sustratos vegetales respectivos.

Los países occidentales han imitado este proceso usando proteínas de trigo, arroz o cacahuete y reemplazando la hidrólisis enzimática por hidrólisis ácida, por ejemplo, usando ácido clorhídrico, para abrir eficazmente los enlaces peptídicos cinéticamente muy estables. Los productos, normalmente denominados proteína vegetal hidrolizada (PVH), son condimentos líquidos o concentrados para obtener pastas, polvos, premezclas para su uso en composiciones de sopa o salsa, o cubitos de caldo. Todos los productos confieren un olor y un sabor similar a la carne, aunque la carne no interviene en ninguna fase del proceso.

25 Dado que el ácido debe neutralizarse después de haberse completado los procesos hidrolíticos, se añade hidróxido sódico. El cloruro sódico formado durante esta reacción de neutralización mantiene las propiedades potenciadoras de sabor del hidrolizado vegetal y con frecuencia se acepta en el producto final.

30 Sin embargo, la hidrólisis ácida soporta muchas desventajas. Los ácidos y bases fuertes son sustancias peligrosas y se considera que no son compatibles con la seguridad y las operaciones de calidad alimenticia, especialmente a temperaturas por encima de 100 °C. Incluso más problemático es la inevitable formación de compuestos dicloro, tales como 1,2- y 1,3-dicloropropanol, que se ha observado que es carcinogénico en estudios de alimentación animal. El contacto de la fracción lipídica de las materias primas con el ácido clorhídrico también genera esteroides clorados, aunque compuestos tales como el 5-(clorometil) furfural proceden de las rutas de Maillard.

Para impedir la formación de compuestos peligrosos o tóxicos, la atención se ha dirigido de nuevo a procesos enzimáticos en los que estos compuestos ni se requieren ni deben formarse. Como consecuencia, ha habido un inmenso interés en mejorar los procesos enzimáticos.

40 Las peptidasas se clasifican según su mecanismo de acción sobre el sustrato de proteína (endo o exopeptidasas; las exopeptidasas pueden ser amino o carboxilpeptidasas) o sobre uno de los cuatro mecanismos catalíticos. Las serina endopeptidasas están representadas por las superfamilias de quimotripsina y subtilisina; presentan una amplia especificidad por sustratos y contienen la denominada tríada catalítica. Las cisteína endopeptidasas están representadas por cuatro superfamilias y se producen en fuentes microbianas, vegetales y animales; el nombre hace referencia al resto de cisteína en la tríada catalítica. Las ácido aspártico endopeptidasas escinden enlaces peptídicos mediante una acción concertada de dos restos de aspartato. Las metalopeptidasas son enzimas antiguas evolutivas, que normalmente contienen zinc, con especificidades de tipo exo y endo.

50 Son peptidasas comunes, por ejemplo, la alcalasa (una serina peptidasa de *Bacillus licheniformis*), la papaína (una cisteína peptidasa de *Carica papaya*), la quimosina (rennet) de cepas *Mucor* recombinantes y la neutrasa (una metalopeptidasa de *Bacillus subtilis*). El documento US 3694316 describe un proceso para la preparación de proteasas de basidiomicetos. Otras peptidasas comerciales, tales como pronasa o Flavorzyme®, son mezclas de diversos tipos de actividades producidas por bacterias tales como *Streptomyces griseus* o por hongos ascomicetos tales como *Aspergillus oryzae*.

Debido a su naturaleza biocatalítica, el proceso enzimático puede realizarse en condiciones físicas suaves y por tanto es más ecológico que su homólogo catalizado ácido. Sin embargo, a diferencia de la hidrólisis ácida, los procesos enzimáticos a menudo no alcanzan la terminación y pueden dar como resultado productos parcialmente hidrolizados con un sabor amargo; el nivel de amargor aumenta con el aumento del grado de hidrólisis hasta alcanzar un máximo, y después disminuye con el progreso de la hidrólisis.

60 Se han publicado numerosos intentos para acelerar los procesos enzimáticos (Pedroche, J. et al., Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food chemistry, 2003) y para impedir la formación de péptidos amargos (Maehashi K. et al., Molecular Methods of plant Analysis, 2002, 47-68).

Las proteínas de origen vegetal (Lamsal, B.P. et al., Journal of the American Oil Chemists' Society, 83(8), 731-737, 2006) o animal (Je, J. et al., European Food Research and Technology, 221(1-2), 157-162, 2005) o desechos de procesamiento, tales como salvado de arroz, han servido como sustratos (Jarunrattanasri, A. et al., ACS Symposium Series, 83-97, 2005). También se han investigado sustratos tales como hemoglobina, caseína e insulina (Suzuki, N. et al. Phytochemistry, 2005, 66, 983-990).

Se han sugerido enzimas de muchas fuentes microbianas, incluso de especies patógenas (Moreira, F.G. et al., Brazilian Journal of Microbiology, 36(1), 7-11, 2005). Por ejemplo, se descubrió que una aspártico peptidasa de *Pleurotus eryngii* es activa frente a la caseína (Wang, H. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 2001, 289, 750-755). Las metalopeptidasas de *Grifola frondosa* y de *Pleurotus ostreatus* se han caracterizado y evaluado mecanísticamente (Nonaka, T. et al., J. Biol. Chem., 1997, 272, 30032-30039; Hori, T. et al., Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 2001, 57, 361-368). El documento EP1074632 también se refiere a la hidrólisis enzimática de proteínas usando cultivos fúngicos.

Se ha sugerido que las combinaciones de actividades hidrolíticas muestran propiedades sinérgicas (Minones Conde, J. et al., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53(20), 8038-8045, 2005). La presencia de una actividad glutaminasa fue importante para obtener un hidrolizado con un sabor intenso y típico (Schlichtherle-Cerny, H. et al., Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50(6), 1515-1522, 2002 and EP 1290951). El documento US3912822 se refiere a un proceso para la producción de un hidrolizado de proteína que tiene un contenido particularmente alto de ácido glutámico.

Sin embargo, solo muy pocas patentes proporcionan detalles sobre la composición química de los productos de hidrólisis (documento US 6465209) o sobre el tipo de enlaces peptídicos preferiblemente escindidos (documento JP 01291795).

Las enzimas vegetales son particularmente adecuadas para degradar un sustrato vegetal; el uso de la misma planta como una fuente de proteína y enzima fue una idea fascinante (Tchorbanov, B., Special Publication - Royal Society of Chemistry, 491-494, 2001).

La soja (documentos WO 2002/069733; WO 2004/056980) y el trigo (documento WO2006/104022, Abe, M. et al. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2003, 67, 2018-2021) continúan siendo los sustratos más comunes de la hidrólisis enzimática, aunque la hidrólisis de proteínas animales es a menudo una tentativa para minimizar corrientes secundarias del procesamiento de alimentos, tales como huesos o sangre de peces (JP 2005176620; RU2003-106447). Entre los microorganismos usados se encuentran combinaciones de bacterias (documento WO2002/085131), mezclas de especies tradicionales (documento JP2006/075006), *Aspergillus* recombinante (documento JP2005/328738), o un basidiomiceto (documento JP2006/094757). Sabotic, J. et al. en J. Biotechnology, 128, págs. 297-307, 2006, informan sobre la diversidad de peptidolítica de basidiomicetos europeos. Si el biocatalizador no era una célula intacta, se sugerían peptidasas sencillas, tales como neutrasa (documento WO2006/103628), o combinaciones de enzimas vegetales y microbianas (CN1397644 WO2002 / 078461).

Las mezclas de actividades hidrolíticas también son útiles, si se desea un alto grado de hidrólisis (documentos WO2001/076391; WO2003/061675; WO2002/001961). Se produjo un extracto de levadura rico en 5'-nucleótidos en un proceso secuencial usando enzimas de actinomicetos y después un basidiomiceto, *Trametes sanguinea* (documento JP2004/229540). Se reivindicó una cepa de *Lactobacillus* que proporcionaba una glutaminasa con propiedades específicas para potenciar el rendimiento de glutamato (documento EP1290951).

En particular, la peptidólisis de gluten de trigo, se ha realizado usando alcalasa, pancreatina o pepsina (Kong, X. et al., Food Chemistry, 101, 615-620, 2007), o papaína (Wang, J. et al., Food Chemistry, 101, 1658-1663, 2007). Finalmente, también se sabe hidrolizar enzimáticamente gluten de trigo usando enzimas disponibles en el comercio. Sin embargo, los puntos críticos en el desarrollo de los procesos HGT-te (enzimas técnicas de Hidrolizados de Gluten de Trigo) son principalmente los altos costes de estas enzimas, la separación de sólidos de los hidrolizados con alto rendimiento y protección microbiana de los hidrolizados ya que se procesan a concentraciones salinas bajas, o sin ellas, a temperaturas permisibles para determinados microorganismos saprófitos.

Objeto de la invención

El objeto de la presente invención es por tanto proporcionar una fuente alternativa de enzimas peptidasas que supere al menos algunos de los inconvenientes descritos anteriormente.

Sumario de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona, en un primer aspecto, un método para producir hidrolizados de proteínas y/o fracciones de las mismas, que comprende las etapas de:

- a. Proporcionar una mezcla de peptidasas obtenidas de micelios de basidiomicetos,
- b. Añadir la mezcla a un sustrato que contenga dicha proteína y/o fracciones de la misma y

c. Realizar la hidrólisis de dicha proteína y/o fracciones de la misma para obtener dicho hidrolizado;

en el que la mezcla de peptidasas comprende al menos una peptidasa que comprende la secuencia proporcionada en las SEC ID Nos 1, 2, 3 o 4.

5 Un segundo aspecto de la invención se refiere al uso de una mezcla de peptidasas obtenidas de micelios de basidiomicetos para la hidrólisis de gluten y/o fracciones de las mismas, en el que la mezcla de peptidasas comprende al menos una peptidasa que comprende la secuencia proporcionada en las SEC ID N° 1, 2, 3 o 4.

10 El uso de hidrolizados obtenidos mediante un método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en una composición alimenticia, una composición cosmética y/o una composición farmacéutica o médica, también forma parte de la presente invención.

15 La presente invención se refiere, en aspectos adicionales, a una mezcla de peptidasas, en la que dicha mezcla se produce por micelios de basidiomicetos, preferentemente de Himenomicetos, y en el que al menos una peptidasa comprende la secuencia proporcionada en las SEC ID Nos 1, 2, 3 o 4.

La mezcla de peptidasas tiene una especificidad de sustrato hacia el gluten y/o fracciones del mismo.

## 20 Figuras

En el sucesivo en este documento, la presente invención se describe con referencia a algunas realizaciones mostradas en las figuras, en las que:

25 - La Fig. 1 muestra gel teñido con plata (A) y gel teñido con actividad (B) de las proteínas (A) y peptidasas (B) secretadas por *Agrocybe aegerita* durante ocho días de cultivo.

- La Fig. 2 es un gel teñido con actividad de peptidasas de *Pleurotus eryngii* cultivado en fracciones de gluten mayores de 100 kDa.

30 - La Fig. 3 es un gel teñido con actividad de peptidasas de *Grifola frondosa* cultivada en gluten puro.

- La Fig. 4 muestra el pH óptimo de las mezclas de peptidasas secretadas por seis especies de basidiomicetos.

35 - La Fig. 5 muestra la temperatura óptima de las mezclas de peptidasas secretadas por seis especies de basidiomicetos.

- La Fig. 6 es una electroforesis en gel con isoelectroenfoque (IEF) de secretoma (A) y peptidasas (B) de *Pleurotus sapidus* (carril 2), *Pleurotus eryngii* (carril 3), *Grifola frondosa* (carril 4), y *Lentinula edodes* (carril 5).

40 - La Fig. 7 muestra la evaluación del mecanismo de catálisis de la peptidasa de *Pleurotus sapidus* usando tinción de actividad en presencia de inhibidores.

45 - La Fig. 8 es un gráfico que muestra la proteína libre liberada por las peptidasas de *Pleurotus floridanus* (Pfl) y de *Grifola frondosa* (Gfr).

- La Fig. 9 es un gráfico que muestra el número de hidrolizados de formol producido utilizando peptidasas crudas de *Pleurotus floridanus* (Pfl) y *Grifola frondosa* (Gfr).

## 50 Descripción detallada de la invención

En la presente solicitud, los términos peptidasa y proteasa se usan indistintamente y se designan una enzima capaz de escindir uno o más enlaces peptídicos y por tanto, capaces de hidrolizar proteínas a diversos grados.

55 La presente invención se refiere a la producción de hidrolizados de proteínas y/o fracciones de las mismas. En una primera etapa, se proporciona una mezcla de peptidasas obtenidas de micelios de basidiomicetos.

60 La división *Basidiomycota* es un gran taxón dentro del Reino Fungi que incluye especies que producen esporas con una estructura en forma de maza denominada basidio. Los *Basidiomycota* se agrupan en tres clases principales, Hymenomycotina (Himenomicetos; hongos), Ustilaginomycotina (Ustilaginomicetos; hongos tizón verdaderos), y Teliomycotina (Urediniomicetos; royas).

65 Preferentemente, los basidiomicetos usados en el proceso de la invención se seleccionan de Himenomicetos, más preferentemente, se seleccionan de los géneros *Pleurotus*, *Lentinula*, *Agrocybe*, o *Grifola*. Incluso más preferentemente, los basidiomicetos se seleccionan de cepas de *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Agrocybe aegerita*, *Pleurotus floridanus*, o *Grifola frondosa*. Dichas cepas se

encuentran disponibles en el comercio a través de colecciones de cultivo comerciales, tales como la DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania).

La mayoría de estos hongos se desarrollan típicamente sobre madera muerta o podrida. Por tanto, son famosos por sus fuertes capacidades degradadoras de celulosa (hongos de la podredumbre parda) y celulasa (hongos de la podredumbre blanca). Las enzimas típicas de los hongos de la podredumbre blanca son las lignino peroxidadas, manganoso peroxidadas, lacasas y algunas oxidasas productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dado que la madera de los árboles caducifolios y de las coníferas no contiene una cantidad significativa de proteínas, resulta sorprendente descubrir la alta actividad peptidasa en hongos que crecen en este hábitat natural particular

De acuerdo con la invención, la mezcla de peptidasas se obtiene de los micelios de dichos microorganismos. El uso de micelios ofrece ventajas en cuanto a facilidad de producción y cultivo ya que se evita el granel de cuerpos fructíferos. Además, como resultado de un amplio uso de estas especies como alimentos, los riesgos toxicológicos son insignificantes.

Estos hongos pueden cultivarse en cultivos anegados con demandas mínimas de complementos de medio. Debe estar presente una fuente de carbono, nitrógeno y fósforo; preferentemente se añade una mezcla normal de elementos traza y minoritarios, como se recomienda en todos los medios nutrientes de microorganismos. Este proceso de producción de biomasa opera en condiciones suaves y es ecológico.

Las temperaturas son moderadas, típicamente en el intervalo de 10 a 35 °C, preferentemente de 20 a 30 °C. Prefiriéndose un pH del medio de aproximadamente 4 a 8, prefiriéndose un pH de aproximadamente 5 a 7 y son típicas del proceso condiciones lumínicas reducidas.

Las actividades peptidolíticas se secretan en el sobrenadante de cultivo libre de micelio, lo que facilita la manipulación del bioproceso así como el aislamiento y enriquecimiento enzimático usando técnicas conocidas en la materia, tales como centrifugación, ultra-filtración o precipitación. Por tanto, puede obtenerse un sobrenadante de cultivo concentrado, acelular, de peptidasas y usarse para hidrólisis posterior. Aunque las enzimas pueden aislarse por técnicas conocidas en la materia, no es necesario hacerlo y la mezcla cruda obtenida también puede usarse posteriormente en el método de la presente invención.

La mezcla de peptidasas obtenidas a partir de los micelios de basidiomicetos comprende al menos una peptidasa que tiene la secuencia parcial como se expone en el listado de secuencias (1), (2), (3) o (4).

- (1): DGNASPASLSTK
- (2): QLSGLPSGTLNDLAR
- (3): TVQTNAPWGLSR
- (4): APSALTVGASTLTDTR

En una segunda etapa del método de la presente invención, la mezcla de peptidasas se añade a un sustrato que contiene proteínas y/o fracciones de las mismas. La mezcla de peptidasas puede ser la que se obtenga de una cepa de microorganismos descritos anteriormente o puede ser una mezcla de peptidasas obtenida de más de una las cepas de microorganismos descritos anteriormente. La proteína puede seleccionarse de cualquier fuente animal o vegetal y puede ser gluten, suero, soja, etc. Puede proceder de trigo, harina de trigo, soja (o torta de prensa), altramuz, judías amarillas, patatas, maíz, cebada, lentejas, leche, etc. Preferentemente, procede de una fuente vegetal. Más preferentemente, procede de variedades de cultivo de *Triticum* L. (trigo). Más preferentemente, la proteína es gluten o sus fracciones.

Las peptidasas normalmente se aplican en la dispersión del sustrato de proteína a un nivel total de 0,0005 a 5 %, preferentemente de 0,0001 % a 2 % de enzima pura en peso dependiendo de la actividad específica. Las enzimas pueden añadirse como ingredientes sencillos individuales (píldoras, granulados, líquido estable, etc. que contengan una enzima), o como mezclas de dos o más enzimas (por ejemplo cogranulados).

En una etapa final, la hidrólisis de dicha proteína y/o fracciones de la misma se realiza para obtener dichos hidrolizados. Las condiciones que pueden usarse para la hidrólisis de proteínas son condiciones estándar y puede determinarlas fácilmente un experto en la materia. Por ejemplo, la reacción puede incluir la presencia de actividades catalíticas auxiliares a través de sus microorganismos u otras fuentes enzimáticas.

La Figura 1A muestra la presencia de una mezcla de proteínas (por ejemplo peptidasas) después del cultivo de micelios de *Agrocybe aegerita* y la Figura 1B muestra la actividad enzimática de dichas peptidasas.

Los hidrolizados obtenidos mediante un método de la presente invención pueden ser péptidos de diverso tamaño así como aminoácidos sencillos. Adicionalmente pueden procesarse como un líquido. En particular, la solución puede someterse a de-coloración y a etapas de filtración. El líquido refinado puede después concentrarse a cualquier grado según la forma de aplicación deseada. Todos estos productos HVP imparten un aroma agradable, sabroso y sustancioso.

Los hidrolizados pueden usarse en composiciones alimenticias, cosméticas y/o farmacéuticas o médicas.

5 Por tanto, las composiciones pueden ser bebidas, quesos, dulces, postres, aderezos, bebidas de fruta, productos cárnicos, aperitivos, complementos nutricionales, alimentos, complementos de alimento para animales, dietas médicas, productos para la piel o el cabello, fertilizantes, preparaciones veterinarias, constituyentes para el cultivo *in vitro* de células de mamífero etc.

10 Adicionalmente, los hidrolizados pueden usarse como emulsionantes, estabilizadores de espuma, agentes aglutinantes acuosos, etc. Cuando se usan en el alimento, los hidrolizados obtenidos de acuerdo con la invención pueden usarse como saborizantes alimenticios o como un precursor saborizante alimenticio.

Por tanto, el uso de una mezcla de peptidasas obtenidas de micelios de basidiomicetos para la hidrólisis de proteínas, y en particular gluten y/o sus fracciones, es parte de la presente invención.

15 Las peptidasas de la presente invención catalizan la hidrólisis de proteínas, en particular gluten, a péptidos más grandes y más pequeños y finalmente a aminoácidos. Aunque las proteínas intactas no imparten sabor ni olor a los alimentos, los aminoácidos libres que pueden obtenerse con el método de acuerdo con la presente invención son muy útiles como compuestos saborizantes y precursores saborizantes para el uso en sopas, salsas y muchos tipos de alimentos convenientes. Además, como se ha mencionado, el tratamiento con peptidasas, puede combinarse con  
20 otra enzima que escinde diferentes enlaces peptídicos para mejorar adicionalmente el sabor y/o el aroma de los productos alimenticios.

25 El grado de hidrólisis puede evaluarse visualmente o usando química analítica. El sustrato del gluten es un material blando, pegajoso, que se parece a la goma de mascar. Después de la incubación en un tampón que contenga peptidasa, el material muestra signos típicos de degradación, es decir, se convierte en una dispersión turbia con algunas partículas más grandes y muchas partículas finas y muy finas.

30 La hidrólisis también puede medirse determinando las proteínas libres en la solución, antes y después de la peptidólisis (Figura 8), midiendo el nitrógeno de amino libre en solución (número de Kjeldahl o de formol (Figura 9)), siguiendo la degradación de las proteínas usando SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico) o realizando cromatografía en capa fina seguido de detección con ninhidrina.

35 El grado de hidrólisis de la mezcla de peptidasas de la presente invención, determinado mediante el número de formol, puede variar de 3 a 20 DH (*Degree of Hydrolysis*, grado de hidrólisis), preferentemente de 6 a 19 DH; la proteína soluble total en la dispersión puede variar de al menos 10 %, preferentemente de 19 a 80 %.

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para la producción de una mezcla de peptidasas que comprende la etapa de cultivar micelios de basidiomicetos en un medio de crecimiento que comprenda gluten y/o fracciones del mismo y aislar la mezcla de peptidasas del cultivo.

40 Preferentemente, el gluten y/o fracciones del mismo, es la fuente principal de nitrógeno en el medio de crecimiento.

45 Cuando en el presente método se usan fracciones de gluten, estas pueden ser mayores de 100 kDa, entre 5 y 100 kDa o procesarse en hidrolizados de gluten. El cultivo puede contener una mezcla de cualquiera de estas fracciones de gluten. Estas pueden obtenerse en el comercio o puede producirlas el experto mediante métodos conocidos.

50 Preferentemente, los micelios de basidiomicetos usados en el presente proceso se seleccionan de Himenomicetos. Más preferentemente, se seleccionan de los géneros *Pleurotus*, *Lentinula*, *Agrocybe*, o *Grifola*. Incluso más preferentemente, los basidiomicetos se seleccionan de cepas de *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Agrocybe aegerita*, *Pleurotus floridanus*, o *Grifola frondosa*. Dichas cepas se encuentran disponibles en el comercio a través de colecciones de cultivo convencionales, tales como la DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania).

55 Preferentemente, el cultivo se realiza en un cultivo anegado, durante 1 a 15 días, preferentemente durante 3 a 12 días.

Después del cultivo, la mezcla de peptidasas producida se aísla del cultivo. Puede adicionalmente concentrarse por precipitación y/o centrifugación.

60 Por tanto, la mezcla de peptidasas que puede obtenerse mediante el presente método también forma parte de la presente invención. La ventaja que proporciona dicho método es que la mezcla de peptidasas resultante tiene una afinidad distinta y una eficacia mejorada en la hidrólisis del gluten. La mezcla de peptidasas de acuerdo con la invención tiene una especificidad de sustrato hacia el gluten y/o fracciones del mismo

65 Incluso más sorprendente son las excelentes propiedades de estas enzimas con respecto a convertir el gluten en péptidos más pequeños y finalmente en aminoácidos sencillos. Las mezclas crudas de la enzima peptidasa pueden

hidrolizar muy eficaz y delicadamente fracciones de gluten de 5 a 100 kDa (Figura 1), fracciones de gluten mayores de 100 kDa (Figura 2) y gluten no tratado natural (Figura 3). Además de agua, no se requiere ningún aditivo o co-sustrato. El medio de incubación es simple y puede contener, por ejemplo, 0,5 g de  $\text{MgSO}_4 \text{ L}^{-1}$ , 1,5 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{ L}^{-1}$ , Tween 80 al 0,4 % y una solución de elementos traza.

Las nuevas peptidasas poseen una temperatura óptima amplia, entre 40 y 60 °C y un pH óptimo del mismo modo amplio, entre un pH de 4,5 y 7, tal como se determina mediante el ensayo clásico con azocaseína (Figura 4 y 5). Los puntos isoeléctricos cubren un intervalo de 4 a 10, y las masas moleculares de las diversas enzimas varían de por debajo de 30 kDa a más de 100 kDa, tal como se determina usando electroforesis IEF (electroforesis en gel con isoelectroenfoque) y gel de poliacrilamida natural (PAGE) (Figuras 1, 2, 3 y 6). Estudios de inhibición específicos han mostrado que la mayoría de las isoenzimas son serina y aspartato peptidasas, pero algunas isoenzimas no podían asignarse a uno de los tipos clásicos (Figura 7).

Las secuencias parciales únicas de dos representantes de las nuevas peptidasas inducidas por gluten se determinaron por análisis ESI-MS (*electrospray ionisation mass spectrometry*, espectroscopia de masas con ionización por electropulverización) (Tabla 1). Las mejores homologías se descubrieron con las serina peptidasas de *Agaricus bisporus* (Champiñón). Por tanto, se confirmó la clasificación de las nuevas enzimas para las peptidasas, una sub-clase de las hidrolasas (EC 3.4.XX).

**Tabla 1** Secuencias parciales de peptidasas en *Grifola frondosa* (Gfr) y *Pleurotus floridanus* (Pfl)

	[kDa]	homólogo a	e
Gfr	29		
DGNASPASLSTK		serina proteasa ( <i>A. bisporus</i> )	16
QLSGLPSGTLNDLAR		peptidasa de péptido señal	50
Pfl	28		
TVQTNAPWGLSR		serina proteasa ( <i>A. bisporus</i> )	1,6
APSALTVGASTLTDTR		precursor de serina proteinasa ( <i>A. bisporus</i> )	16

La presente invención se describe adicionalmente en el presente documento a modo de ilustración en los siguientes ejemplos no limitantes.

## Ejemplos

En los siguientes ejemplos, se usaron los siguientes materiales y métodos.

### Materiales y métodos

#### Concentración del sobrenadante de cultivo

Para concentrar los péptidos secretados, el sobrenadante de cultivo se precipitó con etanol en una concentración total del 80 % durante 3 horas a -20 °C. El precipitado se centrifugó a 4 °C durante 20 minutos a 12.000xg y se conservó a -20 °C.

#### Caracterización enzimática bioquímica

La caracterización bioquímica de las peptidasas comprende la determinación del pH y temperatura óptimos, del punto isoeléctrico por IEF con tinción de actividad (Figura 6), y un análisis de peso molecular por SDS-PAGE.

#### SDS-PAGE y PAGE natural

Se realizaron análisis de SDS-PAGE en un gel de separación de poliacrilamida al 12 %. Las muestras se prepararon mezclando 20 µl de solución enzimática y 20 µl de tampón de carga [Tris/HCl 0,1 M (pH 6,8), DTT 0,2 M, SDS al 4 %, glicerol al 20 %, azul de bromofenol al 0,2 %] e hirviendo durante 15 minutos. Después de la electroforesis a 20 mA por gel, los geles se tiñeron con plata o con Coomassie. Para las determinaciones moleculares, se usaron proteínas marcadoras de 250 a 10 kDa (BioRad, Alemania). Se realizó PAGE natural en condiciones no desnaturizantes. El gel de separación contenía gelatina porcina al 0,04 %. Las muestras se prepararon mezclando 1:1 (v/v) con tampón de carga [Tris/HCl 0,05 M (pH 6,0), SDS al 2 %, glicerol al 10 %, azul de bromofenol al 0,1 %]. Después de la electroforesis a 10 mA por gel y a 8 °C, los geles se lavaron 2 veces en Triton X-100 al 2,5 %. Después de la incubación en tampón  $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M (pH 6) durante 14 a 18 horas a 30 °C los geles se tiñeron con Coomassie. La actividad enzimática apareció como bandas blancas en un fondo azul.

## Isoelectroenfoque

Se realizó electroforesis en gel de poliacrilamida con IEF en un sistema Multiphor II (Pharmacia LKB, Suecia) usando geles precolados Servalyt™ Precotes™ con un gradiente de pH inmovilizado de 3 a 10 (Serva, Alemania) durante 3.500 V h (2000 V, 6 mA, 12 W). Los puntos isoeléctricos de las peptidasas fueron 5 calculados usando una mezcla de ensayo de proteína de pl de 3,5 a 10,7 (Serva, Alemania). Los geles se tiñeron con Coomassie, plata o actividad. Para la tinción de actividad, se desarrolló un gel de gelatina porcina y agarosa en capas. Se disolvió agarosa (2 %) en tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 6) en ebullición. Se añadieron volúmenes equivalentes de gelatina porcina al 0,04 % en tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 6). Después del enfoque, el gel IEF se incubó sobre las capas a 30 °C durante 14 a 18 horas, y el gel en capas se tiñó con Coomassie. La actividad enzimática apareció como bandas blancas sobre un fondo azul.

## Ensayo de actividad

La solución sustrato consistía en 0,5 % de azocaseína en tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M a pH 6. La actividad enzimática se midió a 37 °C en un volumen total de 2 ml que contenía 100 µl de sustrato y 300 µl de tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (0,1 M, pH 6). La reacción comenzó con la adición de 100 µl de solución enzimática. Dependiendo de la actividad enzimática la reacción se detuvo después de 15 a 30 minutos con 1,5 ml de ácido tricloro acético (3 %). Las muestras se conservaron en hielo durante 10 min y se centrifugaron a 11.600xg durante 10 minutos. La absorbancia del sobrenadante se midió a 366 nm usando un fotómetro espectral. Se preparó un blanco con solución enzimática termo-inactivada. La actividad enzimática se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación

$$A \text{ (U ml}^{-1}\text{)} = \frac{\Delta E_{60}}{0,01V_s t}$$

en la que U es la actividad enzimática que cataliza la hidrólisis de la azocaseína expresada como la diferencia en absorbancia por hora. ΔE es la diferencia en absorbancia entre el blanco y la muestra, V<sub>s</sub> es el volumen de la muestra (ml), y t es el tiempo de incubación (min).

## Temperatura y pH óptimos

La determinación de la temperatura y pH óptimos de las peptidasas secretadas se realizó con soluciones enzimáticas recogidas el día de cultivo de máxima actividad. En primer lugar, la temperatura óptima (Figura 5) se realizó a un pH de 6,0 con tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M como se ha descrito anteriormente. A una temperatura óptima de 50 °C las variaciones de pH variaron de 4,5 a 8,0 (Figura 4).

## Mecanismo catalítico

Para determinar el mecanismo catalítico, se realizó análisis PAGE natural como se ha mencionado anteriormente con modificaciones en las técnicas de preparación de muestras. La solución enzimática se mezcló con PMSF (fenilmetil sulfonil fluoruro) 1 mM, EDTA 10 mM (ácido etilendiaminotetraacético), aprotinina 1 mM y pepstatina A 1 mM, respectivamente. Las muestras se incubaron después durante 30 minutos a 4 °C antes de la electroforesis.

## Análisis MS-ESI en tándem de péptidos tripticos

Las bandas de peptidasa se escindieron de los geles de poliacrilamida SDS, se secaron y se digirieron con tripsina. Los péptidos resultantes se extrajeron y se purificaron de acuerdo con protocolos convencionales. Se usó un espectrómetro de masas QTOF II (Micromass, R. U.) equipado con una fuente de nanopulverización de iones y capilares cubiertos de oro para la MS con ionización por electropulverización (ESI) de péptidos. Para los experimentos de disociación inducida por colisión, los múltiples iones parentales cargados se transmitieron selectivamente desde el analizador de masas de cuadrupolo al interior de la célula de colisión (25-30 eV). Los iones hijos resultantes se separaron mediante un analizador de masas de tiempo de vuelo ortogonal. Las huellas peptídicas de masa obtenidas del análisis de MS-ESI en tándem se usaron para la identificación de proteínas interespecie en bases de datos de secuencias primarias de proteínas públicas (Tabla 1).

## Experimentos de hidrólisis

Se suspendieron 0,5 g de gluten en 20 ml de tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 6,0). Después de la adición de 18,9 kU de preparación enzimática, la muestra se incubó durante 18 h a 40 y 50 °C, respectivamente, a 110 rpm en un baño con agua y se centrifugó a 3.000xg durante 15 min a 4 °C. La hidrólisis se detuvo conservando el sobrenadante a 4 °C. Para calcular el grado de hidrólisis se usaron los siguientes métodos de análisis:



Proteína libre

La concentración de proteína en el sobrenadante de hidrólisis se calculó de acuerdo con el método de *Lowry* usando albúmina de suero bovino como patrón.

5 Número de formol

10 La valoración del número de formol en el sobrenadante de la hidrólisis se realizó en un valorador easy Titroline (Schott, Alemania). De 3 a 10 ml de la solución experimental se ajustaron a un pH de 8,1 con NaOH 0,1 M. Después se añadieron 10 ml de solución de formalina (pH 8,1, 35-37 %). Después de 1 minuto la muestra se valoró con NaOH 0,1 M a pH 8,1. El número de formol se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación

$$\text{Número de formol} = \frac{V_{\text{NaOH}} 100}{V_s}$$

15 en la que  $V_s$  es el volumen de muestra (ml) y  $V_{\text{NaOH}}$  es el volumen NaOH 0,1 M (ml) valorado.

Análisis de Kjeldahl

20 La determinación de nitrógeno en el sobrenadante de hidrólisis se realizó en una Unidad de Digestión K-424 y en una unidad de destilación K-350 (Büchi, Suiza) de acuerdo con protocolos convencionales. El amoníaco de 1 a 5 ml de solución experimental se capturó mediante un exceso de HCl 0,1 M en el matraz receptor. La retrovaloración del volumen no consumido de la solución ácida se neutralizó con NaOH 0,1 M usando un valorador easy Titroline. La cantidad de nitrógeno se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación

$$\text{nitrógeno (\%)} = \frac{(V_{\text{HCl}} - V_{\text{NaOH}}) 0,1 20 100}{V_s n_{\text{gluten}}}$$

25 en la que  $V_s$  es el volumen de muestra (ml) y  $n_{\text{gluten}}$  es la cantidad total de nitrógeno (4,62 mmol) en 0,5 g de gluten.

30 Cromatografía en capa fina con aminoácidos (AA-TLC)

35 Para la separación con TLC (*Thin Layer Chromatography*), 7  $\mu\text{l}$  del sobrenadante de hidrólisis se aplicaron en mancha sobre una placa de aluminio recubierta con gel de sílice (20 cm x 20 cm). Después, la placa se colocó en una cámara con n-butanol/ácido acético/agua (70:20:30 v/v/v) durante 4 horas. La detección de los aminoácidos se realizó pulverizando el reactivo ninhidrina (0,4 g de acetona 100 ml<sup>-1</sup>) seguido de una incubación a 100 °C hasta que aparecieron manchas de color. Los aminoácidos generados se identificaron por comparación con compuestos de referencia.

Ejemplo 1 - Peptidasas de seis basidiomicetos.

40 Cultivo de basidiomicetos

45 Todos los medios y equipos se esterilizaron en el autoclave antes de su uso y a lo largo del procedimiento se aplicaron técnicas estériles convencionales. Los pre-cultivos de basidiomicetos (Tabla 2) se desarrollaron durante siete días en medio nutriente convencional (monohidrato de glucosa 30 g.l<sup>-1</sup>, extracto de levadura 3 g.l<sup>-1</sup>, monohidrato de asparagina 4,5 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0,5 g.l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 g.l<sup>-1</sup>, solución de elementos traza 1 ml, pH 6,0 [FeCl<sub>3</sub> 0,08 g.l<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub> 0,09 g.l<sup>-1</sup> x 7 H<sub>2</sub>O, CuSO<sub>4</sub> 0,005 g.l<sup>-1</sup> x 5 H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub> 0,027 g.l<sup>-1</sup>, Titriplex III 0,4 g.l<sup>-1</sup>]) a 150 rpm y a 24 °C.

50 Veinte ml del cultivo micelar se separaron por centrifugación (10 min, 3.000xg, 4 °C) y se lavaron 2 veces con 20 ml de medio salino mineral (MM) (MgSO<sub>4</sub> 0,5 g.l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 g.l<sup>-1</sup>, solución de elementos traza 1 ml, pH 6,0), que carecía de fuente de carbono y de nitrógeno adicional. Para los cultivos principales, 250 ml de MM reciente se inocularon con 20 ml de los micelios prelavados.

Tabla 2 Basidiomicetos cultivados para las exploraciones enzimáticas		
Cepa		Fuente
<i>Pleurotus sapidus</i>	Psa	DSMZ 8266
<i>Pleurotus eryngii</i>	Per	DSMZ 366.47
<i>Grifola frondosa</i>	Gfr	DSMZ 480.63
<i>Pleurotus floridanus</i>	Pfl	Göttingen No. 17

Cepa		Fuente
<i>Agrocybe aegerita</i>	Aae	Sylvan 4021
<i>Lentinula edodes</i>	Led	A 20-5

#### Inducción enzimática

5 Para inducir la secreción enzimática en el medio de crecimiento, a los cultivos principales se añadieron, una fracción de hidrolizado estéril de 5 a 100 kDa, una fracción más grande de 100 kDa e hidrolizado del proceso, respectivamente. En el caso de inducción con gluten se preparó MM con 4 % de gluten. Después de 3 a 12 días, el micelio se separó por filtración y el sobrenadante que contenía enzima extracelular se empleó para las conversiones enzimáticas.

#### 10 Ejemplo 2 - Preparación enzimática usando *Grifola fondrosa*

Después de 6 días de cultivo con gluten al 4 %, el cultivo de *Gfr* se filtró y el sobrenadante que contenía enzima extracelular (200 ml) se precipitó con 800 ml de etanol (96 %), se conservó durante 3 horas a -20 °C, y se centrifugó a 12.000xg durante 20 minutos. Una alícuota del sedimento se resuspendió en tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 6,0) durante 30 minutos a 4 °C y se midió la actividad del sobrenadante.

La mayor parte de la actividad hidrolítica originalmente presente se recuperó, indicando que este protocolo generaba un concentrado enzimático útil.

#### 20 Ejemplo 3 - Experimentos de hidrólisis

Se suspendieron 0,5 g de gluten en 20 ml de tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 6,0), se añadieron 18,9 kU del sedimento de peptidasa de *Pfl* (*Pleurotus florida*) y la muestra se incubó durante 18 h a 40 °C a 110 rpm en un baño con agua. Se centrifugó a 3.000xg durante 15 minutos a 4 °C. Se preparó un blanco con preparación enzimática termoinactivada. Para el análisis de Kjeldahl se aplicaron 5 ml del sobrenadante y 7 µl para la AA-TLC. Para visualizar la hidrólisis de las proteínas, se realizó SDS-PAGE de las muestras.

Esta prueba analítica indica una hidrólisis enzimática progresiva del sustrato complicado, gluten de trigo.

#### 30 Ejemplo 4 - Experimentos de hidrólisis con gluten

Se suspendieron 0,5 g de gluten en 20 ml de tampón K<sub>3</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 6,0), se añadieron 18,9 kU del sedimento de peptidasa obtenido de *Gfr* y la muestra se incubó durante 18 h a 40 °C a 110 rpm en un baño con agua. Se centrifugó a 3.000xg durante 15 minutos a 4 °C. Se preparó un blanco con preparación enzimática termoinactivada. Se aplicaron 3 ml del sobrenadante para la valoración de formol y 20 µl para la determinación de proteína. Para visualizar la hidrólisis de las proteínas, se realizó SDS-PAGE de las muestras. Esto confirmó la hidrólisis enzimática del gluten mediante un método analítico alternativo.

#### 40 Ejemplo 5 - Experimentos de hidrólisis con preparación enzimática combinada

Se suspendieron 0,5 g de gluten en 20 ml de tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 6,0), se añadieron 18,9 kU de sedimento de peptidasa de *Gfr* y *Pfl*, y las muestras se incubaron durante 18 horas a 40 °C a 110 rpm en un baño con agua. Se centrifugó a 3000xg durante 15 min a 4 °C. Se preparó un blanco con preparación enzimática termoinactivada. Se aplicaron 5 ml del sobrenadante para el análisis de Kjeldahl, 3 ml para la valoración de formol, 7 µl para la AA-TLC y 20 µl para la determinación de proteína. Para visualizar la hidrólisis de las proteínas, se realizó SDS-PAGE de las muestras.

Así pues, el uso de una mezcla de enzimas produjo una hidrólisis rápida del gluten.

#### 50 Ejemplo 6 - Experimentos de hidrólisis con una fracción > 100 kDa

Se suspendieron 250 µl de una fracción de proteína > 100 kDa en 2 ml de tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M (pH 6,0), se añadieron 1,9 kU de un sedimento de peptidasa de la presente invención, y la muestra se incubó durante 18 h a 50 °C a 110 rpm en un baño con agua. Se centrifugó a 3.000xg durante 15 min a 4 °C. Se preparó un blanco con preparación enzimática termoinactivada. Se aplicaron 2 ml del sobrenadante para la valoración de formol, 7 µl para la AA-TLC y 20 µl para la determinación de proteína. Para visualizar la hidrólisis de las proteínas, realizó SDS-PAGE de las muestras.

60 Esto confirmó que las nuevas enzimas eran útiles para la degradación (hidrólisis) de incluso materia de proteína insoluble.

Ejemplo 7 - Experimentos de hidrólisis con hidrolizado de proceso natural

- 5 Se suspendieron 250 µl de hidrolizado de proceso natural en 2 ml de tampón K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 01 M (pH 6,0), se añadieron 1,9 kU de un sedimento de peptidasa de la presente invención, y la muestra se incubó durante 18 h a 50 °C a 110 rpm en un baño con agua. Se centrifugó a 3.000xg durante 15 min a 4 °C. Se preparó un blanco con preparación enzimática termoinactivada. Se aplicaron 2 ml del sobrenadante para la valoración de formol, 7 µl para la AA-TLC y 20 µl para la determinación de proteína. Para visualizar la hidrólisis de las proteínas, realizó SDS-PAGE de las muestras.
- 10 Esto confirmó que las nuevas enzimas eran útiles para la degradación (hidrólisis) del hidrolizado natural como ocurre durante los procesos de fabricación.

Ejemplo 8 – extracción de aroma y análisis de CG

- 15 Después de la hidrólisis de una cualquiera de las fracciones de gluten o de gluten puro, la muestra se centrifugó a 3.000xg durante 15 min a 4 °C y el sobrenadante se extrajo 3 veces con el volumen equivalente de pentano/éter. Las fracciones orgánicas recogidas se secaron y se concentraron. 1 µl de la muestra previamente preparada, que presentó un olor salado, se inyectó en el Cromatógrafo de Gases (CG), y la presencia de aromas volátiles se demostró usando un detector de ionización de llama.
- 20 Por tanto, el proceso descrito generó un producto que poseía aroma.

LISTADO DE SECUENCIAS

25 <110> Nestec S.A. Linke, Diana Krings, Ulrich Zorn, Holger Berger, R.G. Rabe, Swen Ulmer, Helge

<120> Peptidasas de Basidiomicetos

30 <130> NO 8301/WO

<150> EP07008458.7

<151> 25-04-2007

35 <160> 6

<170> Patent In versión 3.3

40 <210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> *Grifola frondosa*

45 <400> 1

**Asp Gly Asn Ala Ser Pro Ala Ser Leu Ser Thr Lys**  
**1 5 10**

50 <210> 2

<211> 15

<212> PRT

<213> *Grifola frondosa*

55 <400> 2

**Gln Leu Ser Gly Leu Pro Ser Gly Thr Leu Asn Asp Leu Ala Arg**  
**1 5 10 15**

60 <210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> *Grifola frondosa*

ES 2 530 760 T3

<400> 3

Thr Val Gln Thr Asn Ala Pro Trp Gly Leu Ser Arg  
 1 5 10

5 <210> 4  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Grifola frondosa*

10 <400> 4

Ala Pro Ser Ala Leu Thr Val Gly Ala Ser Thr Leu Thr Asp Thr Arg  
 1 5 10 15

15 <210> 5  
 <211> 1161  
 <212> ADN  
 <213> *Pleurotus ostreatus*

20 <400> 5

atgegtctct tctctgctgt tcttgcattc ctcgccatct tggctcctgc ctttcccgt 60  
 cctgctttga agacggtcga gagcttcgcc ggacagcgca acgatggcag tttcatcgtc 120  
 aagctcaagt ctggcgcatt ccgaagtggg ctctcaaga ccctggcgt caacgcaacc 180  
 cactgagtg acgcagccct caacgcttt gctggtaaat tctcggagaa ggcgttgaat 240  
 gctctgcgcg cctcccctga tctcagatcc atctcagagg atggtatcat gcacacattc 300  
 gtcacccaga ccaacgctcc ttggggactg tctcggttga cttccgcgac ccgctcacc 360  
 aacacgaacg ttgccgcatt gactttcaca tacacctacg acgcctccgc tggcagtggt 420  
 gttgatgtct tcgctcgcga caccggtatc ttcaccagcc actctcagtt cggtggccgt 480  
 gcccgctggg gtgctacatt tggacctac gccgatgctg acggcaatgg tcacggctact 540  
 cattgcgctg gtaccatcgg tggtagccaa tttggtgctg ccaagagcgt caacctcatt 600  
 gccgtgaaag ttctcagcga cgggtgatct ggctcggttg ctgatatcgt ctctggcctt 660  
 aacttcgtcc tgctctctgc tcgctcttct ggccgccctt ccatcgtctc gatgagtctc 720  
 ggtggtggtg cttccactgc cttggacaac gccgttgctt ctctcacggc gggtgagatc 780  
 catgtcgtag ttgccgcggg taactctaac gttgatgctg gcaccacctc cctgctcgt 840  
 gccccctctg ccatcactgt cggagcatct accatcactg aactcagagc ctctttctct 900  
 aacttcggtc cgtcgttga tgtcttcgct cctggccaag atgtcatcag ctcttgatc 960  
 ggcagcacca ccgcaaccaa cagaatctct ggaacttcca tggctacccc ccatgttget 1020  
 ggcttgccg cctacctcat cgcctcaac ggtaactcat cccctgccgc cctatcgacc 1080  
 accatcaaga gtttgcctt gaaggggtgc ctgagcggta ttccttcggg cactctcaac 1140  
 gacttggtc accacgctta a 1161

25 <210> 6  
 <211> 386  
 <212> PRT  
 <213> *Pleurotus ostreatus*

<400> 6

ES 2 530 760 T3

Met Arg Leu Phe Ser Ala Val Leu Ala Ser Leu Ala Ile Leu Ala Pro  
 1 5 10 15

Ala Phe Ala Ala Pro Ala Leu Lys Thr Val Glu Ser Phe Ala Gly Gln  
 20 25 30

Arg Asn Asp Gly Ser Phe Ile Val Lys Leu Lys Ser Gly Ala Ser Arg  
 35 40 45

Ser Gly Leu Leu Lys Thr Leu Gly Val Asn Ala Thr His Glu Trp Asp  
 50 55 60

Ala Ala Leu Asn Gly Phe Ala Gly Lys Phe Ser Glu Lys Ala Leu Asn  
 65 70 75 80

Ala Leu Arg Ala Ser Pro Asp Val Glu Ser Ile Ser Glu Asp Gly Ile  
 85 90 95

Met His Thr Phe Val Thr Gln Thr Asn Ala Pro Trp Gly Leu Ser Arg  
 100 105 110

Leu Thr Ser Ala Thr Arg Leu Thr Asn Thr Asn Val Ala Ala Leu Thr  
 115 120 125

Phe Thr Tyr Thr Tyr Asp Ala Ser Ala Gly Ser Gly Val Asp Val Phe  
 130 135 140

Val Val Asp Thr Gly Ile Phe Thr Ser His Ser Gln Phe Gly Gly Arg  
 145 150 155 160

Ala Arg Trp Gly Ala Thr Phe Gly Pro Tyr Ala Asp Ala Asp Gly Asn  
 165 170 175

Gly His Gly Thr His Cys Ala Gly Thr Ile Gly Gly Ser Gln Phe Gly  
 180 185 190

Val Ala Lys Ser Val Asn Leu Ile Ala Val Lys Val Leu Ser Asp Gly  
 195 200 205

Gly Ser Gly Ser Val Ala Asp Ile Val Ser Gly Leu Asn Phe Val Leu  
 210 215 220

Ser Ser Ala Arg Ser Ser Gly Arg Pro Ser Ile Val Ser Met Ser Leu  
 225 230 235 240

ES 2 530 760 T3

Gly Gly Gly Ala Ser Thr Ala Leu Asp Asn Ala Val Ala Ser Leu Thr  
245 250 255

Ala Gly Gly Val His Val Val Val Ala Ala Gly Asn Ser Asn Val Asp  
260 265 270

Ala Gly Thr Thr Ser Pro Ala Arg Ala Pro Ser Ala Ile Thr Val Gly  
275 280 285

Ala Ser Thr Ile Thr Asp Thr Arg Ala Ser Phe Ser Asn Phe Gly Ser  
290 295 300

Val Val Asp Val Phe Ala Pro Gly Gln Asp Val Ile Ser Ser Trp Ile  
305 310 315 320

Gly Ser Thr Thr Ala Thr Asn Arg Ile Ser Gly Thr Ser Met Ala Thr  
325 330 335

Pro His Val Ala Gly Leu Ala Ala Tyr Leu Ile Ala Leu Asn Gly Asn  
340 345 350

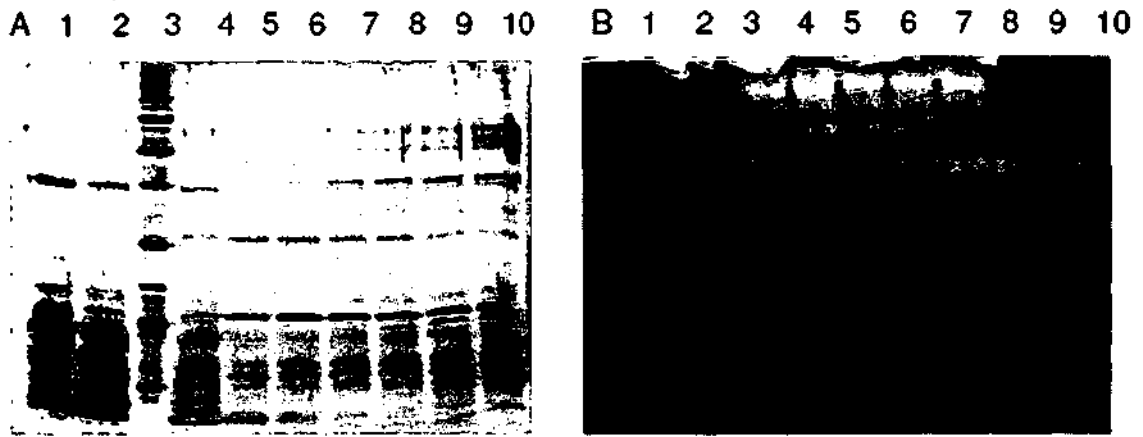
Ser Ser Pro Ala Ala Leu Ser Thr Thr Ile Lys Ser Leu Ser Leu Lys  
355 360 365

Gly Val Leu Ser Gly Ile Pro Ser Gly Thr Leu Asn Asp Leu Ala His  
370 375 380

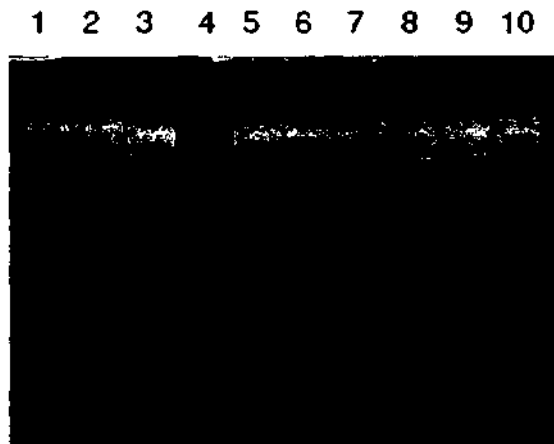
His Ala  
385

**REIVINDICACIONES**

1. Método para producir hidrolizados de proteína y/o fracciones de la misma, que comprende las etapas de:
- 5 a. proporcionar una mezcla de peptidasas obtenida de micelios de Basidiomicetos cultivados en un cultivo anegado,  
b. añadir la mezcla a un sustrato que contenga dicha proteína y/o fracciones de la misma y  
c. realizar la hidrólisis de dicha proteína y/o fracciones de la misma para obtener dichos hidrolizados;
- 10 en el que la mezcla de peptidasas comprende al menos una peptidasa que comprende la secuencia proporcionada en las SEC ID Nos 1, 2, 3 o 4.
2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la proteína se selecciona de gluten, suero, soja, preferentemente gluten.
- 15 3. Método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que las peptidasas son enzimas extracelulares.
4. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que los Basidiomicetos se seleccionan de Himenomicetos.
- 20 5. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que los Basidiomicetos se seleccionan de los géneros *Pleurotus*, *Lentinula*, *Agrocybe* o *Grifola*.
- 25 6. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los Basidiomicetos se seleccionan de las cepas de *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Agrocybe aegerita*, *Pleurotus floridanus* o *Grifola frondosa*.
7. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que los hidrolizados son péptidos y/o aminoácidos.
- 30 8. Uso de una mezcla de peptidasas obtenidas de micelios de Basidiomicetos para la hidrólisis de gluten y/o fracciones del mismo, en el que la mezcla de peptidasas comprende al menos una peptidasa que comprende la secuencia proporcionada en las SEQ ID Nos 1, 2, 3 o 4.
- 35 9. Uso de hidrolizados obtenidos mediante un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en una composición alimenticia, una composición cosmética y/o una composición farmacéutica o médica.
10. Uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la composición es una bebida, quesos, dulces, postres, aderezos, bebidas de fruta, productos cárnicos, aperitivos, complementos nutricionales, alimentos, complementos de alimento para animales, dietas médicas, productos para la piel o el cabello, fertilizantes, preparaciones veterinarias, constituyentes para el cultivo *in vitro* de células de mamífero etc.
- 40 11. Mezcla de peptidasas, en la que dicha mezcla se produce por micelios de Basidiomicetos, preferentemente de Himenomicetos, y en la que al menos una peptidasa comprende la secuencia proporcionada en las SEC ID Nos 1, 2, 3 o 4.
- 45 12. Mezcla de peptidasas de acuerdo con la reivindicación 11, en la que los Basidiomicetos se seleccionan de los géneros *Pleurotus*, *Lentinula*, *Agrocybe*, o *Grifola*, preferentemente seleccionado a partir de cepas de *Pleurotus sapidus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus*, *ostreatus*, *Lentinula edodes*, *Agrocybe aegerita*, *Pleurotus floridanus* o *Grifola frondosa*.
- 50 13. Mezcla de peptidasas de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, teniendo dicha mezcla una eficacia de conversión de 3 a 20 DH, preferentemente de 6 a 19 DH.

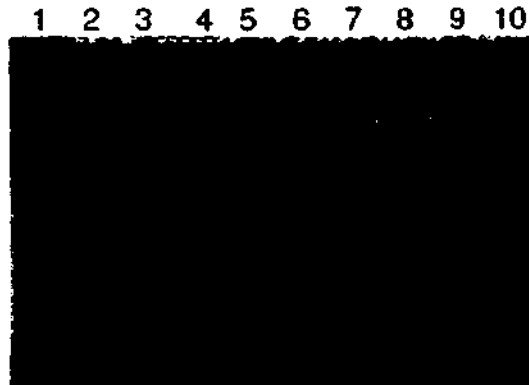


**Figura 1** Gel teñido con plata (A) y gel teñido con actividad (B) de las proteínas (A) y peptidasas (B) secretadas por *Agrocybe aegerita* durante ocho días de cultivo de la presente invención. Carril 1: día de cultivo 0; Carril 2: día de cultivo 1; Carril 3: marcador molecular; Carriles 4 a 10: días de cultivo 3 a 8.

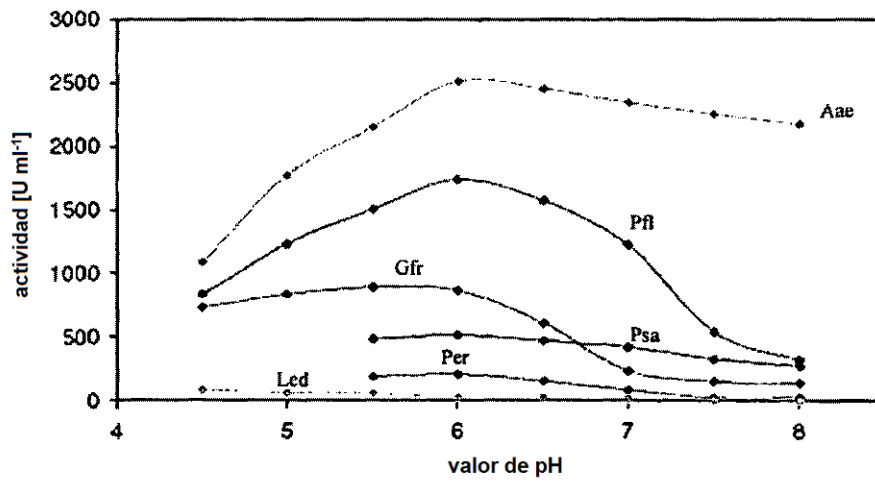


**Figura 2** Gel teñido con actividad de peptidasas de *Pleurotus eryngii* cultivado en una fracción de gluten mayor de 100 kDa. Carriles 1 a 3: días de cultivo 1 a 3; Carril 4: marcador molecular; Carriles 5 a 10: días de cultivo 4 a 9.

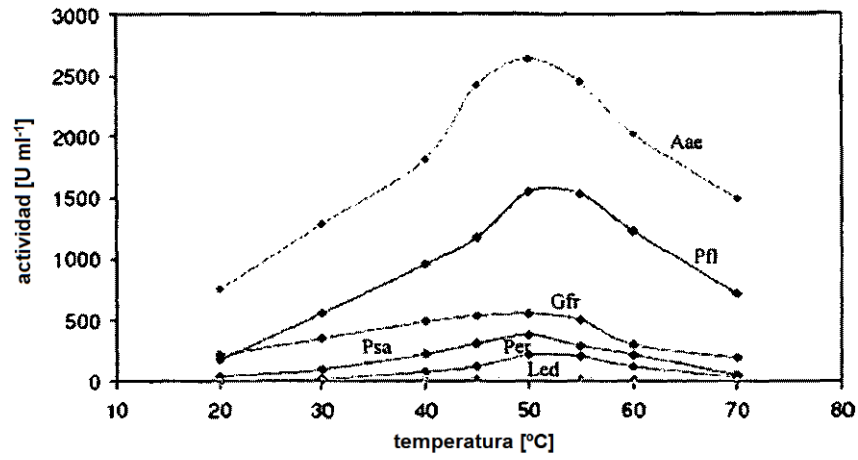




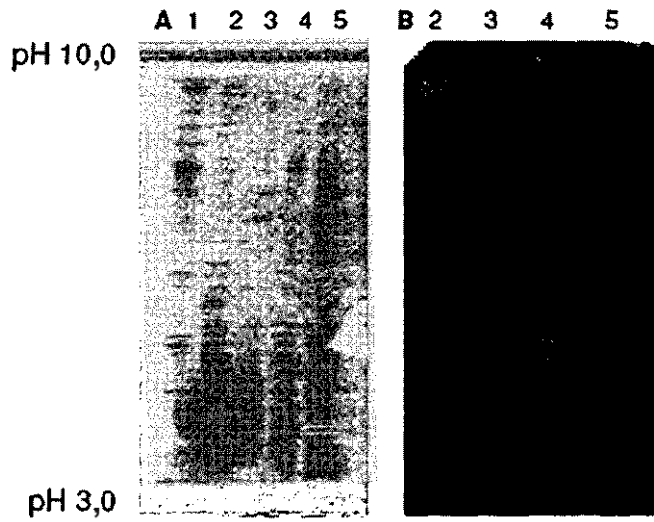
**Figura 3** Gel teñido con actividad de peptidasas de *Grifola frondosa* cultivada en gluten puro. Carril 1: día de cultivo 0; Carril 2: marcador molecular; Carriles 3 a 10: días de cultivo 1 a 8.



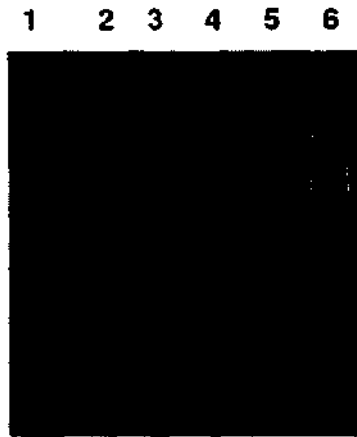
**Figura 4** Determinación del pH óptimo de las mezclas de peptidasas secretadas por las seis especies de basidiomicetos.



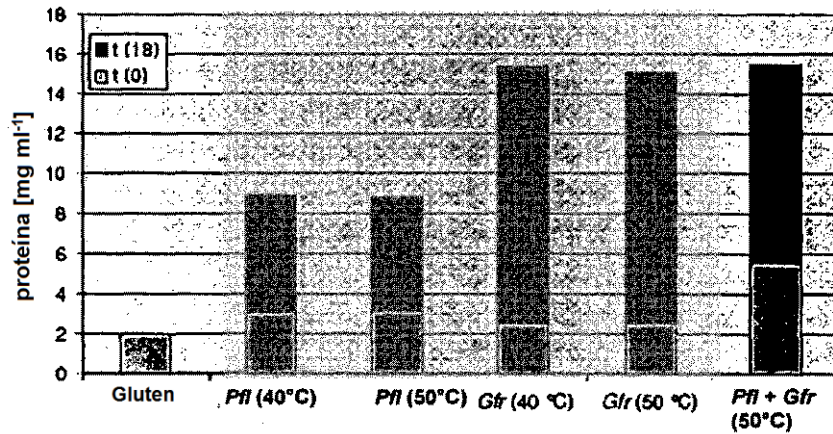
**Figura 5** Determinación de la temperatura óptima de las mezclas de peptidasas secretadas por las seis especies de basidiomicetos.



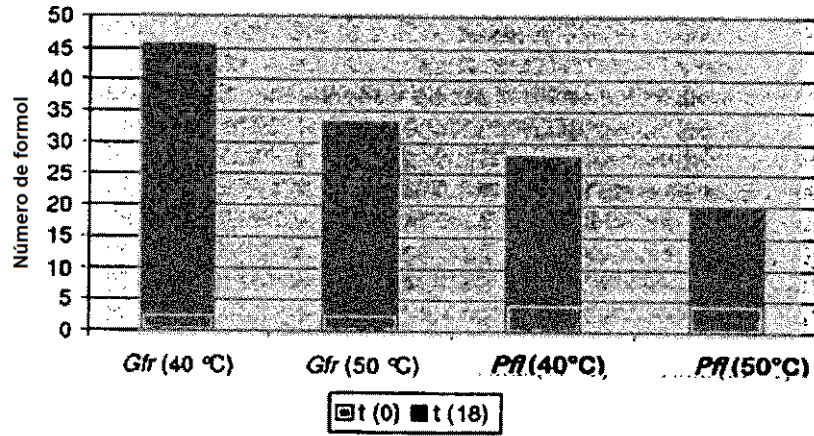
**Figura 6** IEF de secretoma (A) y peptidasas (B) de *Pleurotus sapidus* (carril 2), *Pleurotus eryngii* (carril 3), *Grifola frondosa* (carril 4), y *Lentinula edodes* (carril 5). Gel teñido con Coomassie (A, marcador pl (carril 1)) y gel teñido con actividad (B)



**Figura 7** Evaluación del mecanismo de catálisis de la peptidasa de *Pleurotus sapidus* usando tinción de actividad en presencia de inhibidores. Carril 1: marcador molecular; Carril 2: solución enzimática (se); Carril 3: se + PMSF 1 mM; Carril 4: se + EDTA 10 mM; Carril 5: se + Pepstatina A 1 mM; Carril 6: se + Aprotinina 1 mM



**Figura 8** Proteína libre liberada por las peptidasas de *Pleurotus floridanus* (Pfl) y de *Grifola frondosa* (Gfr).



**Figura 9** Número de hidrolizados de formol producidos usando peptidasas crudas de *Pleurotus floridanus* (Pfl) y de *Grifola frondosa* (Gfr).