

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 539 006**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/20** (2006.01)

**C12N 15/55** (2006.01)

**C12P 7/64** (2006.01)

**A23C 9/13** (2006.01)

**A21D 2/26** (2006.01)

**C11B 3/00** (2006.01)

**C11C 3/00** (2006.01)

**C12N 9/10** (2006.01)

**A21D 8/04** (2006.01)

**A23J 7/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2005 E 05773820 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 1776455**

54 Título: **Enzima lipolítica, usos de la misma en la industria alimentaria**

30 Prioridad:

**16.07.2004 GB 0416035**

**26.07.2004 US 591185 P**

**07.07.2005 GB 0513859**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**25.06.2015**

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS**

**(100.0%)**

**Langebrogade 1, Postboks 17**

**1001 Copenhagen K., DK**

72 Inventor/es:

**MIASNIKOV, ANDREI;**

**SØE, JØRN BORCH;**

**MIKKELSEN, JØRN DALGAARD;**

**POVELAINEN, MIRA y**

**PITKANEN, VIRVE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 539 006 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

Enzima lipolítica, usos de la misma en la industria alimentaria

## 5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una nueva enzima lipolítica, en particular una nueva enzima lipolítica, y secuencias de nucleótidos que codifican la misma. La presente invención también se refiere a métodos de producción de la nueva enzima lipolítica y a usos de la misma. La presente invención también se refiere a métodos y

10 usos de una enzima lipolítica.

## ANTECEDENTES TÉCNICOS

15 El uso beneficioso de enzimas lipolíticas activas sobre glucolípidos en la fabricación de pan se mostró en el documento EP 1 193 314. Se mostró que los productos de hidrólisis parcial, los lisoglucolípidos, se descubrió que tenían funcionalidad emulsionante muy elevada. Sin embargo, también se descubrió que las enzimas mostradas en el documento EP 1 193 314 tenían significativa actividad no selectiva sobre triglicéridos que provocaba un contenido de ácidos grasos libres innecesariamente elevado.

20 Una enzima lipolítica de *Fusarium oxysporum* que tiene actividad fosfolipasa se ha mostrado en el documento EP 0 869 167. Esta enzima lipolítica tiene alta actividad de hidrólisis de triacilglicéridos (lipasa). Esta enzima ahora se vende por Novozymes A/S (Dinamarca) como Lipopan F<sup>TM</sup>.

25 El documento WO02/00852 describe cinco enzimas lipasa y sus polinucleótidos codificantes, aislados de *Fusarium venenatum*, *F. sulphureum*, *Aspergillus berkeleyanum*, *F. culmorum* y *F. solani*. Las cinco enzimas se describen como con actividad hidrolizante de triacilglicerol, fosfolipasa y actividad galactolipasa.

30 Se han producido variantes de enzima lipolítica, con sustituciones de aminoácidos específicas y fusiones; algunas de las cuales tienen actividad potenciada sobre los lípidos polares en comparación con las enzimas precursoras de tipo silvestre. El documento WO01/39602 describe dicha variante, mencionada como SP979, que es una fusión de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*, y la lipasa de *Fusarium oxysporum* descrita en el documento EP 0 869 167. Se ha descubierto que esta variante tiene una proporción significativamente elevada de actividad sobre fosfolípidos y glucolípidos en comparación con triglicéridos.

35 En el documento WO02/094123 se descubrió que mediante la selección de enzimas lipolíticas que eran activas sobre los lípidos polares (glucolípidos y fosfolípidos) en una masa, pero sustancialmente no activas sobre triglicéridos o 1-mono-gliceridos, podía conseguirse una funcionalidad mejorada.

40 En la solicitud PCT en trámite junto con la presente número PCT/IB2005/00875, publicación número WO 2005087918, se muestran enzimas lipolíticas de tipo silvestre que tienen una proporción mayor de actividad sobre lípidos polares en comparación con triglicéridos. Sin embargo, este documento no muestra enzimas lipolíticas de especies *Streptomyces*, *Thermobifida* o *Corynebacterium*.

45 Previo a la presente invención, no se habían publicado enzimas lipolíticas que tuvieran actividad o actividad significativa sobre glucolípidos de especies *Streptomyces*. Asimismo, no se habían publicado enzimas lipolíticas que tuvieran actividad o actividad significativa sobre glucolípidos de especies *Thermobifida* o especies *Corynebacterium*. Aunque se han aislado lipasas, es decir, enzimas hidrolizantes de triacilglicerol de especies *Streptomyces* (véase Vujaklija et al Arch Microbial (2002) 178: 124-130 por ejemplo), estas enzimas nunca se han identificado como con actividad hidrolizante de glucolípidos.

## 50 ASPECTOS DE LA INVENCION

La presente invención se basa en el hallazgo seminal de una enzima lipolítica que tiene actividad galactolipídica significativa del género *Streptomyces*. En particular, la enzima lipolítica del género *Streptomyces* tiene significativa actividad hidrolizante de galactolípidos y/o actividad significativa galactolípido aciltransferasa, particularmente cuando se usa en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención.

60 Además, las enzimas lipolíticas de los géneros *Thermobifida* o *Corynebacterium* tienen significativa actividad galactolipídica. En particular, las enzimas lipolíticas de los géneros *Thermobifida* o *Corynebacterium* tienen significativa actividad hidrolizante de galactolípidos y/o significativa actividad galactolípido aciltransferasa, particularmente cuando se usan en los métodos y usos de la presente invención.

65 En un amplio aspecto, la presente invención se refiere a una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos glucolípidos y/o capaz de transferir un grupo acilo de al menos un glucolípido a uno o más sustratos aceptores de acilo, donde la enzima se puede obtener, y preferiblemente se obtiene, de especies *Streptomyces* y comprende una

secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 2 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la misma.

5 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos galactolípidos y/o capaz de transferir un grupo acilo de al menos un galactolípido a uno o más sustratos aceptores de acilo, donde la enzima está codificada por un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 10 a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3;  
b) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 por la degeneración del código genético; y  
c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3.

15 En otro aspecto, la presente invención proporciona una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo de al menos un galactolípido a uno o más sustratos aceptores de acilo, donde la enzima comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la misma.

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo de al menos un galactolípido a uno o más sustratos aceptores de acilo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la misma.

25 La SEC ID N° 3 se muestra en la Figura 3 y la SEC ID N° 4 se muestra en la Figura 4.

La presente invención proporciona además adicionalmente un ácido nucleico que codifica una enzima lipolítica capaz de hidrolizar lípidos polares y/o capaz de transferir un grupo acilo de un lípido polar a uno o más sustratos aceptores de acilo, en que dicho ácido nucleico se selecciona entre el grupo que consiste en:

- 30 a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3;  
b) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 por la degeneración del código genético; y  
c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3.

35 La presente invención proporciona además adicionalmente el uso de una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención en un sustrato (preferiblemente un producto alimenticio) para preparar un lisoglucolípido, por ejemplo digalactosil monoglicérido (DGMG) o monogalactosil monoglicérido (MGMG) por tratamiento de un glucolípido (por ejemplo digalactosil diglicérido (DGDG) o monogalactosil diglicérido (MGDG)) con la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención para producir el producto de hidrolisis parcial, es decir, el lisoglucolípido.

40 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención en un sustrato (preferiblemente un producto alimenticio) para preparar un lisofosfolípido, por ejemplo lisolecitina, por tratamiento de un fosfolípido (por ejemplo, lecitina) con la enzima de acuerdo con la presente invención para producir un producto de hidrolisis parcial, es decir, un lisofosfolípido.

45 En un amplio aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar un producto alimenticio, comprendiendo el método mezclar una enzima lipolítica de la presente invención con uno o más ingredientes del producto alimenticio.

50 Otro amplio aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar un producto horneado a partir de una masa, comprendiendo el método mezclar una enzima lipolítica de la presente invención con la masa.

55 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método para preparar un producto lácteo, comprendiendo el método mezclar una enzima lipolítica de la presente invención con uno o más ingredientes del producto lácteo.

60 El método se refiere al uso de una enzima lipolítica de la presente invención en la fabricación de un producto lácteo para reducir uno o más de los siguientes efectos nocivos: malos olores y/o malos sabores y/o gusto jabonoso.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona el uso de una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención en un proceso para tratar productos de huevo o basados en huevo para producir lisofosfolípidos.

65 En otro aspecto de la presente invención se proporciona el uso de una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención en un proceso para tratar productos de huevo o basados en huevo para producir lisoglucolípidos.

Un aspecto adicional de la presente invención proporciona un proceso de desgomado enzimático de aceites vegetales o comestibles, que comprende tratar el aceite comestible o vegetal con una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención para hidrolizar una parte principal de los lípidos polares (por ejemplo, fosfolípido y/o glucolípido).

5 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención en un proceso que comprende el tratamiento de un fosfolípido para hidrolizar los grupos acilo grasos.

10 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención en un proceso para reducir el contenido de un fosfolípido en un aceite comestible, que comprende tratar el aceite con la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención para hidrolizar una parte principal del fosfolípido, y separar una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado del aceite.

15 También se proporciona un método para preparar una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención, comprendiendo el método transformar una célula hospedadora con un ácido nucleico recombinante que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la enzima lipolítica, siendo capaz la célula hospedadora de expresar la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la enzima lipolítica, cultivar la célula hospedadora transformada en condiciones en las que se exprese el ácido nucleico y recoger la enzima lipolítica.

20 En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención en la bioconversión de lípidos polares (preferiblemente glucolípidos) para preparar productos de alto valor, tales como ésteres de carbohidrato y/o ésteres de proteína y/o ésteres de subunidad de proteína y/o un éster de hidroxíácido.

25 Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención en un proceso de desgomado enzimático de aceite vegetal o comestible, que comprende tratar dicho aceite comestible o vegetal con dicha enzima lipolítica para hidrolizar una parte principal de los lípidos polares.

30 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención en un proceso que comprende el tratamiento de un fosfolípido para hidrolizar los grupos acilo grasos.

También se describe una enzima lipolítica inmovilizada de acuerdo con la presente invención.

35 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar un lisoglucolípido que comprende tratar un sustrato que comprende un glucolípido con al menos una enzima lipolítica descrita anteriormente para producir dicho lisoglucolípido, donde dicha enzima lipolítica tiene actividad glucolipasa.

40 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un método para preparar un lisofosfolípido que comprende tratar un sustrato que comprende un fosfolípido con al menos una enzima lipolítica descrita anteriormente para producir dicho lisofosfolípido, donde dicha enzima lipolítica tiene actividad fosfolipasa.

45 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método de desgomado enzimático de aceite vegetal o comestible, que comprende tratar dicho aceite comestible o vegetal con una enzima lipolítica descrita anteriormente capaz de hidrolizar una parte principal de los lípidos polares.

50 La presente invención se refiere adicionalmente a un método de bioconversión de lípidos polares para preparar productos de alto valor que comprende tratar dichos lípidos polares con una enzima lipolítica descrita anteriormente para producir dichos productos de alto valor, donde dicha enzima lipolítica es capaz de hidrolizar dichos lípidos polares.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar un producto alimenticio que comprende mezclar al menos una enzima lipolítica descrita anteriormente con uno o más ingredientes de un producto alimenticio donde dicha enzima lipolítica es capaz de hidrolizar un glucolípido y/o un fosfolípido presente en o como al menos uno de dichos ingredientes.

55 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de una enzima lipolítica descrita anteriormente en un sustrato para preparar un lisofosfolípido donde dicha enzima lipolítica tiene actividad fosfolipasa.

60 La presente invención se refiere adicionalmente al uso de una enzima lipolítica descrita anteriormente para desgomado enzimático de aceite vegetal o comestible para hidrolizar una parte principal de los lípidos polares.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al uso de una enzima lipolítica descrita anteriormente en un proceso que comprende el tratamiento de un fosfolípido para hidrolizar grupos acilo grasos.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de una enzima lipolítica descrita anteriormente en la bioconversión de lípidos polares para preparar productos de alto valor, donde dicha enzima lipolítica es capaz de hidrolizar dichos lípidos polares.

5 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere al uso de una enzima lipolítica descrita anteriormente en la preparación de un producto alimenticio, donde dicha enzima lipolítica es capaz de hidrolizar un glucolípido y/o un fosfolípido.

Aspectos de la presente invención se presentan en las reivindicaciones.

10 Otras características respecto a la secuencias de nucleótidos de la presente invención incluyen: una construcción que comprende las secuencias de la presente invención; un vector que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; un plásmido que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; una célula transformada que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; un tejido transformado que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; un órgano transformado que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; un hospedador transformado que comprende las secuencias para su uso en la presente invención; un organismo transformado que comprende las secuencias para su uso en la presente invención. También se describen métodos para expresar la secuencia de nucleótidos para su uso en la presente invención usando los mismos, tales como expresión en una célula hospedadora; incluyendo métodos para transferir las mismas.

Se describen métodos adicionales para aislar la secuencia de nucleótidos, tal como aislamiento desde una célula hospedadora.

25 Otras características respecto a la secuencia de aminoácidos para su uso en la presente invención incluyen: una construcción que codifica las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un vector que codifica las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un plásmido que codifica las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; una célula transformada que expresa las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un tejido transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un órgano transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un hospedador transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención; un organismo transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su uso en la presente invención. También se describen métodos para purificar la secuencia de aminoácidos para su uso en la presente invención usando los mismos, tales como expresión en una célula hospedadora; incluyendo métodos para transferir la misma, y después purificar dicha secuencia.

Para facilidad de referencias, los aspectos de la presente invención se analizan ahora en el encabezado apropiado de sección. Sin embargo, los contenidos en cada sección no están necesariamente limitados a cada sección particular.

#### 40 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Adecuadamente, la enzima lipolítica para su uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención pueden ser una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo, que comprende las secuencias de aminoácidos mostradas como SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tenga al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, o una enzima lipolítica capaz de hidrolizar lípidos polares y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido polar hasta uno o más sustratos aceptores de acilo codificada por la secuencia de nucleótidos mostrada como SEC ID N° 3 o una secuencia de nucleótidos que tenga al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma.

En una realización, la enzima lipolítica para su uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención es preferiblemente una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos galactolípidos y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo, donde la enzima está codificada por un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en:

- a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3;
- b) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 por la degeneración del código genético; y
- 60 c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3.

En una realización, la enzima lipolítica para su uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención es preferiblemente una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo que comprende una secuencia

de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la misma.

5 En otra realización, la enzima lipolítica para su uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención es preferiblemente una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo, donde la enzima comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la misma.

10 En una realización adicional, la enzima lipolítica para su uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención pueden ser una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, o una enzima  
15 lipolítica capaz de hidrolizar lípidos polares y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido polar hasta uno o más sustratos aceptores de acilo codificada por una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas como SEC ID N° 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma.

20 En una realización, la enzima lipolítica para su uso en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención puede ser una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos galactolípidos y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo, donde la enzima está codificada por un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 25 a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3;  
b) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 por la degeneración del código genético; y  
c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3.

30 En una realización, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede ser una enzima lipolítica que se puede obtener, y que preferiblemente se obtiene, de las cepas de *Streptomyces* L130 o L131 depositadas por Danisco A/S de Langebrogade 1, DK-1001 Copenhague K, Dinamarca según el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos con fines de procedimiento de patente en la National  
35 Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria (NCIMB) 23 St. Machar Street, Aberdeen Scotland, GB el 25 de junio de 2004 con los números de acceso NCIMB 41226 y NCIMB 41227, respectivamente.

40 Preferiblemente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención actúa sobre al menos un glucolípido, tal como digalactosildiglicérido (DGDG) por ejemplo. Adecuadamente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención también puede actuar sobre uno o más sustratos diferentes de lípido polar, tal como un fosfolípido, por ejemplo una lecitina, por ejemplo, fosfatidilcolina.

45 Un modo alternativo para expresar la expresión "capaz de hidrolizar glucolípidos" como se usa en este documento sería decir que la enzima lipolítica tiene actividad hidrolizante de glucolípidos.

50 Preferiblemente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención hidroliza un glucolípido, tal como digalactosildiglicérido (DGDG) por ejemplo, y también un fosfolípido, tal como una lecitina, por ejemplo fosfatidilcolina.

55 Preferiblemente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención actúa sobre glucolípidos tales como DGDG o MGDG.

En un aspecto, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención hidroliza DGDG a DGMG y/o MGDG a MGMG.

En un aspecto, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención hidroliza lecitina a lisolecitina.

60 Cuando es el caso en que la enzima lipolítica es capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un glucolípido hasta un sustrato donante, el sustrato de lípido polar puede mencionarse en este documento como "donante de acilo lipídico".

65 En una realización, la enzima de acuerdo con la presente invención que también tiene actividad fosfolipasa y/o glucolipasa (generalmente clasificada como E.C. 3.1.1.26; E.C. 3.1.1.4 o E.C. 3.1.1.32 de acuerdo con las Recomendaciones de Nomenclatura de Enzimas (1992) del Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology) también tiene actividad acetiltransferasa (generalmente clasificada como E.C. 2.3.1.x), mediante lo cual la enzima es capaz de transferir un grupo acilo desde un donante de acilo lipídico hasta

uno o más sustratos aceptores, tales como uno o más de los siguientes: un esteroles; un estanol; un carbohidrato; una proteína; una subunidad proteica; glicerol.

5 Las lípidos acetiltransferasas y sus usos se muestran en la solicitud de patente internacional en trámite junto con la presente número PCT/IB2004/000655. Sin embargo, las enzimas lipolíticas de los géneros *Streptomyces* de acuerdo con la presente invención no se muestran en el documento PCT/IB2004/000655.

10 En algunos aspectos, la enzima lipolítica para su uso en los métodos y/o usos de la presente invención pueden ser capaces de transferir un grupo acilo desde un lípido polar (como se define en este documento) hasta uno o más de los siguientes sustratos aceptores de acilo: un esteroles, un estanol, un carbohidrato, una proteína o subunidades de la misma, o un glicerol.

15 Para algunos aspectos, el "aceptor de acilo" de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier compuesto que comprenda un grupo hidroxilo (-OH), tal como por ejemplo, alcoholes polivalentes, incluyendo glicerol; esteroles; estanoles; carbohidratos; hidroxiacidos incluyendo ácidos frutales, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico y ácido ascórbico; proteínas o una subunidad de las mismas, tales como aminoácidos, hidrolizados proteicos y péptidos (proteína parcialmente hidrolizada) por ejemplo; y mezclas y derivados de los mismos.

20 En algunos aspectos, el "aceptor de acilo" de acuerdo con la presente invención puede ser preferiblemente no agua.

En una realización, el aceptor de acilo es preferiblemente no un monoglicérido y/o un diglicérido.

25 En un aspecto, preferiblemente la enzima es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido hasta un esteroles y/o un estanol.

En un aspecto, preferiblemente la enzima es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido hasta un carbohidrato.

30 En un aspecto, preferiblemente la enzima es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido hasta una proteína o una subunidad de la misma. Adecuadamente, la subunidad proteica puede ser una o más de las siguientes: un aminoácido, un hidrolizado proteico, un péptido, un dipéptido, un oligopéptido, un polipéptido.

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

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

40 En un aspecto, preferiblemente la enzima es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido hasta un glicerol.

En un aspecto, preferiblemente la enzima es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido hasta un hidroxiacido.

45 En un aspecto, preferiblemente la enzima es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido hasta un alcohol polivalente.

50 En un aspecto, la enzima lipolítica puede, siendo también capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido hasta un esteroles y/o un estanol, adicionalmente ser capaz de transferir el grupo acilo desde un lípido hasta uno o más de los siguientes: un carbohidrato, una proteína, una subunidad proteica, glicerol.

El término lecitina como se usa en este documento abarca fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.

55 Para algunos aspectos, preferiblemente el sustrato lipídico es al menos un glucolípido, tal como DGDG por ejemplo.

Para algunos aspectos, preferiblemente el sustrato lipídico puede ser adicionalmente un fosfolípido, tal como lecitina, por ejemplo fosfatidilcolina. Otros sustratos fosfolípidicos de acuerdo con la presente invención pueden ser uno o más de N acil fosfatidil etanolamina (APE) o N acil liso-fosfatidil etanolamina (ALPE).

60 Preferiblemente, el sustrato lipídico es un lípido alimenticio, es decir un componente lipídico de un producto alimenticio.

65 Para algunos aspectos, preferiblemente la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención es incapaz, o sustancialmente incapaz, de actuar sobre un triglicérido y/o un 1-monoglicéridos y/o 2-monoglicéridos.

En una realización, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención no tiene actividad o no tiene actividad significativa sobre triglicérido y/o 1-monoglicéridos y/o 2-monoglicéridos.

5 Adecuadamente, el sustrato lipídico o donante de acilo lipídico puede ser uno o más lípidos presentes en uno o más de los siguientes sustratos: grasas, incluyendo manteca, sebo y grasa de mantequilla; aceites incluyendo aceites extraídos de o derivados de aceite de palma, aceite de girasol, aceite de soja, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cacahuete, aceite de coco, y aceite de colza. La lecitina de soja, la colza o la yema de huevo también son un sustrato lipídico adecuado. El sustrato lipídico puede ser un lípido de avena u otro material basado en plantas que contenga galactolípidos.

10 En un aspecto, el sustrato lipídico o donante de acilo lipídico es preferiblemente lecitina (tal como fosfatidilcolina) en yema de huevo.

15 Para algunos aspectos de la presente invención, el lípido puede seleccionarse entre lípidos que tienen una longitud de cadena de ácidos grasos de 8 a 22 carbonos.

Para algunos aspectos de la presente invención, el lípido puede seleccionarse entre lípidos que tienen una longitud de cadena de ácidos grasos de 16 a 22 carbonos, más preferiblemente de 16 a 20 carbonos.

20 Para algunos aspectos de la presente invención, el lípido puede seleccionarse entre lípidos que tienen una longitud de cadena de ácidos grasos de no más de 14 carbonos, adecuadamente de lípidos que tienen una longitud de cadena de ácidos grasos de 4 a 14 carbonos, adecuadamente de 4 a 10 carbonos, adecuadamente de 4 a 8 carbonos.

25 Adecuadamente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención muestra al menos actividad glucolipasa (E.C. 3.1.1.26). Adecuadamente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención también puede mostrar actividad fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4) y/o actividad fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32).

30 Para algunos aspectos, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede únicamente tener actividad glucolipasa (E.C. 3.1.1.26).

35 Para algunos aspectos, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención en una galactolipasa (E.C. 3.1.1.26). El hecho de que la enzima se designe como una galactolipasa no evita, sin embargo, que tenga otras actividades secundarias, tales como actividad hacia otros lípidos polares por ejemplo.

Las expresiones "actividad glucolipasa" y "actividad galactolipasa" como se usan en este documento, se usan de forma intercambiable.

40 Adecuadamente, para algunos aspectos, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede ser capaz de transferir un grupo acilo desde un glucolípido y/o un fosfolípido hasta uno o más sustratos aceptores.

Adecuadamente, el sustrato aceptor puede ser uno o más de los siguientes sustratos: un esteroles, un estanol, un carbohidrato, una proteína, glicerol.

45 La expresión "lípidos polares" como se usa en este documento, significa fosfolípidos y/o glucolípidos. En algunos aspectos, la expresión lípidos polares preferiblemente significa al menos glucolípidos.

La actividad glucolipasa; la actividad fosfolipasa y/o la actividad triacilglicerol lipasa de una enzima puede determinarse usando los ensayos presentados a continuación en este documento.

50 Determinación de actividad galactolipasa (ensayo de actividad glucolipasa (GLU-7)):

Sustrato

55 Se disolvió digalactosildiglicérido al 0,6% (Sigma D 4651), Tritón-X 100 al 0,4% (Sigma X-100) y CaCl<sub>2</sub> 5 mM en tampón HEPES 0,05 M pH 7.

Procedimiento de ensayo:

60 Se añadieron 400 µl de sustrato a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se colocó en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 5 minutos. A tiempo t = 0 min., se añadieron 50 µl de solución enzimática. También se analizó un blanco con agua en lugar de enzima. La muestra se mezcló a 10x100 rpm en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 10 minutos. A tiempo t=10 min., el tubo Eppendorf se colocó en otro thermomixer a 99°C durante 10 minutos para detener la reacción.

65 Los ácidos grasos libres en las muestras se analizaron usando el kit NEFA C de WAKO GmbH.



## ES 2 539 006 T3

La actividad enzimática GLU a pH 7 se calculó como los micromoles de ácido graso producidos por minuto en condiciones de ensayo.

Determinación de actividad fosfolipasa (ensayo de actividad fosfolipasa (PLU-7)):

Sustrato

Se dispersaron L- $\alpha$  fosfatidilcolina al 0,6% de planta al 95% (Avanti n<sup>o</sup>441601), Tritón-X 100 al 0,4% (Sigma X-100) y CaCl<sub>2</sub> 5 mM en tampón HEPES 0,05 M pH 7.

Procedimiento de ensayo:

Se añadieron 400  $\mu$ l de sustrato a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se colocó en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 5 minutos. A tiempo t = 0 min., se añadieron 50  $\mu$ l de solución enzimática. También se analizó un blanco con agua en lugar de enzima. La muestra se mezcló a 10x100 rpm en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 10 minutos. A tiempo t=10 min., el tubo Eppendorf se colocó en otro thermomixer a 99°C durante 10 minutos para detener la reacción.

Los ácidos grasos libres en las muestras se analizaron usando el kit NEFA C de WAKO GmbH.

La actividad enzimática PLU-7 a pH 7 se calculó como los micromoles de ácido graso producidos por minuto en condiciones de ensayo.

Determinación de actividad triacilglicérido lipasa: ensayo basado en triglicérido (tributirina) como sustrato (LIPU):

La actividad lipasa basada en tributirina se midió de acuerdo con el Food Chemical Codex, Cuarta Edición, National Academy Press, 1996, pág. 803. Con la modificación de que la muestra se disuelve en agua desionizada en lugar de tampón glicina, y el pH de punto de inicio es 5,5 en lugar de 7.

1 LIPU se define como la cantidad de enzima que puede liberar un micromol de ácido butírico por minuto en condiciones de ensayo.

En una realización, preferiblemente la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención es una enzima lipolítica de tipo silvestre.

Los términos "natural" y "de tipo silvestre" como se usan en este documento, significan una enzima de origen natural. Es decir, una enzima expresada a partir del código genético endógeno y aislada de su organismo hospedador endógeno y/o una enzima producida de forma heteróloga que no se ha mutado (es decir, no contiene deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos) en comparación con la secuencia proteica madura (después de eventos de escisión co- y post-traduccionales) producida de forma endógena. Las proteínas naturales y de tipo silvestre de la presente invención pueden codificarse por polinucleótidos de codones optimizados para expresión heteróloga, y también pueden comprender un péptido señal no endógeno seleccionado para la expresión en ese hospedador.

El término "variante" como se usa en este documento significa una proteína expresada a partir de un código genético no endógeno que provoca una o más alteraciones de aminoácido (es decir, deleciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos) en comparación con la secuencia natural o de tipo silvestre dentro de la secuencia proteica madura.

La enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención es obtenible (adecuadamente puede obtenerse) de una bacteria.

La enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede obtenerse (preferiblemente se obtiene) de *Streptomyces* spp. Preferiblemente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede obtenerse (preferiblemente se obtiene) de *Streptomyces* cepa L131 o *Streptomyces* cepa L130.

Preferiblemente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, preferiblemente al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, preferiblemente al menos un 90%, preferiblemente al menos un 95%, preferiblemente al menos un 98%, preferiblemente al menos un 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC ID N<sup>o</sup> 4.

Preferiblemente, el ácido nucleico que codifica la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 75%, preferiblemente al menos un 80%, preferiblemente al menos un 85%, preferiblemente al menos un 90%, preferiblemente al menos un 95%, preferiblemente al menos un 98%, preferiblemente al menos un 99% de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N<sup>o</sup> 3.

En una realización, adecuadamente el pH óptimo de la enzima sobre un sustrato galactolipídico es aproximadamente 6-8, preferiblemente aproximadamente 6,5 a 7,5, más preferiblemente aproximadamente 7.

5 Adecuadamente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención no puede inhibirse o no se inhibe significativamente por inhibidores de lipasas presentes en harina de trigo. La expresión "no se inhibe significativamente" como se usa en este documento significa que la enzima es menos sensible a inhibidores de lipasa presentes en la harina de trigo en comparación con una dosificación equivalente (PLU) de LipopanF™ (Novozymes A/S, Dinamarca), en base al ensayo de fosfolipasa convencional (PLU-7) definido en este documento.

10 Adecuadamente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención es capaz de hidrolizar al menos el 10% del diéster galactolipídico en el sustrato (es decir, en el producto alimenticio, por ejemplo, masa, por ejemplo) en el monoéster. Preferiblemente, la enzima es capaz de hidrolizar al menos el 20%, más preferiblemente al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80% o al menos el 90% del diéster galactolipídico en el monoéster. Adecuadamente, el diéster galactolipídico puede ser uno o más de MGDG o DGDG y el monoéster poder ser uno o más de MGMG o DGMG, respectivamente.

15 Adecuadamente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede aislarse de un caldo de fermentación de *Streptomyces* cepa L131 o *Streptomyces* cepa L130.

Adecuadamente, la enzima puede purificarse por cromatografía líquida.

20 La secuencia de aminoácidos de la enzima lipolítica purificada puede determinarse por degradación de Edman, análisis LC-MS o MALDI-TOF.

Adecuadamente, la enzima definida en este documento puede catalizar una o más de las siguientes reacciones: interesterificación, transesterificación, alcoholisis, hidrólisis.

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

30 El término "transesterificación" como se usa en este documento significa la transferencia catalizada enzimáticamente de un grupo acilo desde un donante lipídico (diferente a un ácido graso libre) hasta un aceptor de acilo (diferente de agua).

35 Como se usa en este documento, el término "alcoholisis" se refiere a la escisión enzimática de un enlace covalente de un derivado ácido por reacción con un alcohol ROH de modo que uno de los productos se combine con el H del alcohol y el otro producto se combine con el grupo OR del alcohol.

Como se usa en este documento, el término "alcohol" se refiere a un compuesto alquilo que contiene un grupo hidroxilo.

40 Como se usa en este documento, el término "hidrólisis" se refiere a la transferencia catalizada enzimáticamente de un grupo acilo desde un lípido hasta el grupo OH de una molécula de agua. La transferencia de acilo que resulta de la hidrólisis requiere la separación de la molécula de agua.

45 El término "producto alimenticio" como se usa en este documento significa una sustancia que es adecuada para consumo humano y/o animal.

50 Adecuadamente, el término "producto alimenticio" como se usa en este documento puede significar un producto alimenticio en una forma que está lista para su consumo. Como alternativa o adicionalmente, sin embargo, el término producto alimenticio como se usa en este documento puede significar uno o más materiales alimenticios que se usan en la preparación de un producto alimenticio. A modo de ejemplo solamente, el término producto alimenticio abarca tanto productos horneados producidos a partir de masa así como la masa usada en la preparación de dichos productos horneados.

55 En un aspecto preferido, la presente invención proporciona un producto alimenticio definido anteriormente donde el producto alimenticio se selecciona entre uno o más de los siguientes: huevos, productos basados en huevo, incluyendo aunque sin limitación mahonesa, aliños de ensalada, salsas, helados, huevo en polvo, yema de huevo modificada y productos preparados a partir de la misma; productos horneados, incluyendo panes, tortas, productos de masa dulce, masas laminadas, masas líquidas, muffins, rosquillas, galletas, galletas saladas y galletas dulces; productos de confitería, incluyendo chocolate, golosinas, caramelos, halawa, chicles, incluyendo chicle sin azúcar y edulcorado con azúcar, chicle globo, chicle globo blando, goma de mascar y postres; productos congelados  
60 incluyendo sorbetes, preferiblemente productos lácteos congelados, incluyendo helados y leche helada; productos lácteos, incluyendo queso, mantequilla, leche, nata para café, nata montada, crema pastelera, bebidas lácteas y yogures; mousses, nata batida vegetal, productos cárnicos, incluyendo productos cárnicos procesados; aceites y grasas comestibles, productos batidos gaseosos y no gaseosos, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, margarina, productos para untar y mantecas incluyendo mantecas de bajo y muy bajo contenido en grasa;  
65 aliños, mahonesa, aderezos, salsas basadas en crema, sopas basadas en crema, bebidas, emulsiones sazonadas y salsas.

Adecuadamente, el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede ser una "especialidad gastronómica", incluyendo tartas, pasteles, artículos de confitería, chocolates, dulces de azúcar y similares.

5 En un aspecto, el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede ser un producto de masa o un producto horneado, tal como un pan, un producto frito, un aperitivo, tortas, tartas, brownies, galletas dulces, fideos, artículos de aperitivo tales como galletas saladas, galletas integrales, pretzels, y patatas fritas, y pasta.

10 En un aspecto adicional, el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede ser un producto alimenticio derivado de plantas tales como harinas, pre-mezclas, leche en polvo, aliños de ensalada, margarina, productos para untar, manteca de cacahuete, mantecas, helado, aceites de cocinar.

15 En otro aspecto, el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede ser un producto lácteo, incluyendo mantequilla, leche, crema, queso tal como quesos naturales, procesados, y de imitación en una diversidad de formas (incluyendo triturado, de barra, lonchas o rayado), queso en crema, helado, postres congelados, yogurt, bebidas de yogurt, grasa de mantequilla, grasa láctea anhidra, otros productos lácteos. La enzima de acuerdo con la presente invención puede mejorar la estabilidad de la grasa en productos lácteos.

20 Es particularmente ventajoso utilizar la enzima de acuerdo con la presente invención en queso. Por tanto, una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede usarse ventajosamente para producir queso. La enzima lipolítica cataliza la hidrólisis de fosfolípidos en la leche que contribuye a una producción aumentada de queso. Preferiblemente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede añadirse a la leche (mencionada como leche de queso) antes de o durante el proceso de fabricación de queso.

25 En otro aspecto, el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede ser un producto alimenticio que contenga ingredientes derivados de animales, tales como productos cárnicos procesados, aceites de cocinar, mantecas.

30 En un aspecto adicional, el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede ser una bebida, una fruta, fruta mezclada, un vegetal o vino. En algunos casos la bebida puede contener hasta 20 gr/l de fitoesteroles añadidos.

35 En otro aspecto, el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede ser un pienso animal. El pienso animal puede enriquecerse con fitoesteroles y/o fitoestanoles, preferiblemente con beta-fitoesterol/estanol. Adecuadamente, el pienso animal puede ser un pienso para aves de corral. Cuando el producto alimenticio es pienso para aves de corral, la presente invención puede usarse para disminuir el contenido de colesterol de huevos producidos por aves de corral alimentadas con el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención.

40 En un aspecto, preferiblemente el producto alimenticio se selecciona entre uno o más de los siguientes: huevos, productos basados en huevo, incluyendo mahonesa, aliños de ensalada, salsas, helado, huevo en polvo, yema de huevo modificada y productos fabricados a partir de los mismos.

45 Preferiblemente, el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención es un producto alimenticio que contiene agua. Adecuadamente, el producto alimenticio puede estar compuesto por un 10-98% de agua, adecuadamente por un 14-98%, adecuadamente por un 18-98% de agua, adecuadamente por un 20-98%, adecuadamente por un 40-98%, adecuadamente por un 50-98%, adecuadamente por un 70-98%, adecuadamente por un 75-98%.

50 Para algunos aspectos, el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede no ser un aceite derivado de plantas puro, tal como aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de cacahuete, aceite de colza por ejemplo. Para evitar dudas, en algunos aspectos de la presente invención, el producto alimenticio de acuerdo con la presente invención puede comprender un aceite, pero el producto alimenticio no está compuesto principalmente por aceite o mezclas de aceite. Para algunos aspectos, preferiblemente el producto alimenticio comprende menos del 95% de lípidos, preferiblemente menos del 90% de lípidos, preferiblemente menos del 85%, preferiblemente menos del 80% de lípidos. Por tanto, para algunos aspectos de la presente invención, el aceite puede ser un componente del producto alimenticio, pero preferiblemente el producto alimenticio no es un aceite *per se*.

55 Las ventajas de usar una enzima lipolítica capaz de transferir un grupo acilo en aplicaciones de alimentos, se muestran en las solicitudes de patente WO2004/064987, WO2004/064537, PCT/IB2004/004374 y GB0513859.9.

60 La producción de ácidos grasos libres puede ser perjudicial para los productos alimenticios. Los ácidos grasos libres se han ligado con malos olores y/o malos sabores en productos alimenticios, así como otros efectos nocivos, incluyendo un sabor jabonoso en productos lácteos tales como queso, por ejemplo. Adecuadamente, en algunas realizaciones de la presente invención, la enzima lipolítica es capaz de transferir el ácido graso desde el lípido a un aceptor de acilo, por ejemplo un esteroles y/o estanol. Por tanto, el nivel global de ácidos grasos libres en el producto alimenticio no aumenta o aumenta solamente a un grado insignificante. Por tanto, una enzima lipolítica capaz de transferir un grupo acilo de acuerdo con la presente invención puede proporcionar uno o más de los siguientes

efectos técnicos inesperados en la producción de queso: una disminución en el efecto de desprendimiento de aceites en el queso; un aumento en la producción de queso; una mejora en el aroma; una reducción del mal olor; una reducción del sabor "jabonoso".

La utilización de una enzima lipolítica mostrada en este documento que puede transferir el grupo acilo a un carbohidrato así como a un esteroil y/o un estanol es particularmente ventajosa para productos alimenticios que comprenden huevos. En particular, la presencia de azúcares, en particular glucosa, en huevos y productos de huevo a menudo se observa como desventajosa. La yema de huevo puede comprender hasta el 1% de glucosa. De acuerdo con la presente invención, este azúcar indeseado puede eliminarse fácilmente por "esterificación" del azúcar para formar un éster de azúcar.

La presencia de diglicéridos en aceites comestibles es desventajosa. En particular, los diglicéridos en aceites comestibles (en particular aceite de palma) pueden conducir a un aceite de baja calidad. Adecuadamente, en algunas realizaciones de la presente invención, una enzima lipolítica mostrada en este documento es capaz de transferir el ácido graso desde el lípido hasta un aceptor de acilo que reduce el nivel de diglicéridos en el aceite sin aumentar o aumentar significativamente el nivel de ácidos grasos libres.

Una enzima lipolítica mostrada en este documento es capaz de hidrolizar una parte principal de los fosfolípidos en un aceite comestible o vegetal. Esto es muy ventajoso en el desgomado enzimático de aceites vegetales o comestibles. Adecuadamente, en algunas realizaciones de la presente invención, la enzima lipolítica puede ser capaz de transferir el ácido graso desde el lípido hasta un aceptor de acilo. Por tanto, ventajosamente el nivel global de ácidos grasos libres en el aceite no aumenta o aumenta solamente a un grado insignificante. La producción de ácidos grasos libres puede ser perjudicial en el aceite comestible. Preferiblemente, el método de acuerdo con la presente invención provoca el desgomado de un aceite comestible donde la acumulación de ácidos grasos libres se reduce y/o elimina.

Debe entenderse que las reivindicaciones de la presente invención incluyen cada uno de los productos alimenticios enumerados anteriormente.

En algunas de las aplicaciones mencionadas en este documento, particularmente las aplicaciones en alimentos, tales como las aplicaciones en panadería, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede usarse con uno o más emulsionantes convencionales, incluyendo por ejemplo monoglicéridos, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono- y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de azúcar, estearoil lactilato de sodio (SSL) y lecitinas.

Además o alternativamente, la enzima de acuerdo con la presente invención puede usarse con una o más enzimas de calidad alimenticia adecuadas diferentes. Por tanto, está dentro del alcance de la presente invención que, además de la enzima lipolítica de la presente invención, pueda añadirse al menos una enzima adicional al producto horneado y/o a la masa. Dichas enzimas adicionales incluyen enzimas degradantes de almidón tales como endo- o exoamilasas, pululaninas, enzimas desramificadoras, hemicelulasas incluyendo xilanasas, celulasas, oxidorreductasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, piranosa oxidasa, sulfidril oxidasa o una carbohidrato oxidasa tal como una que oxida maltosa, por ejemplo, hexosa oxidasa (HOX), lipasas, fosfolipasas y hexosa oxidasa, proteasas, y aciltransferasas (tales como las descritas en el documento PCT/IB2004/000575, por ejemplo).

La presente invención abarca composiciones de enzimas alimentarias, incluyendo composiciones que mejoran el pan y/o la masa que comprenden la enzima de acuerdo con la presente invención, y opcionalmente que comprenden adicionalmente otra enzima, tal como una o más enzimas de calidad alimenticia adecuadas diferentes, incluyendo enzimas que degradan el almidón tal como endo- o exoamilasas, pululaninas, enzimas desramificadoras, hemicelulasas incluyendo xilanasas, celulasas, oxidorreductasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, piranosa oxidasa, sulfidril oxidasa o una carbohidrato oxidasa tal como una que oxida maltosa, por ejemplo, hexosa oxidasa (HOX), lipasas, fosfolipasas y hexosa oxidasa, proteasas, y aciltransferasas (tales como las descritas en el documento PCT/IB2004/000575, por ejemplo).

En algunas aplicaciones mencionadas en este documento, particularmente en aplicaciones alimenticias, tales como aplicaciones de panadería, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede añadirse en combinación o secuencialmente con uno o más sustratos enzimáticos. A modo ejemplo solamente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede añadirse junto con uno o más sustratos lipídicos polares y/o uno o más sustratos aceptores de acilo.

En algunas aplicaciones mencionadas en este documento, particularmente en aplicaciones alimenticias, tales como aplicaciones de panadería, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención puede usarse con uno o más hidroxiacidos, incluyendo por ejemplo ácido tartárico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido succínico o ácido ascórbico, por ejemplo.

La expresión "propiedades mejoradas" como se usa en este documento significa cualquier propiedad que pueda mejorarse por la acción de la enzima lipolítica de la presente invención. En particular, el uso de la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención provoca una o más de las siguientes características: volumen aumentado del producto horneado; estructura de la miga mejorada del producto horneado; propiedades anti-envejecimiento en el

producto horneado; resistencia aumentada, estabilidad aumentada, rigidez reducida y/o manejabilidad mejorada de la masa.

5 Las propiedades mejoradas se evalúan por comparación con una masa y/o un producto horneado preparado sin la adición de la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención.

10 La expresión "producto horneado" como se usa en este documento, incluye un producto preparado a partir de una masa. Ejemplos de productos horneados (sean de tipo blanco, ligero u oscuro) que pueden producirse ventajosamente por la presente invención incluyen una o más de los siguientes: pan (incluyendo pan blanco, integral y de centeno), típicamente en forma de barra de pan o panecillos, bolitos, pan tipo baguette francesa, pan pita, tacos, tortilla de maíz, tortilla de trigo, tortas, panqueques, galletas, pan crujiente, pasta, fideos y similares.

15 La masa de acuerdo con la presente invención puede ser una masa leudada o una masa a someter a fermentación. La masa puede fermentarse de diversos modos tal como añadiendo bicarbonato sódico o similares, o añadiendo un cultivo de levaduras adecuado tal como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería).

20 La presente invención se refiere adicionalmente al uso de la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención para producir una masa de pasta, preferiblemente preparada a partir de harina de trigo duro o una harina de calidad comparable.

25 La enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención es adecuada para su uso en el desgomado enzimático de aceites vegetales o comestibles. En el procesamiento de aceite vegetal o comestible, el aceite comestible o vegetal se trata con enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención para hidrolizar una parte principal de los lípidos polares (por ejemplo, fosfolípido). Preferiblemente, los grupos acilo grasos se hidrolizan a partir de los lípidos polares. El proceso de desgomado típicamente provoca la reducción del contenido de lípidos polares, particularmente de fosfolípidos, en un aceite comestible debido a la hidrólisis de una parte principal (es decir, más del 50%) del lípido polar, por ejemplo, fosfolípido. Típicamente, la fase acuosa que contiene el lípido polar hidrolizado (por ejemplo, fosfolípido) se separa del aceite. Adecuadamente, el aceite comestible o vegetal puede tener inicialmente (pretratamiento con la enzima de acuerdo con la presente invención) un contenido de fósforo de 30 50-250 ppm.

35 En una realización, la presente invención se refiere al uso de la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención en la bioconversión de lípidos polares (preferiblemente glucolípidos) para preparar productos de alto valor, tales como ésteres de carbohidrato y/o ésteres de proteína y/o ésteres de subunidad proteica y/o un éster de hidroxilácido. El uso de una enzima lipolítica, particularmente una enzima lipolítica capaz de transferir grupos acilo desde un sustrato lípido polar (preferiblemente un glucolípido) hasta un aceptor de acilo, en la bioconversión de lípidos polares y las ventajas del mismo, se detalla en el documento PCT/IB2004/004374.

40 En una realización, la enzima lipolítica para su uso en los métodos de la presente invención puede inmovilizarse. Cuando es el caso en que se inmoviliza la enzima, la mezcla que comprende un donante de acilo, opcionalmente un aceptor de acilo, y opcionalmente agua puede pasarse a través de una columna por ejemplo que comprenda la enzima inmovilizada. Inmovilizando la enzima es posible reutilizarla fácilmente.

45 Adecuadamente, la enzima inmovilizada puede usarse en un reactor de flujo o en un reactor de lotes que contiene una mezcla de reacción que comprende un donante de acilo lipídico y opcionalmente un aceptor de acilo disuelto en agua. Cuando el aceptor de acilo está presente, el donante y el aceptor están en un sistema de dos fases o una emulsión. La mezcla de reacción puede agitarse o sonicarse opcionalmente. Una vez la reacción ha alcanzado el equilibrio, por ejemplo, la mezcla de reacción y la enzima inmovilizada pueden separarse. Adecuadamente, el producto de reacción puede fraccionarse, por ejemplo, por cromatografía de interacción hidrófoba, cristalización o 50 destilación de alto vacío.

55 La lípido acetil transferasa inmovilizada puede prepararse usando técnicas de inmovilización conocidas en la técnica. Existen numerosos métodos para preparar enzimas inmovilizadas, que serán evidentes para un especialista en la técnica (por ejemplo, las técnicas mencionadas en el documento EP 0 746 608; o Balcao V.M. et al Enzyme Microb Technol. 1996 May 1; 18(6):392-416; o Retz et al Chem Phys Lipids 1998 Junio:93(1-2) : 3-14; Bomscheuer et al Trends Biotechnol. 2002 Oct; 20(10):433-7; Plou et al Biotechnology 92 (2002) 55-66; Warmuth et al 1992 Bio Forum 9, 282-283; Ferrer et al 2000 J. Chem Technol. Biotechnol. 75, 1-8; o Christensen et al 1998 Nachwachsende Rohstoff 10, 98-105; Petersen y Christenen 2000 Applied Biocatalysis Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

60 Las técnicas que pueden usarse en este documento incluyen acoplamiento covalente a Eupergit C, adsorción en polipropileno y granulación en sílice, por ejemplo.

#### ENZIMAS LIPOLÍTICAS DE ACUERDO CON LA PRESENTE INVENCION

65 La enzima lipolítica para su uso de acuerdo con la presente invención y/o en los métodos descritos en este documento es preferiblemente una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos galactolípidos y/o capaz de

transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo, donde la enzima está codificada por un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en:

- d) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3;
- e) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 por la degeneración del código genético; y
- f) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3.

Preferiblemente, la enzima lipolítica usada de acuerdo con la presente invención y/o en los métodos descritos en este documento es una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la misma. Las enzimas lipolíticas adecuadas que tienen actividad galactolipasa para su uso de acuerdo con la presente invención y/o en los métodos de la presente invención pueden comprender una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos y/o estar codificada por las siguientes secuencias de nucleótidos:

Thermobifida fusca GDSx 548 aa

**SEC ID N° 5**

ZP 00058717

1 mlphpagerv evgaffallv gtpqdrirl echetprlg rcgcgerrvp pltlpgdgvl  
 61 ctsstrdae twrkhlpqr pdggfrphlg vgciliagggs pglvwcgreg crfevcrdt  
 121 pglstrmgd sspfragws lppkcgelsq sarkpavpr yslrtdrpd gprgrfvsgs  
 181 praatrrf lgalpvlvt altlvavpt greliwrmwc eatqdwclgv pvdsrgqpae  
 241 dgefillspv qaatwgnyya lgdssyssgdg ardyypgtav kggcwsana ypelvaeayd  
 301 faghlsflac sgqrgyamid aidevgsqld wnsphslvt igiggndlgf stvlktcmvr  
 361 vplldskact dqedairkm akfettfeel isevtrapd arilvgypr ifpeeptgay  
 421 yllfianqrw lneltiqefnq qlaeavavhd eeiaasggvg svefvdvyha ldgheigsde  
 481 pwvngvqlrd latgtvtdrs tfhpnaaghr avgervieqi etgpgrplya tfavvagatv  
 541 dtlagevg

**SEC ID N° 6**

1 ggtgggtgaac cagaacaccc ggtcgtcggc gtgggctgcc aggtgcaggt gcaggttctt  
 61 caactgctcc agcaggatgc cgcctgggcc gtgcacgatg gccttgggca ggcctgtggt  
 121 ccccgacgag tacagcacc ctagcggatg gtcgaacggc agcgggggta actccagttc  
 181 cgcgccttcg cccgcggctt cgaactccgc ccaggacagg gtgtcggcga caggggccga  
 241 gccacggtag ggcaggacga cgggtgtctg caggctgggc atgccgtcgc gcagggtctt  
 301 gagcacgtca cggcggctga agtcctacc gccgtagcgg tagcctcca cggccagcag  
 361 cacttcggt tcgatctgcg cgaaccggtc gaggacgctg cgcaccccca agtcggggga  
 421 acaggacgac caggtcgcac cgtatcgggc gcaggcgagg aatgcggccc tcgctcggc  
 481 gatgtcggc aggtaggcca cgaaccggtc gccggggccc accccgaggc tgcggagggc  
 541 cgcagcgcac gccgcgggtg ggtccgcag ttctcccag gtccactcgg tcaacggccc  
 601 gagtccgac gcgtgcggga tcgccacggc tgatgggtca cggtcggga agatgtgctc  
 661 gccgtagtgt aggtgtgctg cggggaacca gacggcggcc ggcctggcgt cggaggcgag  
 721 cactgtggtg tacgggggtg cggcgcgcac ccggtagtac tcccagatcg cggaccagaa  
 781 tccttcgagg tcggtaccg accagcgcga cagtccctg tagtccgtg cgtccacacc  
 841 gcgtgctcc cgcaccagc ggggaacgc ggtgagggtg gcgcttct tgctctctc  
 901 gtcgggactc cacaggatcg gcgctcggc cttgagtgc atgaaacgcg acccctcgt  
 961 ggacgggtcg gatgcggta gcgtcgggtg cctcccctaa cgtcccccg tgacggagt  
 1021 ttgtgacca catctagcac gcgggacgcg gaaaccgat ggagaaaaca cctacaacc  
 1081 cggccggacg gtgggttcg gccacacta ggggtcgggt gcctgctgc cgggcagggc  
 1141 agtcccggg tgctgtggtg cggcgggag ggctgtcgtc tcgaggtg cggcgggac  
 1201 actccgggcc tcagccgtac ccgcaacggg gacagttct cctcctccg gctggatgg  
 1261 tccctcccc cgaatgcgg cgagatctc cagtcagccc ggaaaacacc cgtgtgccc  
 1321 aggtactct tgctcgaac agacaggccg gacggccac gggggagggt tgtggcagc  
 1381 ggaccacgtg cggcgaccag acgacgggtg ttctcggta tcccgcctc tgtactgtg  
 1441 acagcgtca cgtgtgtct ggctgtccc acggggcgcg agacgctgtg gcatgtgtg  
 1501 tgtgagcca cccaggactg gtgctgggg gtgcccgtc actcccggc acagcctgcg  
 1561 gaggacggc agttctct gcttctcc gtccaggcag cgaactggg gaactattc  
 1621 gcgctgggg atctgtact ttcgggggac ggggcccgcg actactacc cggcaccgcg  
 1681 gtaagggcg gttgtggtg gtccgtaac gcctatccg agctggtcgc cgaagcctac

1741 gacttcgccc gacactgtc gttcctggcc tgcagcggcc agcgcggcta cgccatgctt  
 1801 gacgctatcg acgaggtcgg ctgcagctg gactggaact cccctcacac gtcgctggtg  
 1861 acgacgggga tcggcggcaa cgaicgggg ttcaccagg tttgaagac ctgcatggtg  
 1921 cgggtgccc tgctggacag caaggcgtgc acggaccagg aggacgctat ccgcaagcgg  
 1981 atggcgaaat tcgagacgac gtttgaagag ctcatcagcg aagtgcgcac ccgcgcgccg  
 2041 gacgcccgga tcctgtcgt gggctacccc cggattttc cggaggaacc gaccggcgcc  
 2101 tactacacgc tgaccgcgag caaccagcgg tggctcaacg aaaccattca ggagttcaac  
 2161 cagcagctcg ccgaggctgt cgcggtccac gacgaggaga ttgccgctg gggcggggtg  
 2221 ggcagcgtgg agttcgtgga cgtctaccac gcgtggacg gccacgagat cggctcggac  
 2281 gagccgtggg tgaacgggg gacgtgcgg gacctcgcca cgggggtgac tgtggaccgc  
 2341 agtaccttc accccaacgc cgtggggcac cggcggtcg gtagcgggt catcagcag  
 2401 atcgaaccg gcccgggccg tccgctctat gccacttgc cgtgggtggc gggggcgacc  
 2461 gggacactc tcgccccga ggtgggtga cccggctac cgtccggccc gcaggtctgc  
 2521 gagcactcgc gcgatctgt ccactgcca gtgcagttc tctcgttga tgaccagcgg  
 2581 cggggagagc cggatcgtg agccgtcgt gtcttgacg agcacacccc gctcagggag  
 2641 ccgttcgac agttcttc cggfggccag agtcgggtcg acgtcgtcc cagcccacag  
 2701 gccgatgctg cggcggcga ccacgccgt gccgaccagt tggtcgaggc gggcgcgag  
 2761 cacggggcg agggcgcgga catggtccag gtaagggcg tcgcgacga ggctcaccac  
 2821 ggcagtgcc accgcgagg cgaggcgt gccgccgaag gtgctgccgt gctggccggg  
 2881 gcgatcagc tcgaagact ccgctcgc taccgccgc gccacggca ggatgccgc  
 2941 gccagcgt ttgccgaaca ggtagatc gccctcgt ccgctggt cgaggccc

//

Thermobifida\fusca - GDSx

5 SEC ID N° 7

1 vsgpraatr rffigipal vltaltiv avptgretlw mwceatqdw clgvpvdsrg  
 61 qpaedgfl lspvqaatwg nyvalgdsys sgdgardyyp gtavkggcwr sanaypelva  
 121 eaydfaghls flacsgqrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigiggn dlgstvlkt  
 181 cmvrvpllds kactdqedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilvv gyprifpeep  
 241 tgayytllas nqrwlntiq efnqqlaeav avhdeeaas ggvgsvfvd vyhaldghei  
 301 gsdepwngv qlrdlatgt vdrstfhpna aghravger v ieqietgppr plyatfavva  
 361 gatvdtlage vg

Corynebacterium\efficiens\ GDSx 300 aa

10 SEC ID N° 8

1 mrtviaasa lllagcadg areetagapp gessggiree gaeastsitd vyalgdsya  
 61 amggrdqplr gepfclrsg nypellhaev tdlcggavt gdilleprtig ertlpaqvda  
 121 ltedttivl siggndlgfg evagcileri agenaddcvd lletigeql dqippqldrv  
 181 heairdragd aqvvtgylp lvsagdcpel gdvseadrw aveltgqine tvreaaerhd  
 241 alfvipddad ehtscappqg rwadiqqqt dayplhptsa gheamaaavr dalglepvqp

//

15 SEC ID N° 9

1 tctgggggt ttatgggggt gtatcggct cgtcctgggt ggatcccgc aggtggggta  
 61 ttcacggggg acttttgt ccaacagccg agaatgagt cctgagcgg tgggaatgag

121 gtgggcgggg ctgtgtcggc atgagggggc ggcgggctct gtggtgcccc gcgacccccg  
 181 gccccgggta gcggtgaaat aaatccggct gtaacagca tcccgtgccc acccgtcgg  
 241 ggaggtcagc gcccggagtg tctacgcagt cggatcctct cggactcggc catgctgtcg  
 301 gcagcaatgc gctcccgggt ctggcgctc ctggctgtt ctgctgctg tcccggaa  
 361 gcgaaatgat caccggggag tgatacaccg gtggtctcat cccggatgcc cactcggcg  
 421 ccatccggca atccgggag ctccgggtgg aagtaggtg catccgatgc gtcgggacg  
 481 ccatagtggg cgaagatctc atcctgctcg aggggtctca ggcactctc cggatcgata  
 541 tcggggggct ccttgatggc gtcctgtg aaaccgaggt gcagctgtg ggcctcaat  
 601 ttcgaccac ggagcgggac gaggctggaa tgacggccga agagcccgtg gtggacctca  
 661 acgaagggtg gtatgccgt gtcacttg aggaacacgc cctccaccgc acccagctg  
 721 tggccggagt tctgtaggc gctggcatcc agaagggaaa cgaatcata ttgtcggtg  
 781 tgctcagaca tgatctctc ttgctgctg ttctgtgtac taccacgga gggctgaatg  
 841 caactgtat tttctgta ttttagaat tggccatat cccacaggct ggctgtggc  
 901 aaatcgcat caagtaatcc ctgtcacaca aaatgggtg tgggagccct ggtcgggtt  
 961 ccgtgggagg cgccgtgccc cgcaggatcg tcggcatcgg cggatcggc cggatccccg  
 1021 cgtgtaataa aatcattctg taacctcat caccgtgtg ttaggtatc cgccccctt  
 1081 gtcctgacc cgtccccgc gcgcccggag ccgcccgtg cggtagacag gggagacgtg  
 1141 gacacatga ggacaacggt catcgcagca agcgcattac tcctctcgc cggatgcccg  
 1201 gatggggccc gggaggagac cgcgggtgca ccgcccgggt agtctcccg gggcatccgg  
 1261 gaggaggggg cggaggcgtc gacaagcatc accgacgtc acatcgcct cggggatcc  
 1321 tatcgccga tggcggggc ggatcagccg ttaccgggtg agccgtctg cctgctcgc  
 1381 tccgtaatf acccgaact cctccacgca gaggcaccg atctcactg ccagggggcg  
 1441 gtgaccggg atctgtcga acccaggacg ctgggggagc gcacgctgccc ggcgagggtg  
 1501 gatgcctga cggaggacac caccctggtc accctctca tcgggggcaa tgacctcga  
 1561 ttcggggagg tgcgggatg catccgggaa cggatcggc gggagaacgc tgatgattg  
 1621 gtggacctg tgggggaaac catcggggag cagctcagc agctcccc gcagctggac  
 1681 cgcgtgcacg aggtatccg ggaccgcgc ggggacgagc aggtgtgtg caccggtac  
 1741 ctgcccctg tctgtccgg ggactgccc gaactgggg atgtctcca ggcggatct  
 1801 cgttggggc ttgagctgac cggcagatc aacgagaccg tgcgagggc ggccgaacga  
 1861 caccatgccc tcttctct ccccgacgat gccgatgagc acaccagtg tgcaccccc  
 1921 cagcagcgt gggcgatata ccaggccaa cagaccgatg cctatccgct gcacccgacc  
 1981 tcccccggc atgaggcgt ggcggccgc gtcgggagc cgtgggctt ggaaccggtc  
 2041 cagccgtagc gccgggccc cgttctga cgaaccaacc atgccaggct gcagtcacat  
 2101 ccgcacatag cgcgcgggg cgatggagta cgcacatag aggatgagcc cgatgccgac  
 2161 gatgatgag agcacactg caaagggtg tccccgagg gtgcgagag ccgagtcag  
 2221 acctgcccg tctccggat catgggcca accggcagat acgatcaaca cccccggat  
 2281 cccgaaggc ataccaggc cgaataacc ggtgtctc gtgatgatga tcgggtccc  
 2341 gacctgccct gacccgcac ccgctccag atcctcccg aaatccggg tggccccct  
 2401 ccagaggtg tagacaccg cccccagt caccagccc gcgaccaca ccagaccac  
 2461 acccagggt tgggatagg cgtggcggg gatcgggtg gcggtctcc catcggagg  
 2521 gctgccccc cgggcaagg tggagggtt caccgccagg gagaagtaga ccatggccat  
 2581 gaccgcccc ttggccctt cctgaggct ctgcccgc agcagctggc tcaatgcca  
 2641 gagtccagg gccccaggc cgaatgagc aaccacagg aggaactgcc caccggagc  
 2701 ctcccgatg gtggccagg caccgaat cgaggcctca tcaccgaac cggcgatcc  
 2761 agtggcagc cgcaccgca tccaccgat gaggatgtg agtatgcca ggacaatga  
 2821 accacctg gccagggtg tcagcgggg gtgtctctg gcctgtcgg cagcccgtc  
 2881 gatcgtcgt ttcgggatc tgggtctgc ctatccata gctccatg aaccgctg  
 2941 aggggtggc ggcactgtc agggcggtt gtgatctgaa ctgtgatgt ccatcaacc

//

S.coelicolor\ GDSx 268 aa

5 SEC ID N° 12

NP\_625998.

1 mrrfrivgl ssvlaagaa lgaataqaa qpaaadgyva lgdsyssvg agsysssgd  
 61 kkrstkahpy lwaaahspst fdfacsgar tgdvlsqglg plssgtglvs isigndagf  
 121 admfctvlq sessclsria taeaydstl pgkldgvysa isdkapnahv vvigprfyk  
 181 lgttciglse tkrtainkas dhlnvlaqr aaahgftfgd vrttftghel csgspwlhsv  
 241 nwlngesyh ptaagqsagy lplvngaa

//



SEC ID N° 13

1 cccggcggcc cgtgcaggag cagcagccgg cccgcgatgt cctcgggctg cgtctcaic  
 61 aggccgtcca tcgctcggc gaccggcggc gtgtagttgg cccggacctc gtcccaggtg  
 121 cccgcggcga tctggcgggt ggtgcggfgc gggccgcgcc gaggggagac gfaccagaag  
 181 cccatcgtca cgttctccgg ctgcggfctg ggctcgtccg ccgctccgtc cgtcgcctcg  
 241 ccgagcacct tctcggcgag gtcggcgtg gtcgccgtca ccgtgacgtc ggcgccccgg  
 301 ctccagcgcg agatcagcag cgtccagccg tgcctcccg ccagcgtcgc gctcggfctg  
 361 tctcgcggg cgtccgcag cacgcgcgcg cccggcggca gcagcgtggc gccggaccgt  
 421 acgcggtcga tgttcggcg gtcgagtag ggctgctcac ccgtgcccga acggccgagg  
 481 aacagcgcgt cgcagcgtc ggacggggag tgcgtgctg ccacgtgag ccggatcggc  
 541 agggctctg gcgggtcac ggacatgctg ccatgatcgg gcaccggcc gccgcgtgca  
 601 cccgcttcc cgggcacgca cgcagggggc tttctcggc tctccgtcc gaactgaac  
 661 gagtgcagc catttctgg catggacact tccagtcaac gcgctgact gctaccagg  
 721 tftggcagc aalcctgcta agggaggctc catgagactg tccgactg tggcttct  
 781 gagtgcctc gtcctcggc cggcggccg cctaccggg gcagcagcc gccaggcggc  
 841 ccaaccggc gccgcggcag gctatgtggc cctcggcgcac tctactctc ccggggtcgg  
 901 agcgggagc facatcagct cgcgcggcga ctgcaagcgc agcacgaagg cccatcccta  
 961 cctgfgggcg gccgccact cgcctccac gttcacttc accgcctgtt ccggcggccg  
 1021 tacgggtgat gttctctcg gacagctcg cccgctcagc tccggcaccg gccctgctc  
 1081 gatcagcatc ggcggcaacg acgcccgtt cgcgcgacac atgacgacct ggtgctcca  
 1141 gtcggagagc tctgcctgt cgcggatcgc caccggcgg gcgtacgtc actcagcgt  
 1201 gccgggcaag ctgcagggcg tctactcggc aatcagcgc aagggcggca acgcccagct  
 1261 cgtcgtcctc ggctaccgc gcttctcaa gctcggcacc acctcagc gccctgcca  
 1321 gaccaagcgg acggcgaica acaaggcctc gcaccacctc aacaccgtcc tgcggcagc  
 1381 cggcggcggc cagggctca cctcggcga cgtacgcacc acctcaccg gccacgagct  
 1441 ggtcctcggc agcccctggc tgcacagcgt caactggctg aacatcggcg agtctgacca  
 1501 cccaccgcg gccggccagt ccggtggcta cctgcccgtc ctaaccggcg ccgctgacc  
 1561 tcaggcggaa ggagaagaag aaggagcggg gggagacgag gagtgggagg cccgccccg  
 1621 cggggtccc gtccccgtc cgtctccgt cccggtccc caagtaccg agaacggcc  
 1681 cgcgtcggc gttgcccga ccggactccg cactccacg cgcacggcac tctgaacgc  
 1741 gccgggtcgt tctgctcgtc taccaccac gccgtcctgg cgcgagcgtc cgcggcccga  
 1801 cgggaaggac agcgtccgcc accccggatc ggagaccgac ccgtccggcg taccaccg  
 1861 gtagccgacc tcccgggca gcccccgc cgtgaacgtc gccgtgacg cgggtgccc  
 1921 gtcgtcggc ggcggacagg ccccgagta ggggtgctc gagcccacca cggctacctc  
 1981 caccgactgc gctcggggc

//

5 S.vermitilis\ GDSx 269 aa

SEC ID N° 14

NP 827753.

1 mrsritayv tsillavga ltgaataqas paaaatgyva lgdsyssvg agsylvssgd  
 61 ckrsskaypy lwqaahspss fsfmacsgar tgdvianqig tlnsstgivs ltiggnadagf  
 121 sdvmttcvlq sdsaclsrin takayvdstl pgqldsvyta istkapsahv avlgyprfyk  
 181 lggscclagls etkrsainda adylnsaiak raadhgftg dvkstftghe icssstwhs  
 241 ldlniqsy hptaagqsgg ylpvmnsva

//

SEC ID N° 15

1 ccaccgccgg gtcggcggcg agtctcctgg cctcggctgc ggagagggtg gccgtgtagc  
 61 cggtcagcgc ggccgcgaac gtcttctca ccgtgccgcc gtaactcgtg atcaggccct  
 121 tgccttctct cgagcgggcc tfgaagccgg tgccttctt gagcgtgacg atgtagctgc  
 181 ccttgatcgc ggtgggggag ccggcggcga gcaccgtgcc ctccggccgg gtagcctggg  
 241 cgggcagtgc ggtgaalccg cccacgaggg cgccggctgc cacggcgggt atcggcggca  
 301 tccgatctt ctgctacgc agctgtgcca tacgagggag tctcctctg ggcagcggcg  
 361 cgctgggtg gggcgcacgg ctgtgggggg tgcgcgcgtc atcacgcaca cgccctgga  
 421 gcgtcgtgt cgcctctggg ttgagtaaag cctcggccat ctacgggggt ggctcaaggg  
 481 agttgagacc ctgtcatgag tctgacatga gcacgcaatc aacggggccg tgagcacc  
 541 ggggagacc cggaaagtgc cgagaagtct tggcatggac acttctctg aacacgcgta  
 601 gctgttaccg cgttacggc agagatctc ctaaaggag gttccatgag acgtcccga  
 661 attaccgcat acgtgacct acctctctc gccgtcggct gcgccctac cggggcagcg  
 721 acggcggcagg cgtccccagc cgccggggcc acgggctatg tggccctcgg cgactcgtac  
 781 tctcgggtg tggcggccgg cagctacct agctccagcg gcgactgcaa gcgcagttcg  
 841 aaggcctatc cgtacctcg gcaggcccg catcaccct cgtcgtcag tttcatggct  
 901 tctcggggc ctgctacggg tgatgtctg gccaatcagc tcggcaccct gaactcgtcc  
 961 accggcctcg tctccctac catcggaggc aacgacgcgg gcttctcga cgtcatgacg  
 1021 acctgtgtc tccagtcga cagcgcctc ctctcccgca tcaacacggc gaaggcgtac  
 1081 gtcgactcca cctgcccgg ccaactcgc agcgtgtaca cggcagatcag cacgaaggcc  
 1141 ccgtcggccc atgtggcctg gctgggtac ccccgctct acaactggg cggctctg  
 1201 accgcccgg tctcggagac caagcggctc gccatcaacg acgcccga ctatdgaac  
 1261 agcccatcg ccaagcgcgc cgccgaccac ggcttaccct tcggcgacgt caagagcacc  
 1321 ttcaccggcc atgagatctg ctccagcagc acctggctgc acagctcga cctgctgac  
 1381 atcggccagt cctaccacc gaccgcggcc ggccagtcg gcggctatct gccgtcatg  
 1441 aacagcgtg cctgagctc cagcggctga attttaagg cctgaattt taaggcgaag  
 1501 gtgaaccgga agcggaggcc ccgtccctg gggctcctg cgcacaggtc accgagaacg  
 1561 gcacggagt ggacgtcgt cgcaccgggt cgcgcacct gacggcagc tcttcgaga  
 1621 tcttccgct cgtgtcgtac gtggtgacga acacctctt ctgctgggtc tttccggcg  
 1681 tgcggggaa ggacagcgtc tccagcccg gatccgggac ctgccttc ttggtcacc  
 1741 agcggctact cactcagacc ggcaccggc ccaccgtgaa ggtcggcgtg aacgtggcg  
 1801 cctggcgggt gggcggcggg caggcaccgg agtagtgggt gtgcacggcg gtgaccgtca  
 1861 ccttaccgga ctggccggc ggggtcgtc taccggccg gccaccggc cctccggag  
 1921 tggagcccga gctgtgtcg ccccgccg cggcgtgtc gtcctcggg gtttcaac

//

5 Thermobifida\fusca\ - GDSx

SEC ID N° 16

1 mgspraatr rrlflgipal vlvtaivl avptgretlw rmwceatqdw clgvpvdsrg  
 61 qpaedgfill lspvqaatwg nyyalgdsys sgdgardyyp gtavkggcwr sanaypelva  
 121 eaydfaghls flacsgqrgy amldaidevg sqldwnspht slvtigggd dlgtstvtkt  
 181 cmvrvpllds kactdqedai rkrmakfett feelisevrt rapdarilvv gyprifpeep  
 241 tgayyiltas nqrwlneiq efnqqlaeav avhdeeiaas ggvgsvefd vyhaldghei  
 301 gsdepwvngv qlrdlatgvt vdrstfhpna aghravgerv ieqietgppr plyatfavva  
 361 gatvdtlage vg

//

10

Thermobifida\fusca\ - GDSx

## SEC ID N° 17

```

1   ctgcagacac cgcggccgcc ttctcccga tgcgcatgt cggcgactcc ctacagcaca
61  cggcaagat gtactccaag atgcgaggct acctgcccgc ctcccgcg tactacgagg
121 gccgcttc gaacggccg gtctggctgg agcagctgac gaagcagttc cccggcctga
181 cgatcgcaa cgaggccgag gggggcgcga ccgagctgc ctacaacaag atctctgga
241 acccgaagta ccaggtcatt aacaacctgc actacagagt caccagttc ttgagaag
301 actcgtcaa gcccagcag ctggatcacc tgtgggtggg cgccaacgac tacctggcct
361 acggtggaa cacggagcag gacgccaagc ggggtcgcga cgccatctcg gacgcgcaa
421 accgatgtt cctgaacggc gcgaagcaga tctgctgt caacctgcc gacctggcc
481 agaaccctgc cggccgctcc cagaaggtcg tcgaggccgt ctgcacgtg tccgctacc
541 acaacaagct gctcctcaac ctgcccggc agctcggcc gacgggcatg gtcaagctgt
601 tcgagatcga caagcagttc gcggagatgc tgcgagacc ccagaacttc ggcctgagcg
661 acgtggagaa cccgtgctac gacggcggct acgtgtggaa gccgttcgcc acccgtccg
721 tctgaccga ccggcagctg tcggcctct cggccagga ggcctggcg atcgtggca
781 acccgtcct ggcacaggcg gtagcttgc cgatggccc cgctggcc tggccctca
841 actcagagg caagatgtt tgggaccagg tccaccac caccgtggtc cagccgccc
901 tctcggagcg cgccgcccacc tcatcgaga ccagtacga gttctgcc cactagtcta
961 gaggatcc

```

5 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, o una enzima lipolítica capaz de hidrolizar lípidos polares y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido polar hasta uno o más sustratos aceptores de acilo codificada por una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEC ID N° 3 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, en un producto alimenticio para la preparación de un lisoglucolípido, por ejemplo digalactosil monoglicérido (DGMG) o monogalactosil monoglicérido (MGMG) por tratamiento de un glucolípido (por ejemplo, digalactosil diglicérido (DGDG) o monogalactosil diglicérido (MGDG)) con la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención para producir el producto de hidrolisis parcial, es decir, el lisoglucolípido.

20 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona también adicionalmente el uso de una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, o una enzima lipolítica capaz de hidrolizar lípidos polares y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido polar hasta uno o más sustratos aceptores de acilo codificada por una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas como SEC ID N° 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, en un producto alimenticio para la preparación de un lisofosfolípido, por ejemplo lisolecitina, por tratamiento de un fosfolípido (por ejemplo, lecitina) con la enzima para producir el producto de hidrolisis parcial, es decir, un lisofosfolípido.

30 En otro aspecto, la presente invención proporciona también adicionalmente el uso de una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, o una enzima lipolítica capaz de hidrolizar lípidos polares y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido polar hasta uno o más sustratos aceptores de acilo codificada por una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas como SEC ID N° 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, en un huevo o un producto basado en huevo para la hidrolisis de fosfolípidos y/o glucolípidos.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, o una enzima lipolítica capaz de hidrolizar lípidos polares y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido polar hasta uno o más sustratos aceptores de acilo codificada por una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas como SEC ID N° 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, en un sustrato (preferiblemente, un producto alimenticio) para hidrolizar grupos acilo graso.

50 En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos

aceptores de acilo que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, o una enzima lipolítica capaz de hidrolizar lípidos polares y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido polar hasta uno o más sustratos aceptores de acilo codificada por una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas como SEC ID N° 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, en un aceite comestible para reducir el contenido de un fosfolípido.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al uso de la enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo que comprende una cualquiera de las secuencias de aminoácidos mostradas como SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, o una enzima lipolítica capaz de hidrolizar lípidos polares y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido polar hasta uno o más sustratos aceptores de acilo codificada por una cualquiera de las secuencias de nucleótidos mostradas como SEC ID N° 3 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98% de identidad con la misma, en un sustrato (preferiblemente una mezcla de bioconversión que comprende lípidos polares (preferiblemente glucolípidos)) para la producción en la preparación de productos de alto valor, tales como ésteres de carbohidrato y/o ésteres de proteína y/o ésteres de subunidad proteica y/o un éster de hidroxiácido.

En otro aspecto amplio la presente invención puede proporcionar una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un glucolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde al menos un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo, donde la enzima se puede obtener, preferiblemente se obtiene, de *Streptomyces avermitilis*.

En una realización de la presente invención, preferiblemente la especie *Streptomyces* de la cual se puede obtener la enzima lipolítica (o se obtiene) no es *Streptomyces rimosus*.

En una realización de la presente invención, preferiblemente la especie *Streptomyces* de la cual se puede obtener la enzima lipolítica (o se obtiene) no es *Streptomyces coelicolor*.

#### VENTAJAS

Una ventaja de la presente invención es que la enzima lipolítica tiene actividad significativa de hidrolisis de glucolípidos. Esto fue sorprendente para una enzima lipolítica de *Streptomyces* spp.

Una ventaja adicional de la presente invención es que la enzima lipolítica no tiene actividad o no tiene actividad significativa de hidrolisis de triacilglicerol.

#### AISLADA

En un aspecto, preferiblemente la secuencia está en una forma aislada. El término "aislada" significa que la secuencia está al menos sustancialmente libre de al menos un componente diferente con el cual está asociado de forma natural la secuencia en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza.

#### PURIFICADA

En un aspecto, preferiblemente la secuencia está en una forma purificada. El término "purificada" significa que la secuencia está en un estado relativamente puro - por ejemplo, al menos aproximadamente un 90% puro, o al menos aproximadamente un 95% puro o al menos aproximadamente un 98% puro.

#### SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

El alcance de la presente invención abarca secuencias de nucleótidos que codifican enzimas que tienen las propiedades específicas definidas en este documento.

La expresión "secuencia de nucleótidos" como se usa en este documento, se refiere a una secuencia oligonucleotídica o secuencia polinucleotídica, y variantes, homólogos, fragmentos y derivados de las mismas (tales como partes de las mismas). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser bicatenaria o monocatenaria ya sea que represente la hebra con sentido o antisentido.

La expresión "secuencia de nucleótidos" en relación con la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético, y ARN. Preferiblemente, significa ADN, más preferiblemente secuencia de ADNc codificante para la presente invención.

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos cuando se refiere a y cuando se abarca por el alcance *per se* de la presente invención, no incluye la secuencia de nucleótidos nativa de acuerdo con la presente invención

cuando está en su entorno natural y cuando está ligada a su secuencia o secuencias asociadas de forma natural que también están en su entorno natural. Para facilitar las referencias, llamaremos a esta realización preferida la "secuencia de nucleótidos no nativa". A este respecto, la expresión "secuencia de nucleótidos nativa" significa una secuencia de nucleótidos completa que está en su entorno nativo y cuando está unida de forma funcional a un promotor completo con el que está asociado de forma natural, estando dicho promotor también en su entorno nativo. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos abarcada por la presente invención puede aislarse y/o purificarse después de la expresión de una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo. Preferiblemente, sin embargo, la secuencia de aminoácidos abarcada por el alcance de la presente invención puede expresarse por una secuencia de nucleótidos en su organismo nativo pero donde la secuencia de nucleótidos no está bajo el control del promotor con el que está asociada de forma natural dentro de ese organismo.

#### PREPARACIÓN DE LA SECUENCIA DE NUCLEÓTIDOS

Típicamente, la secuencia de nucleótidos abarcada por el alcance de la presente invención se prepara usando técnicas de ADN recombinante (es decir, ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa de la invención, la secuencia de nucleótidos podría sintetizarse, por completo o en parte, usando métodos químicos bien conocidos en la técnica (véase, Caruthers MH et al., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 y Horn T et al., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

Una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que tiene las propiedades específicas definidas en este documento puede identificarse y/o aislarse y/o purificarse de cualquier célula u organismo que produzca dicha enzima. Son bien conocidos diversos métodos dentro de la técnica para la identificación y/o aislamiento y/o purificación de secuencias de nucleótidos. A modo de ejemplo, pueden usarse técnicas de amplificación por PCR para preparar más de una secuencia una vez se ha identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

A modo ejemplo adicional, puede construirse una biblioteca de ADN genómico y/o ADNc usando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la enzima. Si la secuencia de aminoácidos de la enzima o una parte de la secuencia de aminoácidos de la enzima es conocida, pueden sintetizarse sondas oligonucleotídicas marcadas y usarse para identificar clones que codifican la enzima a partir de la biblioteca genómica preparada a partir del organismo. Como alternativa, podría usarse una sonda oligonucleotídica marcada que contiene secuencias homólogas a otra enzima conocida para identificar clones que codifican la enzima. En el último caso, se usan condiciones de hibridación y lavado de inferior rigurosidad.

Como alternativa, los clones que codifican la enzima podrían identificarse insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias enzima negativas con la biblioteca de ADN genómico resultante, y después sembrando las bacterias transformadas en placas de agar que contienen un sustrato para la enzima (por ejemplo, maltosa para una enzima que produce glucosidasa (maltasa)), permitiendo de ese modo que se identifiquen clones que expresan la enzima.

En una alternativa adicional más, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima puede prepararse de forma sintética por métodos convencionales establecidos, por ejemplo, el método de fosforamidita descrito por Beucage S.L. et al., (1981) Tetrahedron Letters 22, pág. 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al., (1984) EMBO J. 3, pág., 801-805. En el método de fosforamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automatizado, se purifican, hibridan, ligan y clonan en vectores apropiados.

La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico o sintético mixto, origen sintético y ADNc mixto, o de origen genómico y ADNc mixto, preparada por ligamiento de fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según lo apropiado) de acuerdo con técnicas convencionales. Cada fragmento ligado corresponde a diversas partes de la secuencia completa de nucleótidos. La secuencia de ADN también puede prepararse por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo como se describe en el documento US 4,683,202 o en Saiki R K et al., (Science (1988) 239, pág. 487-491).

Debido a la degeneración en el código genético, pueden producirse fácilmente secuencias de nucleótidos en que el uso de codones de triplete, para algunos o todos los aminoácidos codificados por la secuencia de nucleótidos original, se han cambiado produciendo de ese modo una secuencia de nucleótidos con baja homología a la secuencia de nucleótidos original pero que codifica la misma secuencia de aminoácidos, o una variante, codificada por la secuencia de nucleótidos original. Por ejemplo, para la mayoría de los aminoácidos, la degeneración del código genético es en la tercera posición en el codón de triplete (posición oscilante) (para referencia véase Stryer, Lubert, Biochemistry, Tercera Edición, Freeman Press, ISBN 0-7167-1920-7) por lo tanto, una secuencia de nucleótidos en que todos los codones de triplete se han "oscilado" en la tercera posición sería aproximadamente un 66% idéntica a la secuencia de nucleótidos original, sin embargo, la secuencia de nucleótidos enmendada codificaría la misma secuencia de aminoácidos primaria, o una variante, que la secuencia de nucleótidos original.

Por lo tanto, la presente invención se refiere adicionalmente a cualquier secuencia de nucleótidos que tenga uso alternativo de codones de triplete para al menos un codón de triplete que codifica un aminoácido, pero que codifica

la misma secuencia polipeptídica, o una variante, que la secuencia polipeptídica codificada por la secuencia de nucleótidos original.

5 Además, organismos específicos típicamente tienen una desviación en cuanto a los codones de triplete que se usan para codificar los aminoácidos. Están ampliamente disponibles tablas de uso de codones preferidos, y pueden usarse para preparar genes con codones optimizados. Dichas técnicas de optimización de codones se usan rutinariamente para optimizar la expresión de transgenes en un hospedador heterólogo.

## 10 EVOLUCIÓN MOLECULAR

Una vez se ha aislado una secuencia de nucleótidos codificante de enzima, o se ha identificado una secuencia putativa de nucleótidos que codifica enzima, puede ser deseable modificar la secuencia de nucleótidos seleccionada, por ejemplo puede ser deseable mutar la secuencia para preparar una enzima de acuerdo con la presente invención.

15 Pueden introducirse mutaciones usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados.

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

25 En lugar de mutagénesis dirigida al sitio, tal como se ha descrito anteriormente, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente por ejemplo usando un kit comercial tal como el kit de mutagénesis por PCR GeneMorph de Stratagene, o el kit de mutagénesis aleatoria por PCR Diversify de Clontech. El documento EP 0 583 265 se refiere a métodos para optimizar mutagénesis basada en PCR, que también puede combinarse con el uso de análogos mutagénicos de ADN tales como los descritos en el documento EP 0 866 796. Son adecuadas tecnologías de PCR propensas a error para la producción de variantes de enzimas lipolíticas con características preferidas. El documento WO0206457 se refiere a evolución molecular de lipasas.

30 Un tercer método para obtener nuevas secuencias es fragmentar secuencias de nucleótidos no idénticas, usando cualquier cantidad de enzimas de restricción o una enzima tal como Dnasa I, y reensamblando las secuencias completas de nucleótidos que codifican proteínas funcionales. Como alternativa, puede usarse una o múltiples secuencias de nucleótidos no idénticas e introducir mutaciones durante el reensamblaje de la secuencia de nucleótidos completa. Son adecuadas tecnologías de arrastre de ADN y reordenamiento de familias para la producción de variantes de lípido acil transferasas con características preferidas. Los métodos adecuados para realizar el "arrastre" pueden encontrarse en los documentos EP0 752 008, EP1 138 763, EP1 103 606. El arrastre también puede combinarse con otras formas de mutagénesis de ADN como se describe en el documento US 6.180.406 y el documento WO 01/34835.

35 Por tanto, es posible producir numerosas mutaciones dirigidas al sitio o aleatorias en una secuencia de nucleótidos, *in vivo* o *in vitro*, y para seleccionar posteriormente la funcionalidad mejorada del polipéptido codificado por diversos medios. Usando métodos de recombinación *in silico* y *ex vivo* mediados (véanse los documentos WO 00/58517, US 6.344.328, US 6.361.974), por ejemplo, puede realizarse evolución molecular donde la variante producida retiene homología muy baja a enzimas o proteínas conocidas. Dichas variantes obtenidas de ese modo pueden tener analogía estructural significativa con enzimas lipolíticas conocidas, pero tener muy baja homología de secuencia de aminoácidos.

40 Como ejemplo no limitante, además, pueden recombinarse mutaciones y variantes naturales de una secuencia polinucleotídica con las variantes de tipo silvestre u otras mutaciones o variantes naturales para producir nuevas variantes. Dichas nuevas variantes también pueden seleccionarse para funcionalidad mejorada del polipéptido codificado.

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

50 Como será evidente para los especialistas en la técnica, usando herramientas de evolución molecular puede alterarse una enzima para mejorar la funcionalidad de la enzima.

65

Adecuadamente, al enzima lipolítica usada en la invención puede ser una variante, es decir, puede contener al menos una sustitución, deleción o adición de aminoácido, en comparación con una enzima precursora. Las enzimas variantes retienen al menos el 20%, 30%, 40%, 50 %, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% de homología con la enzima precursora. Las enzimas precursoras adecuadas pueden incluir cualquier enzima con actividad esterasa o lipasa. Preferiblemente, la enzima precursora se alinea con la secuencia consenso pfam00657.

En una realización preferida, una enzima lipolítica variante retiene o incorpora al menos uno o más de los restos de aminoácido de la secuencia consenso pfam00657 encontrados en los bloques GDSx, GANDY y HPT.

Las enzimas, tales como lipasas, sin actividad o baja actividad galactolipasa y/o fosfolipasa en un entorno acuoso pueden mutarse usando herramientas de evolución molecular para introducir o potenciar la actividad galactolipasa y/o fosfolipasa, produciendo de ese modo una enzima lipolítica con actividad galactolipasa y/o fosfolipasa significativa adecuada para su uso en las composiciones y métodos de la presente invención.

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

Como alternativa, la enzima variante para su uso en la invención puede tener actividad aumentada sobre triglicéridos, y/o también puede tener actividad aumentada sobre uno o más de los siguientes, lípidos polares, fosfolípidos, lecitina, fosfatidilcolina, glucolípidos, digalactosil monoglicérido, monogalactosil monoglicérido.

#### SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS

El alcance de la presente invención también abarca secuencias de aminoácidos de enzimas que tienen las propiedades específicas definidas en este documento.

Como se usa en este documento, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónima del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónima del término "péptido". En algunos casos, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónima del término "enzima".

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

La enzima abarcada en la presente invención puede usarse junto con otras enzimas. Por tanto, la presente invención también cubre una combinación de enzimas donde la combinación comprende la enzima de la presente invención y otra enzima, que puede ser otra enzima de acuerdo con la presente invención. Este aspecto se analiza en una sección posterior.

Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos cuando se refiere a y cuando está abarcada por el alcance per se de la presente invención no es una enzima nativa. A este respecto, la expresión "enzima nativa" significa una enzima completa que está en su entorno nativo y cuando se ha expresado por su secuencia de nucleótidos nativa.

#### IDENTIDAD/HOMOLOGÍA

La presente invención también abarca el uso de homólogos de cualquier secuencia de aminoácidos de una enzima o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifique dicha enzima.

Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una cierta homología con las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos. Aquí, el término "homología" puede equipararse con "identidad". Estos términos se usarán de forma intercambiable en este documento.

En el presente contexto, se adopta que una secuencia de aminoácidos homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos un 87 o 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos etc. - por ejemplo que la secuencia de aminoácidos objeto. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, restos de aminoácido que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad.

En el presente contexto, se adopta que una secuencia de nucleótidos homóloga incluye una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos un 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos un 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima de la presente invención (la secuencia objeto). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los sitios activos etc. que la secuencia objeto. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, restos de aminoácido que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Para las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos, las comparaciones de homología pueden realizarse a ojo, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencia fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias. El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, un resto cada vez. Esto se llama una alineación "sin huecos". Típicamente, dichas alineaciones sin huecos se realizan solamente sobre una cantidad relativamente corta de restos.

Aunque éste es un método muy simple y coherente, no logra tener en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias por lo demás idénticas, una inserción o delección cause que los siguientes restos de aminoácido se pongan fuera de la alineación, provocando de este modo potencialmente una gran reducción en el % de homología cuando se realiza una alineación global. Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencia se diseñan para producir alineaciones óptimas que tengan en consideración posibles inserciones y delecciones sin penalizar excesivamente el valor de homología global. Esto se consigue insertando "huecos" en la alineación de secuencia para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por hueco" a cada hueco que sucede en la alineación de modo que, para la misma cantidad de aminoácidos idénticos, una alineación de secuencia con la menor cantidad posible de huecos - que refleja mayor vinculación entre las dos secuencias comparadas - consiga un mayor valor que una con muchos huecos. Típicamente se usan "costes de hueco afines" que cargan un coste relativamente alto para la existencia de un hueco y una penalización más pequeña para cada resto posterior en el hueco. Éste es el sistema de valoración de huecos más habitualmente usado. Las altas penalizaciones por hueco por supuesto producirán alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permitirán modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto cuando se usan dichos software para las comparaciones de secuencia. Por ejemplo, cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalización por hueco por defecto para secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

El cálculo del % máximo de homología por lo tanto requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, teniendo en consideración penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para realizar dicha alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Devereux et al. 1984 Nuc. Acids Research 12 p387). Ejemplos de otros software que pueden realizarse comparaciones de secuencia incluyen, aunque sin limitación, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4ª Ed - Capítulo 18), FASTA (Altschul et al., 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y la serie GENEWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsquedas offline y online (véase Ausubel et al., 1999, Short Protocols in Molecular Biology, páginas 7-58 a 7-60).

Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar el programa GCG Bestfit. Una nueva herramienta, llamada BLAST 2 Sequences también está disponible para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos (véase FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; y FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8).

Aunque el % final de homología puede medirse en términos de identidad, el propio proceso de alineación típicamente no se basa en una comparación de pares de todo o nada. En su lugar, generalmente se usa una matriz de valores de similitud escalada que asigna valores a cada comparación por pares en base a la similitud química o distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz habitualmente usada es la matriz BLOSUM62 - la matriz por defecto para la serie BLAST de programas. Los programas GCG Wisconsin generalmente usan los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos personalizada si se suministra (véase el manual del usuario para detalles adicionales). Para algunas aplicaciones, si se prefiere usar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Como alternativa, los porcentajes de homología pueden calcularse usando la característica de alineación múltiple en DNASIS™ (Hitachi Software), basada en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG y Sharp PM (1988), Gene 73 (1), 237-244).

Una vez el software ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software típicamente hace esto como parte de la comparación de secuencia y genera un resultado numérico.

En un aspecto preferible de la presente invención, se usa el siguiente software y ajustes para calcular el porcentaje de homología/identidad de secuencia. Para secuencias de aminoácidos, los porcentajes de identidad (homología) o "positivos" se calculan por el AlignX VectorNTI (Vector NTI Advance 9.1 de Invitrogen Corporation, Carlsbad, California, EEUU.) para cada posible par de secuencias de aminoácidos. Los ajustes son parámetros por defecto (penalización por abertura de hueco - 10, penalización por extensión de hueco 0,1).

Para cada secuencia de ácido nucleico, los porcentajes de identidad (homología) o "positivos" se calculan por el programa AlignX VectorNTI de Informax Inc. (EEUU) para cada posible par de secuencias de ácido nucleico. Los



ajustes son ajustes por defecto que para ADN son: penalización por abertura de hueco: 15 y penalización por extensión de hueco: 6,66. (Mismos ajustes para alineaciones múltiples).

Preferiblemente, la identidad de aminoácidos (homología) se calcula en toda la secuencia de aminoácidos de longitud completa (por ejemplo, SEC ID 4, 5, 7, 8, 10, 12 y 14), o para ácido nucleico respecto a un polinucleótido correspondiente que codifica la respectiva secuencia de aminoácidos de longitud completa. La identidad de aminoácidos o ácidos nucleicos (homología) puede calcular, preferiblemente, comparando la homología/identidad sobre la secuencia polipeptídica madura, es decir, una secuencia polipeptídica que se ha procesado co- o post-traduccionalmente, por ejemplo por escisión de un péptido señal N-terminal, o un evento de escisión C-terminal.

Las secuencias también pueden tener deleciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácido que producen un cambio silencioso y provocar una sustancia funcionalmente equivalente. Pueden hacerse sustituciones deliberadas de aminoácidos en base a la similitud en propiedades de aminoácidos (tales como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los restos) y por lo tanto es útil agrupar aminoácidos juntos en grupos funcionales. Los aminoácidos pueden agruparse juntos en base a las propiedades de su cadena lateral solamente. Sin embargo, es más útil incluir datos de mutación también. Estos conjuntos de aminoácidos así derivados tienen probabilidad de conservarse por razones estructurales. Estos conjuntos pueden describirse en forma de un diagrama de Venn (Livingstone C.D. y Barton G.J. (1993) "Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" *Comput. Appl Biosci.* 9: 745-756) (Taylor W.R. (1986) "The classification of amino acid conservation" *J.Theor.Biol.* 119; 205-218). Las sustituciones conservativas pueden hacerse, por ejemplo, de acuerdo con la siguiente tabla que describe un diagrama de Venn generalmente aceptado de agrupación de aminoácidos.

CONJUNTO		SUB-CONJUNTO	
Hidrófobo	F W Y H K M I L V A G C	Aromático	F W Y H
		Alifático	I L V
Polar	W Y H K R E D C S T N Q	Cargado	H K R E D
		Cargado positivamente	H K R
		Cargado negativamente	E D
Pequeño	V C A G S P T N D	Mínimo	A G S

La presente invención también abarca sustitución homóloga (sustitución y remplazo se usan ambos en este documento para indicar el intercambio de un resto existente de aminoácido, con un resto alternativo) que puede suceder, es decir, sustitución similar por similar tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar etc. También puede suceder sustitución no homóloga, es decir, de una clase de resto a otra o como alternativa implicando la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (a partir de ahora en este documento mencionada como Z), ácido diaminobutírico ornitina (a partir de ahora en este documento mencionada como B), norleucina ornitina (a partir de ahora en este documento mencionada como O), piridilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los remplazos también pueden hacerse por aminoácidos no naturales.

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

Las secuencias de nucleótidos para su uso en la presente invención pueden incluir dentro de ellas nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica varios tipos diferentes de modificación para oligonucleótidos. Éstos incluyen estructuras metil-fosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, debe entenderse que las secuencias de nucleótidos descritas en este documento pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden realizarse para potenciar la actividad *in vivo* o vida de las secuencias de nucleótidos de la presente invención.

La presente invención también abarca el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias presentadas en este documento, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de las mismas, entonces esa secuencia puede usarse como sonda para identificar secuencias codificantes similares en otros organismos, etc.

Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias de la presente invención pero están dentro del alcance de la invención pueden obtenerse de varios modos. Otras variantes de las secuencias descritas en este documento pueden obtenerse por ejemplo sondeando bibliotecas de ADN preparadas a partir de una serie de individuos, por ejemplo, individuos de diferentes poblaciones. Además, pueden obtenerse otros homólogos y dichos homólogos y fragmentos de los mismos en general serán capaces de hibridar selectivamente con las secuencias mostradas en las secuencias enumeradas en este documento. Dichas secuencias pueden obtenerse sondeando bibliotecas de ADNc preparadas a partir de o bibliotecas de ADN genómico de otras especies, y sondeando dichas bibliotecas con sondas que comprenden todo o parte de una cualquiera de las secuencias en las listas de secuencias adjuntas en condiciones de medio de alta rigurosidad. Se aplica consideraciones similares para obtener homólogos de especie y variantes alélicas del polipéptido o secuencias de nucleótidos de la invención.

También pueden obtenerse variantes y homólogos de cepa/especie usando PCR degenerada que usará cebadores diseñados para abordar secuencias en las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Las alineaciones de secuencia pueden realizarse usando software informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo se usa ampliamente el programa GCG Wisconsin PileUp.

Los cebadores usados en PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se usarán en condiciones de rigurosidad inferiores a las usadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia únicos frente a secuencias conocidas.

Como alternativa, dichos polinucleótidos pueden obtenerse por mutagénesis dirigida al sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieren cambios de secuencia de codones silenciosos para optimizar preferencias de codones para una célula hospedadora particular en que se están expresan secuencias polinucleotídicas. Pueden desearse otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) de la invención pueden usarse para producir un cebador, por ejemplo, un cebador de PCR, un cebador para una reacción alternativa de amplificación, una sonda, por ejemplo, marcada con un marcador de revelado por medios convencionales usando marcadores radiactivos o no radiactivos, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos serán de al menos 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud, y también están abarcados por el término polinucleótidos de la invención como se usa en este documento.

Los polinucleótidos tales como polinucleótidos y sondas de ADN de acuerdo con la invención pueden producirse de forma recombinante, sintética, o por cualquier medio disponible para los especialistas en la técnica. También pueden clonarse por técnicas convencionales.

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, que implican una fabricación por etapas de la secuencia deseada de ácido nucleico un nucleótido cada vez. Las técnicas para conseguir esto usando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

Generalmente se producirán polinucleótidos más largos usando medios recombinantes, por ejemplo usando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios adecuados de reconocimiento para enzimas de restricción de modo que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

## 50 BIOLÓGICAMENTE ACTIVO

Preferiblemente, las secuencias variantes etc. son al menos tan biológicamente activas como las secuencias presentadas en este documento.

Como se usa en este documento "biológicamente activo" se refiere a una secuencia que tiene una función estructural similar (pero no necesariamente al mismo grado), y/o función reguladora similar (pero no necesariamente al mismo grado), y/o función bioquímica similar (pero no necesariamente al mismo grado) de la secuencia de origen natural.

## 60 HIBRIDACIÓN

La presente invención también abarca secuencias que son complementarias a las secuencias de ácido nucleico de la presente invención o secuencias que son capaces de hibridar con las secuencias de la presente invención o con secuencias que son complementarias a las mismas.

65

El término "hibridación" como se usa en este documento incluirá "el proceso por el cual una hebra de ácido nucleico se une con una hebra complementaria a través de apareamiento de bases" así como el proceso de amplificación realizado en tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

5 La presente invención también abarca el uso de secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridar con las secuencias que son complementarias a las secuencias presentadas en este documento, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas.

10 El término "variante" también abarca secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos presentadas en este documento.

15 Preferiblemente, el término "variante" abarca secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar en condiciones rigurosas (por ejemplo, 50°C y SSC 0,2x {SSC 1x = NaCl 0,15 M, Na<sub>3</sub>citrato 0,015 M pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en este documento.

Más preferiblemente, el término "variante" abarca secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar en condiciones altamente rigurosas (por ejemplo, 65°C y SSC 0,1x {SSC 1x = NaCl 0,15 M, Na<sub>3</sub>citrato 0,015 M pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en este documento.

20 La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos de la presente invención (incluyendo secuencias complementarias de las presentadas en este documento).

25 La presente invención también se refiere a secuencias de nucleótidos que son complementarias a secuencias que pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos de la presente invención (incluyendo secuencias complementarias de las presentadas en este documento).

30 También se incluyen dentro del alcance de la presente invención secuencias polinucleotídicas que son capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos presentadas en este documento en condiciones de rigurosidad intermedia a máxima.

35 En un aspecto preferido, la presente invención cubre secuencias de nucleótidos que pueden hibridar con la secuencia de nucleótidos de la presente invención, o el complemento de la misma, en condiciones rigurosas (por ejemplo, 50°C y SSC 0,2x).

En un aspecto más preferido, la presente invención cubre secuencias de nucleótidos que pueden hibridar con la secuencia de nucleótidos de la presente invención, o el complemento de la misma, en condiciones altamente rigurosas (por ejemplo, 65°C y SSC 0,1x).

#### 40 RECOMBINANTE

En un aspecto, la secuencia para su uso en la presente invención es una secuencia recombinante - es decir una secuencia que se ha preparado usando técnicas de ADN recombinante.

45 Estas técnicas de ADN recombinante pertenecen a las capacidades de una persona especialista en la técnica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

#### 50 SINTÉTICO

En un aspecto, la secuencia para su uso en la presente invención es una secuencia sintética - es decir, una secuencia que se ha preparado por síntesis química o enzimática *in vitro*. Incluye, aunque sin limitación, secuencias preparadas con uso de codones óptimos para organismos hospedadores - tales como las levaduras metilotróficas *Pichia* y *Hansenula*.

#### 55 EXPRESIÓN DE ENZIMAS

60 La secuencia de nucleótidos para su uso en la presente invención puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede usarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos, en forma enzimática, en y/o a partir de una célula hospedadora compatible.

La expresión puede controlarse usando secuencias de control por ejemplo secuencias reguladoras.

65 La enzima producida por una célula recombinante hospedadora por expresión de la secuencia de nucleótidos puede secretarse o puede contenerse de forma intracelular dependiendo de la secuencia y/o el vector usados. Las

secuencias codificantes pueden diseñarse con secuencias señal que dirijan la secreción de las secuencias codificantes de sustancia a través de una membrana celular procariota o eucariota particular.

#### VECTOR DE EXPRESIÓN

- 5 La expresión "vector de expresión" significa una construcción con capacidad de expresión *in vivo* o *in vitro*.
- Preferiblemente, el vector de expresión se incorpora en el genoma de un organismo hospedador adecuado. El término "incorporado" preferiblemente cubre la incorporación estable en el genoma.
- 10 La secuencia de nucleótidos de la presente invención puede estar presente en un vector en que la secuencia de nucleótidos está unida de forma funcional a secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos por un organismo hospedador adecuado.
- 15 Los vectores para su uso en la presente invención pueden transformarse en una célula hospedadora adecuada como se describe a continuación para proporcionar la expresión de un polipéptido de la presente invención.
- La elección del vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido, o vector fágico a menudo dependerá de la célula hospedadora en que tiene que introducirse.
- 20 Los vectores para su uso en la presente invención pueden contener uno o más genes marcadores de selección - tales como un gen, que confiere resistencia a antibióticos, por ejemplo, resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Como alternativa, la selección puede conseguirse por co-transformación (como se describe en el documento WO91/17243).
- 25 Los vectores pueden usarse *in vitro*, por ejemplo, para la producción de ARN o usarse para transfectar; transformar, transducir o infectar una célula hospedadora.
- Por tanto, en una realización adicional, la invención proporciona un método para preparar secuencias de nucleótidos de la presente invención introduciendo una secuencia de nucleótidos de la presente invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible, y cultivando la célula hospedadora en condiciones que provocan la replicación del vector.
- 30 El vector puede comprender adicionalmente una secuencia de nucleótidos que posibilita que el vector se replique en la célula hospedadora en cuestión. Ejemplos de dichas secuencias son los orígenes de replicación de plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

#### SECUENCIAS REGULADORAS

- 40 En algunas aplicaciones, la secuencia de nucleótidos para su uso en la presente invención está unida de forma funcional a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos, tal como por la célula hospedadora elegida. A modo de ejemplo, la presente invención cubre un vector que comprende la secuencia de nucleótidos de la presente invención unida de forma funcional a dicha secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.
- 45 La expresión "unida de forma funcional" se refiere a una yuxtaposición donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de su modo pretendido. Una secuencia reguladora "unida de forma funcional" a una secuencia codificante está ligada de tal modo que la expresión de la secuencia codificante se consigue en condiciones compatible con las secuencias de control.
- 50 La expresión "secuencias reguladoras" incluye promotores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión.
- El término "promotor" se usa en el sentido normal de la técnica, por ejemplo un sitio de unión a ARN polimerasa.
- 55 La expresión potenciada de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la presente invención también puede conseguirse mediante la selección de regiones reguladoras heterólogas, por ejemplo regiones promotoras, líderes de secreción y terminadoras.
- 60 Preferiblemente, la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención se une de forma funcional a al menos un promotor.
- Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos en un hospedador bacteriano, fúngico o de levadura son bien conocidos en la técnica.
- 65

CONSTRUCCIONES

El término "construcción" - que es sinónimo de términos tales como "conjugado", "casete" e "híbrido" - incluye una secuencia de nucleótidos para su uso de acuerdo con la presente invención directa o indirectamente unida a un promotor.

Un ejemplo de una unión indirecta es la provisión de un grupo espaciado adecuado tal como una secuencia intrónica, tal como el intrón Sh1 o el intrón ADH, intermedia, el promotor y la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Lo mismo es cierto para el término "fusionado" en relación a la presente invención que incluye unión directa o indirecta. En algunos casos, los términos no cubren la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína asociada de forma normal con el promotor génico de tipo silvestre y cuando ambos se expresan en su entorno natural.

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

Para algunas aplicaciones, preferiblemente la construcción de la presente invención comprende al menos la secuencia de nucleótidos de la presente invención unida de forma funcional a un promotor.

CÉLULAS HOSPEDADORAS

La expresión "célula hospedadora" - en relación a la presente invención incluye cualquier célula que comprenda la secuencia de nucleótidos o un vector de expresión como se ha descrito anteriormente y que se usa en la producción recombinante de una enzima que tiene las propiedades específicas como se define en este documento.

Por tanto, una realización adicional de la presente invención proporciona células hospedadoras transformadas o transfectadas con una secuencia de nucleótidos que expresa la enzima de la presente invención. Las células se elegirán para ser compatibles con dicho vector y pueden ser, por ejemplo, células procariotas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, de levaduras o vegetales. Preferiblemente, las células hospedadoras no son células humanas.

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

Dependiendo de la naturaleza de la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la presente invención, y/o la conveniencia de procesamiento adicional de la proteína expresada, pueden preferirse hospedadores eucariotas tales como levaduras u otros hongos. En general, se prefieren células de levadura sobre las células fúngicas porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas se secretan mal de la célula de levadura, o en algunos casos no se procesan apropiadamente (por ejemplo, hiperglicosilación en levaduras). En estos casos, debe seleccionarse un organismo hospedador fúngico diferente.

El uso de células hospedadoras adecuadas - tales como células hospedadoras de levadura, fúngicas y vegetales - puede proporcionar modificaciones post-traduccionales (por ejemplo, miristoilación, glucosilación, truncamiento, lipidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) que puedan necesitarse para conferir actividad biológica óptima sobre productos de expresión recombinante de la presente invención.

La célula hospedadora puede ser una cepa deficiente en proteasa o proteasa menos.

El genotipo de la célula hospedadora puede modificarse para mejorar la expresión.

Ejemplos de modificaciones de células hospedadoras incluyen deficiencia en proteasa, suplementación de ARNt raros, y modificación del potencial reductor en el citoplasma para potenciar la formación de enlaces disulfuro.

Por ejemplo, la célula hospedadora *E. coli* puede sobre-expresar ARNt raros para mejorar la expresión de proteínas heterólogas como se ejemplifica/describe en Kane (Curr Opin Biotechnol (1995), 6, 494-500 "Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in E.coli"). La célula hospedadora puede ser deficiente en carias enzimas reductoras favoreciendo de este modo la formación de enlaces disulfuro estables como se ejemplifica/describe en Bessette (Proc Natl Acad Sci USA (1999), 96, 13703-13708 "Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the Escherichia coli cytoplasm").

En una realización, la célula hospedadora es un bacteria, preferiblemente una bacteria gram-positiva, preferiblemente una célula hospedadora seleccionada entre *Actinobacteria*, tal como *Bifidobacteria* y *Aeromonas*, particularmente preferiblemente *Aeromonas salmonicida*. Aún más preferidos son Actinomicetales tales como *Corynebacteria*, en particular *Corynebacterium glutamicum* y *Nocardia*. Son particularmente preferidos *Streptomycetaceae*, tales como *Streptomyces*, especialmente *S. lividans*.

Puede usarse un hospedador microbiano para la expresión del gen de galactolipasa, por ejemplo *Eubacteria*, *Archea* o *Fungi*, incluyendo levaduras. Se prefieren Eubacterias, por ejemplo, *Firmicutes* (bacteria Gram positiva de bajo GC), tal como *Bacillus subtilis* y otras especies de bacilos, bacterias ácido lácticas tales como especies de los géneros *Lactobacillus* y *Lactococcus*.

5 También se prefieren Proteobacterias Gram-negativas, en particular *Gammaproteobacteria*, tales como especies hospedadoras que pertenecen a los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Citrobacter* y *Escherichia*, especialmente *Escherichia coli*.

10 En otra realización, la célula hospedadora es el mismo género que la especie hospedadora nativa, es decir el gen recombinante se re-introduce y expresa en una especie del mismo género que la especie de la cual se aisló el gen recombinante.

15 En otra realización, la célula hospedadora es la especie hospedadora nativa, es decir el gen recombinante se re-introduce y expresa en la misma especie de la cual se aisló el gen recombinante.

#### ORGANISMO

20 El término "organismo" en relación a la presente invención incluye cualquier organismo que podría comprender la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de acuerdo con la presente invención y/o productos obtenidos de la misma, y/o donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención cuando está presente en el organismo.

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

30 La expresión "organismo transgénico" en relación a la presente invención incluye cualquier organismo que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de acuerdo con la presente invención y/o los productos obtenidos de la misma, y/o donde un promotor puede permitir la expresión de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la presente invención dentro del organismo. Preferiblemente la secuencia de nucleótidos se incorpora en el genoma del organismo.

La expresión "organismo transgénico" no cubre secuencias codificantes nativas de nucleótidos en su entorno natural cuando están bajo el control de su promotor nativo que también está en su entorno natural.

35 Por lo tanto, el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende una cualquiera de, o combinaciones de, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de acuerdo con la presente invención, construcciones de acuerdo con la presente invención, vectores de acuerdo con la presente invención, plásmidos de acuerdo con la presente invención, células de acuerdo con la presente invención, tejidos de acuerdo con la presente invención, o los productos de los mismos.

40 Por ejemplo, el organismo transgénico también puede comprender la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de la presente invención bajo el control de un promotor heterólogo.

#### TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS/ORGANISMO HOSPEDADOR

45 Como se ha indicado previamente, el organismo hospedador puede ser un organismo procarionta o un organismo eucariota. Ejemplos de hospedadores procariontas adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

50 Los contenidos sobre la transformación de hospedadores procariontas están bien documentados en la técnica, por ejemplo véase Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Si se usa un hospedador procarionta entonces puede que se necesite que la secuencia de nucleótidos se modifique adecuadamente antes de la transformación - tal como por eliminación de intrones.

55 Pueden transformarse células de hongos filamentosos usando diversos métodos conocidos en la técnica - tales como un proceso que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de regeneración de la pared celular de un modo conocido. El uso de *Aspergillus* como microorganismo hospedador se describe en el documento EP 0 238 023.

60 Otro organismo hospedador puede ser una planta. Puede encontrarse una revisión de las técnicas generales usadas para transformar plantas en artículos de Potrykus (Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol [1991] 42:205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech Marzo/Abril 1994 17-27). Pueden encontrarse contenidos adicionales sobre transformación de plantas en el documento EP-A-0449375.

65 Se presentan contenidos generales sobre la transformación de hongos, levaduras y plantas en las siguientes secciones.

HONGOS TRANSFORMADOS

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

Se revisan contenidos sobre la transformación de hongos filamentosos en el documento US-A-5741665 que expone que las técnicas convencionales para la transformación de hongos filamentosos y el cultivo de los hongos son bien conocidas en la técnica. Se encuentra una revisión extensiva de las técnicas aplicadas a *N. crassa*, por ejemplo, en Davis y de Serres, *Methods Enzymol* (1971) 17A: 79-143.

Se revisan contenidos adicionales sobre transformación de hongos filamentosos en el documento US-A-5674707.

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

Un *Aspergillus* transgénico de acuerdo con la presente invención también puede prepararse siguiendo, por ejemplo, los contenidos de Turner G. 1994 (*Vectors for genetic manipulation*. En: Martinelli S.D., Kingdom J.R. (Editores) *Aspergillus: 50 years on*. Progress in industrial microbiology vol. 29, Elsevier Amsterdam 1994, pág. 641-666). La expresión génica en hongos filamentosos se ha revisado en Punt et al. (2002) *Trends Biotechnol* 2002, Mayo; 20(5):200-6, Archer & Peberdy *Crit Rev Biotechnol* (1997) 17(4):273-306.

LEVADURAS TRANSFORMADAS

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

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

A este respecto, las levaduras - tales como las especies *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (véase FEMS *Microbiol Rev* (2000 24(1):45-66), pueden usarse como vehículo para la expresión génica heteróloga.

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

Para la transformación de levaduras, se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse una *Saccharomyces* transgénica de acuerdo con la presente invención siguiendo los contenidos de Hinnen et al., (1978, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75, 1929); Beggs, J D (1978, *Nature*, Londres, 275, 104); e Ito, H et al (1983, *J Bacteriology* 153, 163-168).

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

PLANTAS/CÉLULAS VEGETALES TRANSFORMADAS

Un organismo hospedador adecuado para la presente invención puede ser una planta. Puede encontrarse una revisión de los contenidos generales en artículos de Potrykus (*Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* [1991] 42:205-225) y Christou (*Agro-Food-Industry Hi-Tech* Marzo/Abril 1994 17-27).

CULTIVO Y PRODUCCIÓN

Las células hospedadoras transformadas con la secuencia de nucleótidos de la presente invención pueden cultivarse en condiciones conductoras a la producción de la enzima codificada y que faciliten la recuperación de la enzima desde las células y/o el medio de cultivo.

El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar la célula hospedadora en cuestión y obtener la expresión de la enzima.

La proteína producida por una célula recombinante puede presentarse sobre la superficie de la célula.

La enzima puede secretarse desde las células hospedadoras y puede recuperarse convenientemente desde el medio de cultivo usando procedimientos bien conocidos.

SECRECIÓN

A menudo, es deseable que la enzima se secrete desde el hospedador de expresión al medio de cultivo desde donde la enzima puede recuperarse más fácilmente. De acuerdo con la presente invención, la secuencia líder de secreción puede seleccionarse en base al hospedador de expresión deseado. También pueden usarse secuencias señal híbridas con el contexto de la presente invención.

Ejemplos típicos de secuencias líder de secreción heterólogas son aquellas que se originan a partir del gen de la amiloglucosidasa (AG) fúngica (*glaA* - versiones tanto de 18 como de 24 aminoácidos por ejemplo de *Aspergillus*), el gen del  $\alpha$ -factor (levaduras por ejemplo *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen de la  $\alpha$ -amilasa (*Bacillus*).

A modo de ejemplo, se revisa la secreción de proteínas heterólogas en *E. coli* en *Methods Enzymol* (1990) 182:132-43.

DETECCIÓN

Se conoce en la técnica una diversidad de protocolos para detectar y medir la expresión de la secuencia de aminoácidos. Ejemplos incluyen ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) y clasificación de células activadas fluorescentes (FACS).

Los especialistas en la técnica conocen una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación y pueden usarse en diversos ensayos de ácido nucleico y aminoácidos.

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

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

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

PROTEÍNAS DE FUSIÓN

La secuencia de aminoácidos para su uso de acuerdo con la presente invención puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo para ayudar en la extracción y purificación. Ejemplos de compañeros de proteínas de fusión incluyen glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de unión a ADN y/o activación transcripcional) y ( $\beta$ -galactosidasa). También puede ser conveniente incluir un sitio de escisión proteolítica entre el compañero de proteínas de fusión y la secuencia proteica de interés para permitir la eliminación de secuencias de proteína de fusión.

Preferiblemente, la proteína de fusión no impedirá la actividad de la secuencia proteica.

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

En otra realización de la invención, la secuencia de aminoácidos puede ligarse a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para seleccionar bibliotecas de péptidos para agentes capaces de afectar a la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia quimérica que exprese un epítipo heterólogo que se reconoce por un anticuerpo disponible en el mercado.

APLICACIÓN A GRAN ESCALA

En una realización preferida de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se usa para aplicaciones a gran escala.

Preferiblemente la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 1 g por litro a aproximadamente 2 g por litro del volumen total de cultivo celular después de cultivo del organismo hospedador.

Preferiblemente la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 100 mg por litro a aproximadamente 900 mg por litro del volumen total de cultivo celular después de cultivo del organismo hospedador.

Preferiblemente la secuencia de aminoácidos se produce en una cantidad de 250 mg por litro a aproximadamente 500 mg por litro del volumen total de cultivo celular después de cultivo del organismo hospedador.



ALIMENTOS

La composición de la presente invención puede usarse como - o en la preparación de - un alimento. Aquí, el término "alimento" se usa en un sentido amplio - y cubre alimentos para seres humanos así como alimentos para animales (es decir piensos). En un aspecto preferido, el alimento es para consumo humano.

El alimento puede estar en forma de una solución o en forma de un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

INGREDIENTES DE ALIMENTOS

La composición de la presente invención puede usarse como un ingrediente de alimentos.

Como se usa en este documento la expresión "ingrediente de alimentos" incluye una formulación, que se añade o puede añadirse a alimentos funcionales o productos alimenticios e incluye formulaciones que pueden usarse a bajos niveles en una amplia diversidad de productos que requieren, por ejemplo, acidificación o emulsión.

El ingrediente de alimentos puede estar en forma de una solución o en forma de un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

PRODUCTOS ALIMENTICIOS

La composición de la presente invención puede usarse en la preparación de productos alimenticios tales como uno o más de: productos de confitería, productos lácteos, productos cárnicos, productos de avicultura, productos pesqueros y productos de panadería.

La presente invención también proporciona un método para preparar un alimento o un ingrediente de alimentos, comprendiendo el método mezclar una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención con otro ingrediente de alimentos.

Se presentan aspectos preferibles adicionales en las reivindicaciones adjuntas y en las siguientes Figuras y ejemplos.

La Figura 1 muestra el fragmento de PCR SEC ID N° 1, que es un polinucleótido parcial que no codifica enzima; esta secuencia es un gen de ARN ribosómico 16S ampliamente usado para comparaciones taxonómicas;

La Figura 2 muestra el Fragmento de PCR SEC ID N° 2, que es un polinucleótido parcial que no codifica enzima; esta secuencia es un gen de ARN ribosómico 16S ampliamente usado para comparaciones taxonómicas;

La Figura 3 muestra un polinucleótido que codifica una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención (SEC ID N° 3);

La Figura 4 muestra una secuencia de aminoácidos de una enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención (SEC ID N° 4);

La Figura 5 muestra la estructura de los vectores de expresión de enzima lipolítica pGTK(L131) y pET11(131-51);

La Figura 6 muestra un gráfico del efecto de una enzima lipolítica de *Streptomyces sp.* L130 sobre digalactosildiglicérido en masa;

La Figura 7 muestra en forma gráfica el efecto de una enzima lipolítica de *Streptomyces sp.* L131 sobre digalactosildiglicérido en masa;

La Figura 8 muestra en forma gráfica el efecto de una enzima lipolítica de *Streptomyces* sobre triglicérido en masa;

La Figura 9 muestra el perfil de pH de la enzima lipolítica obtenida de *Streptomyces sp.* L131 sobre sustrato galactolípido;

La Figura 10 muestra una placa de TLC de lípidos extraídos de masa tratada con una enzima lipolítica de *Streptomyces* expresada en *E. coli* marcada n° 236; Carril 1 = control; Carril = n° 236, 0,225PLU-7/g harina; Carril 3 = n° 236, 0,45 PLU-7/g harina; Carril 4 = n° 236, 0,675 PLU-7/g harina; Carril 5 = material de referencia DGDG.

La Figura 11 muestra la construcción del vector de expresión pRX487 a partir de pUC18 (L131R) y pIJ48;

La Figura 12 muestra en forma gráfica el efecto de la temperatura sobre la estabilidad y actividad de una enzima lipolítica de *Streptomyces sp* L131;

5 La Figura 13 muestra en forma gráfica las especificidades de sustrato de galactolipasas de *Streptomyces sp* L131, *Streptomyces avermitilis*, *Corynebacterium efficiens* y *Thermobifida fusca*;

La Figura 14 muestra la estructura de un vector de expresión pCB5(TF) para la expresión de lipasa de *Thermobifida fusca* en *C. glutamicum*;

10 La Figura 15 muestra una alineación de secuencia de L131 y homólogos de *S. avermitilis* y *T. fusca*;

La Figura 16 muestra una placa de HPTLC de productos de reacción del tratamiento enzimático de muestras de aceite de soja crudo. Carril 1 = control Carril 2 = 99% de aceite crudo y 1% de K371 10% en agua Carril 3 = 98% de aceite crudo y 2% de K371 10% en agua Carril 4 = 97% de aceite crudo y 3% de K371 10% en agua Carril 5 = 99,7% de aceite crudo y 0,3% de Lecitase Ultra™ n° 3108 1% en agua Carril 6 = 99% de aceite crudo, 0,3% de Lecitase Ultra™ n° 3108 1% en agua y 0,7% de agua. Como referencia se analiza fosfatidilcolina (PC); y

20 La Figura 17 muestra una placa de HPTLC de productos de reacción del tratamiento enzimático de muestras de aceite de soja crudo. Carril 1 = control Carril 2 = 99% de aceite crudo y 1% de K371 10% en agua Carril 3 = 98% de aceite crudo y 2% de K371 10% en agua Carril 4 = 97% de aceite crudo y 3% de K371 10% en agua Carril 5 = 99,7% de aceite crudo y 0,3% de Lecitase Ultra n° 3108 1% en agua Carril 6 = 99% de aceite crudo, 0,3% de Lecitase Ultra™ n° 3108 1% en agua y 0,7% de agua, junto con carriles de referencia de éster de colesterol, monoglicérido, diglicérido, triglicérido y estero vegetal.

25 **Ejemplo 1:** Identificación de una cepa bacteriana que produce galactolipasa.

Se aislaron dos cepas microbianas con un fenotipo similar codificado L130 y L131 de tierra recogida en el sur de Finlandia. Los genes de ARN 16S de estos dos cepas se amplificaron por PCR convencional usando los cebadores oligonucleotídicos 536f (CAGCMGCCGCGGTAATWC) y 1392r (ACGGGCGGTGTGTRC). Los fragmentos de PCR resultantes se secuenciaron parcialmente. Las SEC ID N° 1 y 2 son polinucleótidos no codificantes de enzima. Estas secuencias son genes de ARN ribosómico 16S ampliamente usados para comparaciones taxonómicas. Se descubrió que la SEC ID N° 1 y SEC ID N° 2 tienen una alta similitud. Las secuencias después se compararon con las secuencias génicas de ARN 16S en GenBank. Para ambos aislados la mayor homología (97%) se observó con la secuencia de un gen de ARN 16S de *Streptomyces thermosacchari*. Por tanto, las cepas se llamaron *Streptomyces sp.* L130 y *Streptomyces sp.* L131.

**Ejemplo 2:** Preparación de muestras de enzima lipolítica (galactolipasa) de las cepas *Streptomyces sp.* L130 y L131.

40 Se inocularon 0,5 l de medio LB con *Streptomyces* L130 y se cultivaron en un agitador rotatorio a 200 rpm y 30°C durante 2 días. Este cultivo se usó como inóculo para un fermentador de 10 l que contenía el mismo medio. El cultivo se continuó durante 3 días a 30°C, 600 rpm de velocidad de agitación y 0,5 v/v de aireación. El caldo de fermentación se aclaró por centrifugación (15 min a 5000 rpm) y se añadió Triton X-100 hasta concentración final del 0,1%. La solución se concentró usando la celda de ultrafiltración Vivaflow 200 (Vivascience AG, Hannover, Alemania) hasta 300 ml. El concentrado se dializó frente a 10 l de tampón Tris HCl 20 mM, pH 7 que contenía CaCl<sub>2</sub> 2 mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM seguido de diálisis frente a 0,5 l de glicerol al 85%. Las preparaciones resultantes contenían 90 U de ensayo de actividad galactolipasa como se ha definido anteriormente (GLU-7). La cepa *Streptomyces* L131 se cultivó en las mismas condiciones y su caldo de cultivo se concentró por el mismo procedimiento. La preparación de galactolipasa resultante contenía 70 U de actividad.

50 **Ejemplo 3 - Experimentos de horneado**

Las galactolipasas de los aislados bacterianos L130 y L131 indicaron una alta actividad sobre sustratos lipídicos polares, galactolípidos (DGDG) y fosfolípidos, (actividad galactolipasa y fosfolipasa), equivalente a la de una lipasa de *Fusarium oxisporum* (Lipopan F™ Novozymes A/S Dinamarca): sin embargo, se descubrió que la galactolipasa de los aislados bacterianos L130 y L131 (es decir la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención) no tenía actividad significativa de triglicéridos. Esto contrasta agudamente con la actividad lipasa de *Fusarium oxisporum* - LipopanF™.

60 Las enzimas lipolíticas de los aislados bacterianos L130 y L131 se prepararon como se ha descrito en el Ejemplo 2 y se analizaron para la caracterización de su actividad sobre glucolípidos, fosfolípidos y triglicéridos, ambos en condiciones convencionales de ensayo y dentro de una masa.

65 Experimentos de horneado a pequeña escala y un sistema de masa modelo. Ambas enzimas son muy activas sobre galactolípidos en harina.

Materiales y métodos

Se prepararon tres muestras de cada enzima como en el Ejemplo 3. Cada muestra se marcó como se muestra en la tabla 1:

5

Tabla 1

ID	Organismo	Marca	GLU-7	PLU-7
180	Streptomyces spp L 130 A	Enzima lipolítica 0,58 PLU/ml	0,95	1,31
181	Streptomyces spp L 130 B	Enzima lipolítica 0,44 PLU/ml.	0,91	1,31
182	Streptomyces spp L 130 C	Enzima lipolítica 1,8 PLU/ml.	1,21	1,53
183	Streptomyces spp L 131 A	Enzima lipolítica 0,54 PLU/ml.	0,63	1,29
184	Streptomyces spp L 131 B	Enzima lipolítica 0,64 PLU/ml.	0,84	1,16
185	Streptomyces spp L 131 C	Enzima lipolítica 0,85 PLU/ml.	1,35	1,17

La actividad fosfolipasa y galactolipasa de las enzimas se evaluó usando el ensayo de actividad fosfolipasa (PLU-7) y el ensayo de actividad galactolipasa (GLU-7) mencionados anteriormente en este documento.

10 Experimento de suspensión de masa

Se cambiaron de escala 0,8 gramos de harina de trigo en un tubo de centrifuga de 12 ml con tapa. Se añadieron 1,5 ml de agua que contenía la enzima. La muestra se mezcló en un Whirley y se colocó en un armario de calentamiento a 30°C durante 60 minutos. Se añadieron 6 ml de n-Butanol:Etanol 9:1, y la muestra se mezcló de nuevo hasta que la harina se distribuyó finamente en el disolvente. Los tubos se colocaron en un baño de agua a 95°C durante 10 minutos. Después se mezclaron de nuevo y se colocaron en un dispositivo de rotación 45 rpm, durante 45 minutos.

15

La muestra después se centrifugó a 2000 g durante 10 minutos. Y se transfirieron 2 ml de sobrenadante a un frasco de vidrio dram de 10 ml. El disolvente se evaporó a 70°C bajo una corriente de nitrógeno.

20

Los lípidos aislados se analizaron por GLC.

*Cromatografía de gases*

25 Cromatógrafo de gases capilar Perkin Elmer 8420 equipado con columna de sílice condensada WCOT de 12,5 m x 0,25 mm DI x 0,1 mm de fenil-metil-silicona al 5% (CP Sil 8 CB de Crompack).

Vehículo: Helio.

Inyección: 1,5 ml con división.

Detector: FID. 385°C.

Programa de horno:

Temperatura del horno [°C]	1	2	3	4
	80	200	240	360

Isotérmica, tiempo [min]	2	0	0	10
--------------------------	---	---	---	----

Tasa de temperatura [°C/min]	20	10	12	
------------------------------	----	----	----	--

30

35 Preparación de la muestra: El lípido extraído de 0,2 gramos de harina se disolvió en 2 ml de heptano:piridina 2:1 que contenía un patrón interno heptadecano, 2 mg/ml. Se transfirieron 500 µl de la muestra a un vial ondulado. Se añadieron 100 µl de MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) y la reacción se incubó durante 15 minutos a 90°C.

40

Cálculo: Los factores de respuesta para monoglicéridos, diglicéridos, triglicéridos, ácido graso libre y galactolípidos se determinaron a partir de mezclas de referencia de estos componentes. En base a estos factores de respuesta se calcularon los lípidos en la masa.

45 Resultados

Las muestras de enzima de Streptomyces se analizaron para la actividad fosfolipasa y galactolipasa con resultados mostrados en la tabla 2. También se calculó la proporción de actividad PLU-7/GLU-7. La proporción media para las muestras fue 1,4, pero con alguna desviación en algunas de las muestras, que podría explicarse por desviaciones analíticas.

50

Tabla 2

Muestra ID	Organismo	GLU-7	PLU-7	Proporción PLU-7/GLU-7
180	L 130 A	0,95	1,31	1,4
181	L 130 B	0,91	1,31	1,4
182	L 130 C	1,21	1,53	1,3
183	L 131 A	0,63	1,29	2,0

Muestra ID	Organismo	GLU-7	PLU-7	Proporción PLU-7/GLU-7
184	L 131 B	0,84	1,16	1,4
185	L 131 C	1,35	1,17	0,9

## Experimento de masa

- 5 La actividad de la enzima sobre lípidos de trigo se ensayó en el experimento de suspensión de masa como se ha mencionado en materiales y métodos. Los lípidos aislados de la masa se analizaron por GLC como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Análisis GLC de lípidos de masa (% basado en peso de harina). FFA= ácidos grasos libres. MGMG=monogalactosilmonoglicérido. DGMG=digalactosildiglicérido. MGDG=monogalactosildiglicérido. DGDG=digalactosildiglicérido. TRI= triglicérido.

Muestra ID	Dosificación de enzima PLU/g harina	FFA	MGMG	DGMG	MGDG	DGMG	TRI
185	0,105	0,1642	0,0042	0,0380	0,0345	0,1520	0,5515
185	0,263	0,1687	0,0130	0,0670	0,0239	0,0941	0,5470
185	0,526	0,2096	0,0121	0,0664	0,0158	0,0617	0,5460
185	1,05	0,2597	0,0036	0,0546	0,0068	0,0303	0,5301
182	0,097	0,1542	0,0051	0,0563	0,0313	0,1148	0,5475
182	0,244	0,1687	0,0159	0,0785	0,0200	0,0566	0,5280
182	0,488	0,2095	0,0055	0,0646	0,0098	0,0219	0,5418
182	0,976	0,2581	0,0092	0,0439	0,0043	0,0045	0,5579
Control	0	0,1529	0,0006	0,0188	0,0440	0,1443	0,5054
Lipopan F <sup>TM</sup>	1,47	0,23	0,03	0,10	0,01	0,07	0,44

- 10 Los resultados de la tabla 3 y tabla 4 confirman que las enzimas aisladas en el sobrenadante de fermentación de *Streptomyces* sp L130 y L131 son muy activas sobre galactolípidos en una masa. Los diésteres DGDG y MGDG se hidrolizan en los correspondientes monoésteres DGMG y MGMG. Los resultados también se ilustran de forma gráfica en las Figuras 6 y 7. Estos resultados confirman que ambas enzimas son muy activas a baja dosificación de 0-0,2 Unidades/g de harina y se produce la correspondiente cantidad de monoéster. A mayor dosificación de 0,4-1
- 15 Unidades/gramo de harina, el DGDG se degrada adicionalmente pero también se observa algo de hidrólisis de los monoésteres. Esto puede indicar que las enzimas no son específicas para la posición del ácido graso en la molécula de galactolípidos.

- 20 La actividad de las enzimas sobre triglicérido, como se ilustra en la Figura 8, es casi inexistente. Por lo tanto se concluye que las enzimas ensayadas no tienen efecto significativo sobre triglicérido. Esto también está en acuerdo con algunos experimentos realizados sobre tributirina como sustrato, donde no se observó actividad.

## SUMARIO

- 25 Se aisló una enzima lipolítica en el sobrenadante de fermentación de *Streptomyces* sp.

Se descubrió que la enzima lipolítica tenía actividad tanto fosfolipasa como galactolipasa, pero no actividad significativa sobre triglicéridos. La proporción de actividad fosfolipasa:galactolipasa fue aprox. 1,4 para las muestras ensayadas.

- 30 Los experimentos de suspensión de masa confirman que las enzimas eran activas sobre galactolípidos en la harina. Las enzimas eran activas en masa a una dosificación muy baja de 0-0,2 Unidades/g de harina. Fosfolipasas comerciales como Lipopan F<sup>TM</sup> (Novozymes A/S, Dinamarca) tienen que dosificarse en dosificación 3-4 veces mayor para obtener el mismo efecto sobre galactolípidos. Los experimentos de suspensión de masa también confirmaron que las enzimas de *Streptomyces* sp. no tenían actividad medible sobre triglicéridos.
- 35

Ejemplo 4: Clonación del gen de la enzima lipolítica de *Streptomyces* sp. L131.

- 40 Se aisló el ADN cromosómico de *Streptomyces* sp. L131 usando una modificación de un método convencional. Las bacterias se cultivaron en un agitador rotatorio en medio LB a 30°C y alta aireación (100 ml de medio por matraz con deflectores de 0,5 l, 200 rpm) hasta temprana fase estacionaria. Del cultivo bacteriano de 500 ml se recogieron células con centrifugación y se lavaron una vez con tampón de lisis (glucosa 550 mM, Tris 100 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0).

El sedimento celular se re-suspendió en 10 ml de tampón de lisis y se añadió lisozima hasta 1 mg/ml. Las células se incubaron a 37°C durante al menos 15 min. El progreso de la digestión con lisozima fue seguido por la transferencia de alícuotas de suspensión bacteriana en solución de SDS al 1% y medición de la absorción de la mezcla resultante a 600 nm. La cantidad de lisozima y el tiempo de incubación se ajustaron de modo que al menos el 70-90% de todas las células se lisaran, evidenciado por la disminución en  $A_{600}$ . En este punto temporal, se añadió SDS a la suspensión bacteriana hasta el 1% y proteinasa K hasta 0,1 mg/ml. La suspensión se incubó a 56°C durante 30 min seguido de extracciones con fenol y cloroformo. Después de la extracción con cloroformo, se precipitó el ADN con acetato sódico (concentración final 0,5 M) e isopropanol (0,6 vol/vol) y el sedimento de ADN se lavó con etanol al 70%, se secó al vacío y se disolvió en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) que contenía RNasa A (0,01 mg/ml).

El ADN se digirió parcialmente con endonucleasa de restricción *Sau3A* y los hidrolizados se fraccionaron en un gel de agarosa al 0,8%. La fracción de 3-10 kb de *Sau3A* se aisló de los geles de agarosa por electroelución. Esta preparación de ADN se usó para construir una biblioteca génica usando el kit de clonación de Stratagene (LaJolla, EEUU) ZAP Express/Predigested Vector/Gi-gapack (producto nº 239615). El ligamiento, compactación, amplificación de la biblioteca y su conversión a la forma de fagómido se realizaron de acuerdo con los protocolos proporcionados por Stratagene. La forma plasmídica de la biblioteca génica resultante se seleccionó sobre placas indicadoras preparadas del siguiente modo. Se colocaron 80 ml de agar LB estéril que contenía 25 mg/l de kanamicina en cada placa Petri de 15 cm y se dejó solidificar. Posteriormente, se añadió la capa de agar superior de 10 ml que contenía DGDG al 0,5% y Safranina O al 0,0005%. La biblioteca génica se sembró a una densidad de aproximadamente 5000 colonias por placa de 15 cm. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h seguido de una incubación de cuatro días a temperatura ambiente. Se seleccionó un clon que formaba un halo rojo en la placa indicadora de la biblioteca y se purificó por clonación en una nueva placa indicadora.

El plásmido aislado de este clon (llamado pBK(L131)) se usó para re-transformar *E. coli* cepa XL1-Blue MRF' para resistencia a kanamicina. Todos estos transformantes presentaban genotipo galactolipasa-positivo. pBK(L131) contenía un inserto de aproximadamente 7,5 kb. Este inserto se secuenció. Se encontró que una región secuenciada (SEC ID Nº 3) contenía una fase de lectura abierta que codificaba una proteína (SEC ID Nº 4) que mostraba homología con una lipasa conocida de *Streptomyces rimosus*. Esta lipasa, un miembro de la llamada familia GDSX de lipasas/esterasas/acil transferasas se conoce solamente por ser capaz de hidrolizar lípidos neutros y sustratos artificiales de lipasa.

Se construyó una serie de deleciones y sub-clones del inserto original y se ensayó para la actividad galactolipasa. Se descubrió que el derivado de deleción que portaba el fragmento *EcoRI* - *SacI* de 3 kb del inserto original aún retiene la actividad DGDGsa completa. Estos datos se correlacionaban bien con los resultados del ADN parcial. Un área demostró homología a lipasas conocidas. Esta área se secuenció posteriormente de forma completa. La comparación de esta secuencia con GenBank reveló que el homólogo más cercano (58,5%) de la galactolipasa L131 que se ha caracterizado bioquímicamente es una lipasa de *S. rimosus*, y se identificó como una lípido:acil transferasa en el documento WO04/064987 y el documento WO04/064537.

#### Expresión de galactolipasa L131 en *E. coli*

El sistema pET convencional, en que el gen está bajo el control del promotor del fago T7, se usó para expresar la galactolipasa L131 en *E. coli*.

#### Expresión de galactolipasa L131 en *Streptomyces lividans*

El vector lanzadera pRX487-5 (Figura 11) (derivado de pIJ4987: Kieser T. et al. Practical Streptomyces genetics. The John Innes Foundation, Crowes, Norwich, Inglaterra (2000)) usado para la expresión de galactolipasa L131 en *S. lividans* combina el plásmido de *E. coli* pUC18 y el plásmido de *S. lividans* IJ487. En pRX487-5, se coloca el promotor *lac* de pUC18 cadena arriba del gen de la kanamicina fosfotransferasa sin promotor de pIJ487. De hecho, el plásmido transformó *E. coli* no solamente para ampicilina sino también para al menos un bajo nivel (5 mg/l) de resistencia a kanamicina. El vector contiene el fragmento *EcoRI*-*XbaI* no modificado del ADN cromosómico de *S. thermosacchari* que comprende la secuencia codificante completa del gen de la galactolipasa, aproximadamente 160 pb de secuencia no codificante cadena arriba y 420 pb de secuencia no codificante cadena abajo. Todos los transformantes presentaron niveles similares de actividad galactolipasa juzgados por la formación de halo en placas indicadoras. Asimismo, cuando se cultivaba *S. lividans* que porta pRX487-5 a un nivel de 10 l y se clonaba el cultivo resultante en placas indicadoras, todos los clones parecían producir cantidades iguales de actividad galactolipasa. En cultivos pequeños de matraz en agitación inoculados por células vegetales directamente de placas, los transformantes típicamente producían aproximadamente 10-20 mU/ml de actividad galactolipasa después de 3 días de cultivo. Cuando se inoculaban cultivos de matraz en agitación con esporas de *S. lividans* recombinante, se midieron actividades galactolipasa mayores (aproximadamente 30 mU/ml), lo que se correlaciona con mayor acumulación de biomasa. En un experimento donde se cultivó *S. lividans* que porta pRX487-5 en fermentado en condiciones de alta aireación y modo de alimentación por lotes (véase material y métodos para los detalles) la acumulación de biomasa alcanzó 170 g/l (peso húmedo). Por consiguiente, se detectó actividad galactolipasa mucho mayor - aproximadamente 1 U/ml.

## Propiedades bioquímicas de L131

Se ensayaron algunas propiedades bioquímicas de L131. Se descubrió que el pH óptimo de la enzima era aproximadamente 6,5-7,5 (Figura 9). La enzima mostró actividad máxima hacia DGDG a una temperatura ~50°C. Por encima de esta temperatura sucedía inactivación, pero no bruscamente, y después de 20 min de incubación en 90°C, se detectó ~10% de actividad residual (Figura 12).

Ejemplo 5: Expresión de enzima lipolítica de *Streptomyces* L131 de acuerdo con el gen de la presente invención en *E. coli*

La fase de lectura abierta de pBK(L131) que codifica la presunta enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención se amplificó por PCR usando los cebadores oL131-5 (GGTGAATTCATGAGATTGACCCGATCCCTGTCCG, cebador con sentido) y oL131-3 (ACTTCTAGAGCGCGCCACCGTGACGTACA, cebador antisentido). El fragmento de ADN amplificado se digirió con EcoRI y XbaI y se clonó en un vector lanzadera de *B. subtilis* - *E. coli* pGTK44. Este vector se ha construido sustituyendo el fragmento *SalI*-EcoRI del plásmido pGTK44 (Povelainen et al., Biochem J. 371, 191-197 (2003)) que contiene el promotor degQ36 con el fragmento EcoRI-*SalI* de pGT44 (Kerovuo J. et al. Biotechnology Letters 22, 1311-1317 (2000)).

La actividad galactolipasa se detectó en *E. coli* transformado con el plásmido resultante pGTK44(L131) (Figura 5) usando placas indicadoras. Los transformantes de control (que contenían el plásmido precursor pGTK44) eran galactolipasa-negativos. Por tanto, la secuencia proteica representada por la SEC ID N° 4 de hecho posee actividad galactolipasa. El mismo par de cebadores amplificó un fragmento del mismo tamaño (por electroforesis en gel de agarosa) con ADN cromosómico de *Streptomyces* sp. L130 que confirma adicionalmente las observaciones previas acerca de la estrecha similitud de las dos cepas aisladas y sus genes de galactolipasa.

Para la expresión en *E. coli* bajo el control del promotor del fago T7, se amplificó la región codificante de galactolipasa deducida por PCR usando ADN cromosómico de *Streptomyces* sp. L131 como molde y los dos cebadores oligonucleotídicos (oL131-51 GGTCATGCTAGCATGAGATTGACCCGATCCCTGTCCG y oL131-31 GCATGGATCCGCGCGCCACCGTGACGTACA). El producto de PCR se digirió con *NheI* y *Bam*HI y se ligó con el vector pET11a (Novagen, EEUU) digerido con las mismas endonucleasas de restricción. La mezcla de ligamiento se usó para transformar la cepa de *E. coli* XL-Blue1 MRF' y se aislaron 12 diferentes clones plasmídicos con patrones de restricción correspondientes a la estructura de pET11(131-51) (Fig. 4). Cada clon plasmídico se usó para transformar por separado la cepa de *E. coli* BL21(DE3) y los transformantes resultantes se cultivaron en LB-ampicilina que contenía capa indicadora de actividad galactolipasa (Ejemplo 4). La mayoría de los clones no expresaron galactolipasa activa. Uno clon (pET11(131-51)-12) se seleccionó como fuente de galactolipasa recombinante para posterior caracterización.

La enzima expresada en *E. coli* (marcada n° 236) se analizó y se descubrió que tenía: 0,33 GLU/ml y 0,36 PLU/ml, cuando se analizó usando el ensayo GLU-7 y el ensayo PLU-7 mostrados en este documento.

En cultivo líquido *E. coli* BL21(DE3) expresó aproximadamente 2 mU/ml de actividad galactolipasa después de 40 h de cultivo en caldo LB-ampicilina (37°C, 200 rpm de agitación). Esencialmente toda la actividad se encontró en el caldo de cultivo. No se detectó actividad galactolipasa en *E. coli* BL21(DE3) transformada con pET11a (Novagen, EEUU) y cultivada en las mismas condiciones.

Se concentraron aproximadamente cuatro litros de cultivo en caldo de cultivo que contenía galactolipasa en un evaporador rotatorio a aproximadamente 300 ml y se dializó frente a 15 l de tampón Tris HCl 20 mM, pH 7 que contenía CaCl<sub>2</sub> 2 mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM. El material dializado se concentró de nuevo en un evaporador rotatorio a aproximadamente 30 ml y se dializó frente a 2 l de glicerol al 50%. La preparación resultante (18 ml) contenía aproximadamente 100 mU/ml de actividad galactolipasa.

La enzima expresada en *E. coli* (marcada n° 236) también se ensayó en masa. Se observó alta actividad sobre galactolípidos en masa como puede observarse a partir de la Figura 10, que muestra una palca de TLC.

Ejemplo 6: Expresión de la enzima lipolítica de acuerdo con el gen de la presente invención de *Streptomyces* sp. L131 en diferentes hospedadores.

La construcción del vector pGTK44(L131) se ha resumido en el Ejemplo 5. Además de *E. coli*, este vector puede usarse para producir enzima lipolítica de *Streptomyces* L131 de acuerdo con la presente invención en *Bacillus*. Usar este vector es solamente uno de los muchos posibles modos de expresar la enzima lipolítica L131 de acuerdo con la presente invención en *Bacillus*. Por ejemplo, puede remplazarse el promotor *pst* empleado en pGTK44(L131) por cualquier otro promotor constitutivo o regulado fuerte activo en *Bacillus*. Muchos de estos promotores son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el promotor *degQ36* (Yang M et al. J. Bacteriol. 166, 113-119 (1986)), el promotor *cdd*, también conocido como p43 (Wang PZ, Doi RH. J. Biol. Chem. 259, 8619-8625 (1984)), promotores de amilasa o proteasa neutra etc. Además de pGTK44(L131) y otros vectores de *Bacillus* basados en el replicón pTZ12 (Aoki T. et

al., Mol. Gen. Genet. 208, 348-352 (1987)) puede usarse cualquier otro vector plasmídico (por ejemplo, pUB110, Gryczan TJ et al. J. Bacteriol. 134, 318-29 (1978) y sus derivados).

Otros hospedadores preferidos para la expresión de la enzima lipolítica de *Streptomyces* L131 de acuerdo con el gen de la presente invención son bacterias Gram positivas de alto GC, en particular, *Streptomyces*, (por ejemplo, *S. lividans*, *S. coelicolor*, *S. griseus*, *S. natalensis*, *S. rubiginosus*, *S. olivaceus*, *S. olivochromogenes*, *S. violaceoruber*). En dichos hospedadores, la enzima lipolítica de acuerdo con el gen de la presente invención puede introducirse bajo su propio promotor en un vector multi-copia (por ejemplo, usando derivados de pIJ110 tales como pU486, Ward et al. Mol. Gen. Genet. 203, 468-478 (1986)) o colocarse bajo el control de un promotor fuerte de *Streptomyces*, por ejemplo ermE\* (Schmitt-John T, Engels JW. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36, 493-498 (1992)) o el promotor de tipA inducible por tiostreptona (Kieser T et al. en Practical Streptomyces Genetics, pág. 386, The John Innes Foundation, Norwich RU (2000)).

Además de hospedadores procariotas, el gen de la enzima lipolítica L131 puede expresarse en una de las muchas especies fúngicas adecuadas. En particular, son adecuadas levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha*. En levaduras, el gen de la enzima lipolítica puede colocarse bajo el control de cualquiera de los promotores fuertes de levadura conocidos, tales como promotores glucolíticos (PGK, *GDH*, *ENO* etc.), promotores inducidos por privación de fosfato tales como *PHO5*, los promotores del metabolismo de etanol/metanol tales como el promotor *ADH1* en *S. cerevisiae* o promotores inducibles por metanol en *H. polymorpha* o *P. pastoris*.

Cuando se expresa el gen de la enzima lipolítica en cualquier hospedador, sería ventajosa la construcción de un gen sintético o semi-sintético que codifique la secuencia de la SEC ID 4. Asimismo, pueden diseñarse genes parcial o completamente sintéticos basados en secuencias disponibles a través de búsquedas de homología *in silico* como se ha explicado en el Ejemplo 4. Dichas secuencias pueden incorporar varias características útiles que están ausentes en genes de enzima lipolítica de tipo silvestre. Por ejemplo, la desviación de codones puede corregirse para corresponder mejor a las preferencias de codones de los hospedadores de expresión. Un caso especial de la corrección de desviación de codones útil para todos los hospedadores es convertir el codón de inicio GTG de la SEC ID N° 3 en ATG. Otra modificación típica obvia para los especialistas en la técnica es intercambiar la secuencia señal nativa de *Streptomyces* de la enzima lipolítica L131 con una secuencia señal nativa de o que se sabe que es funcional en el hospedador de expresión elegido.

Ejemplos previos de sistemas de expresión útiles para la enzima lipolítica L131 se centraron en el uso de vectores plasmídicos para la introducción del gen de la enzima lipolítica en el hospedador de expresión. Éste es, de hecho, el modo preferido para implementar la presente invención. Sin embargo, también es factible un enfoque alternativo para integrar el casete de expresión (incluyendo promotor, región codificante del gen de enzima lipolítica y un terminador de la transcripción opcional) en un cromosoma. En particular, sería eficaz la integración multi-copia del casete de expresión en el cromosoma del hospedador.

Los hospedadores recombinantes que expresan el gen de la enzima lipolítica pueden mutarse, ventajosamente, para reducir el nivel de actividad proteasa en el caldo de cultivo. El cultivo de cualquiera de dichos hospedadores recombinantes puede realizarse en presencia de compuestos que estabilizan la enzima. Dichos compuestos pueden ser diversas proteínas (por ejemplo, caseína, peptona de albúmina sérica) o diferentes lípidos, lisolípidos o detergentes (por ejemplo, galactolípidos, mono- y diacilgliceroles o Triton X-100).

#### Ejemplo 7 Actividad acil-transferasa de enzima lipolítica de *Streptomyces* L131 y sus derivados

Algunas lipasas también pueden poseer actividad acil-transferasa. En particular, algunos miembros de la familia GDSX, por ejemplo, aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (P10480) (mostrada en la solicitud internacional en trámite junto con la presente N° PCT/IB2004/000655) tienen alta actividad acil-transferasa. Por tanto, puede predecirse que la enzima lipolítica de *Streptomyces* L131 tendrá también la actividad acil-transferasa también. Esta actividad puede potenciarse adicionalmente a través de mutagénesis aleatoria/evolución dirigida. Además, como la acil-transferasa de *A. hydrophila* y la enzima lipolítica de *Streptomyces* L131 comparte el mismo plegamiento proteico global, es posible combinar la especificidad de sustrato de la enzima lipolítica de *Streptomyces* L131 con la alta eficacia transferasa de la enzima de *Aeromonas*. Esta combinación puede conseguirse a través de las técnicas conocidas de mutagénesis dirigida/diseño de proteínas o por transposición de genes.

#### Ejemplo 8 Identificación de enzima lipolíticas alternativas de otras especies de *Streptomyces*.

La familia GDSX de esterases (Upton C, Buckley JT. Trends Biochem. Sic. 20, 178-179 (1995), pfam00657.11) es un grupo of esterases/lipasas/acil transferasas que comparten un motivo de secuencia específico alrededor de la serina del sitio activo (GDSX donde X es un resto de aminoácido hidrófobo). Este grupo de enzimas es también conocido como familia II de lipasa (Arpigny JL, Jaeger K-E. Biochem. J. 343, 177-183 (1999)). Aunque esta familia incluye muchos tipos diferentes de esterases, lipasas y acil-transferasas, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención es una enzima GDSX.

Por tanto, las secuencias mostradas en la presente invención de la enzima lipolítica de *Streptomyces* sp. L131 (galactolipasa) pueden usarse *in silico* para identificar otras galactolipasas de otras especies de *Streptomyces*.

Para determinar si una proteína tiene el motivo GDSX de acuerdo con la presente invención, la secuencia se compara preferiblemente con los perfiles del modelo oculto de Markov (perfiles HMM) de la base de datos pfam.

Pfam es una base de datos de familias de dominio proteico. Pfam contiene múltiples alineaciones de secuencia seleccionadas para cada familia así como perfiles del modelo oculto de Markov (perfiles HMM) para identificar estos dominios en nuevas secuencias. Puede encontrarse una introducción a Pfam en Bateman A et al. (2002) *Nucleic Acids Res.* 30; 276-280. Se usan modelos ocultos de Markov en varias bases de datos dirigidas a clasificar proteínas, para una revisión véase Bateman A y Haft DH (2002) *Brief Bioinform* 3; 236-245, [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=12230032&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=12230032&dopt=Abstract)[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list\\_uids=11752314&dopt=Abstract](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&list_uids=11752314&dopt=Abstract).

Para una explicación detallada de los modelos ocultos de Markov y el modo en que se aplican en la base de datos Pfam véase Durbin R, Eddy S, y Krogh A (1998) *Biological sequence analysis; probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press, ISBN 0-521-62041-4. El paquete de software Hammer puede obtenerse de Washington University, St Louis, EEUU.

Como alternativa, el motivo GDSX pueden identificarse usando el paquete de software Hammer, las instrucciones se proporcionan en Durbin R, Eddy S, y Krogh A (1998) *Biological sequence analysis; probabilistic models of proteins and nucleic acids*. Cambridge University Press, ISBN 0-521-62041-4 y las referencias en el mismo, y el perfil HMMER2 proporcionado dentro de esta memoria descriptiva.

A la base de datos PFAM puede accederse, por ejemplo, a través de varios servidores que están actualmente localizados en los siguientes sitios web.

<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/index.shtml>

<http://pfam.wustl.edu/>

<http://pfam.jouy.inra.fr/>

<http://pfam.cgb.ki.se/>

La base de datos ofrece un motor de búsqueda donde se puede introducir una secuencia proteica. Usando los parámetros por defecto de la base de datos, entonces se analizarán la secuencia proteica para la presencia de dominios Pfam. El dominio GDSX es un dominio establecido en la base de datos y como tal se reconocerá su presencia en cualquier secuencia de consulta. La base de datos reportará la alineación de la secuencia consenso Pfam00657 para la secuencia de consulta.

Preferiblemente, cuando se alinea con la secuencia consenso Pfam00657, la enzima lipolítica para su uso en las composiciones/métodos de la invención tiene al menos uno, preferiblemente más de uno, preferiblemente más de dos, de los siguientes, un bloque GDSx, un bloque GANDY, un bloque HPT. Adecuadamente, la enzima lipolítica puede tener un bloque GDSx y un bloque GANDY. Como alternativa, la enzima puede tener un bloque GDSx y un bloque HPT. Preferiblemente la enzima comprende al menos un bloque GDSx.

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

Además o como alternativa a ello, pueden identificarse enzima lipolíticas alternativas de otras especies de *Streptomyces* realizando una comparación de identidad de secuencia y/o hibridación con uno o más de los fragmentos de secuencia de PCR mostrados como SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2. Adecuadamente, las comparaciones pueden realizarse con fragmentos que comprenden más de 15 nucleótidos de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2, preferiblemente con fragmentos que comprenden más de 20 nucleótidos de la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2. Adecuadamente, podrían usarse las secuencias completas mostradas como SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2. Preferiblemente, la hibridación se realiza en condiciones de alta o muy alta rigurosidad. Las secuencias de nucleótidos que tienen al menos un 80%, preferiblemente al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con la SEC ID N° 1 o SEC ID N° 2 indican cepas de *Streptomyces* que pueden ser fuentes de la enzima lipolítica, es decir la galactolipasa, de acuerdo con la presente invención.

Ejemplo 9: Identificación de galactolipasas para su uso en los métodos y usos de la presente solicitud

Como se ha mencionado anteriormente, la secuencia de la nueva *Streptomyces thermosacchari* L131 ofrece la posibilidad de identificación *in silico* de nuevas galactolipasas de familia II. A este respecto, una región particular que puede ser de particular interés es el motivo GDSX.



El motivo GDSX está compuesto de cuatro aminoácidos conservados. Preferiblemente, la serina dentro del motivo es una serina catalítica de la enzima lípido aciltransferasa. Adecuadamente, la serina del motivo GDSX puede estar en una posición correspondiente a Ser-16 en la enzima lipolítica de *Aeromonas hydrophila* mostrada en Brumlik y Buckley (Journal of Bacteriology Abr. 1996, Vol. 178, N° 7, pág. 2060-2064).

Para determinar si una proteína tiene el motivo GDSX, la secuencia se compara preferiblemente con los perfiles de modelo oculto de Markov (perfiles HMM) de la base de datos pfam. Como se ha mencionado en el Ejemplo 8, pfam es una base de datos de familias de dominio proteico. Por tanto, la base de datos pfam también puede usarse para identificar enzimas adecuadas de géneros diferentes a *Streptomyces*.

Como alternativa, el motivo GDSX puede identificarse usando el paquete de software Hammer, las instrucciones se proporcionan en Durbin R, Eddy S, y Krogh A (1998) Biological sequence analysis; probabilistic models of proteins and nucleic acids. Cambridge University Press, ISBN 0-521-62041-4 y las referencias en el mismo, y el perfil HMMER2 proporcionado en esta memoria descriptiva.

Preferiblemente, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención comprende el motivo GDSX.

Cuando se alinea con la secuencia consenso Pfam00657 de pfam (como se describe en el documento WO04/064987) y/o la secuencia L131 en este documento descrita (SEC ID N° 4)

i) La enzima galactolipasa/lípido acil-transferasa de la invención, o para uso en métodos de la invención, tiene preferiblemente un motivo GDSx, más preferiblemente un motivo GDSY.  
y/o

ii) La enzima galactolipasa/lípido acil-transferasa de la invención, o para uso en métodos de la invención, tiene preferiblemente un bloque GANDY, más preferiblemente un bloque GANDY que comprende amino GGNDx, más preferiblemente GGNDa o GGNDL.  
y/o

iii) La enzima de la invención, o para uso en métodos de la invención, tiene preferiblemente un bloque HTP.  
y preferiblemente

iv) La enzima galactolipasa/lípido acil-transferasa de la invención, o para uso en métodos de la invención, tiene preferiblemente un motivo GDSY y un bloque GANDY que comprende amino GGNDx, preferiblemente GGNDa o GGNDL, y un bloque HTP (histidina conservada).

A este respecto, los inventores identificaron una secuencia homóloga a *Streptomyces* L131 que no comprendía un motivo GDSX: concretamente *Novosphingobium aromaticivorans* (NAL) *Novosphingobium\aromaticivorans\ GDSx* 284 aa

#### SEC ID N° 10

##### ZP\_00094165

```

1 mgqvklfarr capvllalag lapaatvare aplaegaryv algssfaagp gvgpnapgsp
61 ercgrgtiny phllaealkl dlvdatsga tthhvgpwn evppqidsvn gdrivltli
121 ggndvsfvgn ifaaacekma spdprcgkw eiteewqad eermrsivrq iharaplarv
181 vvdyitvlp psgtcaamai spdrlaqsrs aakrlarita rvareegasl lkfshisrrh
241 hpcsakpwsn glsapaddgi pvhpnrigha eaaaaivklv klmk

```

SEC ID Nº 11

```

1 tgcgggaact caagcggcgt ctagccgaac tcatgcccga aagcgcgtgg caclatcccg
  61 aagaccaggt ctcggacgcc agcgaagcgc tgatggccgc cgaaatcacg cgcgaacagc
 121 tctaccgcca gctccacgac gagctgccct atgacagtlac cgtacgtccc gagaagtlacc
 181 tccatcgcaa ggacggttcg atcgagatcc accagcagat cgtgattgcc cgcgagacac
 241 agcgtccgat cgtgctgggc aagggfggcg cgaagatcaa ggcgatcgya gaggccgcac
 301 gcaaggaact ttgcaatfg ctcgacacca aggtgcacct gttcctgcat gtgaaggctg
 361 acgagcgtg ggccgacgcc aaggaaatct acgaggaaat cggcctcgaa tgggtcaagt
 421 gaagctcttc gcgcccgtc gcgcccagc acttctcgcc ctgcccggc tggctccggc
 481 ggctacggtc gcgcccgaag caccgctggc cgaagggcgc cgttacgttg cgtggaag
 541 ctctctgccc gcaggtccgg gcgtggggcc caacgcgccc ggatcggccc aacgtgccc
 601 ccggggcacg ctaactacc cgcacctgct cgcggaggcg ctcaagctcg atctcgtcga
 661 tgcgacctc agcggcgcga cgaccacca cgtgctgggc cctggaacg aggttcccc
 721 tcagatcgac agcgtgaatg gcgacaccgc cctcgtcacc ctgaccatcg gcgaaacga
 781 tgtgtcttc gtcggaaca tcttccggc cgttgcgag aagatggcgt cgcggatcc
 841 gcgctggggc aagtgccggg agatcaccga ggaagagtgg caggccgacg aggagcggat
 901 gcgctccatc gtaccgaca tccacgccc cgcgcctc ccccgggtgg tgggtcga
 961 ttacatcacg gtcctgccc catcaggcac ttgcgtgcc atggcgattt cgcggaccg
1021 gctggcccag agccgcagcg ccgcgaaacg gctgcccgg attaccgcac gggctgcgcg
1081 agaagagggt gcatcgtgc tcaagtctc gcatatctc gcgcccacc atccatgctc
1141 tgccaagccc tggagcaacg gccttccgc cccggccgac gacggcatcc cgttccatcc
1201 gaaccggctc ggacatgctg aagcggcagc ggcgctggc aagctgtga aattgatgaa
1261 gtagctactg cactgattc aatagatc gcctgtcagc ttccagccc ggattgtg
1321 agcgaacag aaactgtcc gtaatggatt gatggttat gtcgctcga aattgccgtc
1381 gaagggaacg ggcgcgtgc tcttaacgt cctgggtgca gcagtgcagc agcgcgtgga
1441 tgagtgatac tggcgtgct atcgtgtac gcgcccat tccatgctc gtaccgccc
  
```

//

5 Esta enzima comprende la secuencia "GSSF" en oposición a GDSX.

Quando se ensayaba se descubrió que esta enzima no comprende actividad glucolipasa de acuerdo con la presente invención.

10 Por lo tanto, el motivo GDSx puede ser importante cuando se intenta identificar otras galactolipasas adecuadas.

De forma notable, la enzima de *S. rimosus* que se ha purificado y caracterizado bioquímicamente y muestra aproximadamente un 56% de homología de secuencia con *Streptomyces* L131 (Abramic M., et al. (1999); Vujaklija D. et al. (2002)) se sabe que hidroliza lípidos neutros tales como trioleína o ésteres de nitrofenilo de grasas. La enzima de *S. rimosus* también puede hidrolizar galactolipasa de acuerdo con la presente invención. Asimismo, otras dos especies de *Streptomyces* para las cuales están disponibles los datos de secuencia genómica - *S. coelicolor* A2(3) y *S. avermitilis* pueden contener enzimas que tengan actividad galactolipasa, por ejemplo (NP\_625998 y NP\_827753) están actualmente anotadas en GenBank como "hidrolasas secretadas putativas".

20 Pueden identificarse muchos otros homólogos útiles de galactolipasa de *Streptomyces* L131 por un enfoque similar. Las enzimas galactolipasa/lípido acil-transferasa adecuadas para su uso en los métodos de la invención pueden identificarse por alineación con la secuencia L131 usando Align X, el algoritmo de alineación por pares Clustal W de VectorNTI usando ajustes por defecto.

25 Como alternativa, la galactolipasa adecuada para su uso en los métodos de la invención puede identificarse por alineación de la secuencia consenso Pfam00657 de pfam (como se describe en el documento WO04/064987).

La Figura 15 muestra una alineación de secuencia de L131 y homólogos de *S. avermitilis* y *T. fusca*. La Figura 15 ilustra la conservación del motivo GDSx (GDSY en L131 y *S. avermitilis* y *T. fusca*), la caja GANDY, que es GGND A o GGNDL, y el bloque HPT (considerado como la histidina catalítica conservada). Estos tres bloques conservados están resaltados en la Figura 15.

35 Cuando se alinea con la secuencia consenso Pfam00657 de pfam (como se describe en el documento WO04/064987) y/o la secuencia L131 descrita en este documento (SEC ID Nº 4) es posible identificar tres regiones conservadas, el bloque GDSx, el bloque GANDY y el bloque HTP (véase el documento WO04/06498 para detalles adicionales).

Ejemplo 10: Clonación génica y construcción de vectores de expresión

40 Se usaron *Corynebacterium efficiens* DSM 44549, *Thermobifida fusca* DSM 43792 y *Streptomyces avermitilis* DSM46492 para aislar los genes homólogos al gen de la galactolipasa de *S. thermosacchari* L131.

Las cepas con un número DSM otorgado están depositadas y públicamente disponibles en Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM).

5 Se usaron *Escherichia coli* cepas XL-Blue MRF', BL21(DE3) (Novagen) y S17-1 (Simon R. *et al.*, 1983), *Bacillus subtilis* BD170, *Streptomyces lividans* cepa 1326 (John Innes Centre), *Corynebacterium glutamicum* DSM20300 como hospedadores para expresión heteróloga. La cepa de *Aeromonas salmonicida* (DSM 12609) también se usó como hospedador de expresión.

10 Se aislaron *S. thermosacchari* L131, *Citrobacter freundii* P3-42 y *Enterobacter nimipressuralis* P1-60 en nuestro laboratorio del entorno natural y se identificaron taxonómicamente por secuenciación génica de ARNr 16S.

15 Se usaron los siguientes medios de cultivo en este estudio. Se usó LB (5 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de triptona, 10 g/l de NaCl, pH 7,0), 2xYT (10 g/l de NaCl, 10 g/l de extracto de levadura, 16 g/l triptona) para el cultivo de *E. coli* y otras bacterias Gram-negativas. Se usó caldo nutriente (3 g/l de extracto de carne vacuna, 5 g/l de peptona, pH 7,0) para cultivar *C. efficiens* y *N. aromaticivorans*, se usó caldo YM (3 g/l de extracto de levadura, 3 g/l de extracto de malta, 5 g/l de peptona, 10 g/l de dextrosa, pH 7,0) para el cultivo de *S. avermitilis*, se usó medio 65 (4 g/l de glucosa, 4 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de malta, 2 g/l de CaCO<sub>3</sub>, pH 7,2) para *T. fusca*.

20 Aislamiento de ADN

Se usó procedimiento convencional de lisis alcalina combinado con método de purificación en columna Qiagen para aislamiento del plásmido. Una excepción fue el aislamiento preparativo de ADN plasmídico a partir de *Streptomyces*. En este caso, se usó centrifugación en equilibrio en gradiente de CsCl como etapa de purificación final.

25 Métodos para la introducción de ADN en cepas microbianas

30 Ambas cepas de *E. coli* y *C. glutamicum* se transformaron por electroporación usando cubetas de 1 mm y los siguientes ajustes paramétricos de electroporación: 1800V, -3,89°C (25°F), 200 µl. *B. subtilis* BD170 se transformó por el método "Paris" basado en competencia natural (Harwood C.R. y Cutting S.M., 1990). *Streptomyces lividans* se transformó por el método de protoplastos (Kieser T. *et al.*, 2000). El ADN se introdujo en *A. salmonicida* por conjugación con *E. coli* usando el método de acoplamiento de filtro de Harayama *et al.* (1980).

Construcción de mutante resistente a rifampicina de *A. salmonicida*

35 Se sembraron aproximadamente 10<sup>8</sup> células de cultivo durante una noche de *A. salmonicida* DSM12609 en una serie de placas de agar LB que contenían 5-30 mg/l de rifampicina. Las placas se irradiaron por luz UV de onda corta usando el dispositivo SpectroLinker XL-1500 (Spectronics Corp. EEUU). La dosis de radiación fue 4-6 J/M<sup>2</sup>. Las placas se incubaron a 30°C durante 2 días. Se seleccionaron varias colonias que crecieron en 30 mg/l de rifampicina y se ensayaron adicionalmente en 50 mg/l de rifampicina. Se eligió un clon resistente a 50 mg/l de rifampicina (llamado R1) para el trabajo posterior.

Construcción de vectores de expresión de *E. coli* para homólogos de galactolipasa L131

45 El gen de la lipasa de *Streptomyces avermitilis* se amplificó por PCR usando ADN cromosómico como molde y los dos cebadores oligonucleotídicos oSAL-5 (GGGAATTCCATATGAGACGTTCCCGAATTACG) y oSAL-3 (GCATGGATCCGGTGACCTGTGCGACGG). Para la amplificación de genes de lipasa de *Thermobifida fusca* y *Corynebacterium efficiens* los cebadores oligonucleotídicos usados fueron oTFL-5 (GGGAATTCCATATGGGCAGCGGACCACGTG) y oTFL-3 (GCATGGATCCGACACGCACGGCTCAACG), oCEL-5 (GGGAATTCCATATGAGGACAACGGTCATCG) y oCEL-3 (GCATGGATCCGGCATCGGGCTCATCC), respectivamente. Los productos de PCR se digirieron con *Nde*I y *Bam*HI y se ligaron con vector pET11a (Novagen, EEUU) digerido con las mismas endonucleasas de restricción.

55 El vector de expresión de galactolipasa L131 para *S. lividans* se construyó del siguiente modo. Se digirió el plásmido pUC18(L131RX) que contiene el fragmento *Eco*RI-*Xba*I de 1,37 kb del fragmento original de ADN clonado que portaba el gen de la lipasa L131 (pBK(L131)) con *Eco*RI y se ligó con pU487 digerido con *Eco*RI (Kieser *et al.*, 2000). Este ligamiento conduce a la formación de los dos plásmidos recombinante que difieren en la orientación relativa de pJ487 y pUC18(L131RX). Para el posterior trabajo, se ha seleccionado una variante donde el promotor *lac* del pUC18 está flanqueando el gen *neo*<sup>R</sup> sin promotor de pJ487 en base al análisis de restricción. Esta construcción se llamó pRX487-5 (Figura 11). Además de resistencia a ampicilina, este plásmido también confiere a *E. coli* la resistencia a al menos 3 mg/l de kanamicina. Los protoplastos de *S. lividans* 1326 se transformaron con 0,1-10 µg de pRX487-5 para resistencia a tiostreptona (1,2 mg/l) y kanamicina (5 mg/l). Estos transformantes produjeron galactolipasa activa juzgada por el ensayo de placa indicadora de DGDG-safranina. Los transformantes se sembraron en placas SM (Kieser *et al.*, 2000) suplementadas con 5 mg/ml de kanamicina y se dejaron esporular. Las esporas resultantes se usaron para inocular el matraz de agitación y cultivos de fermentación.

65 Construcción de vectores de expresión para *Corynebacterium glutamicum*

Todos los vectores de expresión usados en este trabajo se basan en el plásmido pCB5 que es un vector lanzadera que porta el replicón de *C. glutamicum* del plásmido pSR1 (Yoshihama et al., 1985) y el replicón ColE1 de *E. coli*. El promotor que se usa en este vector se obtiene del gen *cop1* que codifica la proteína secretada principal de *C. glutamicum* - PS1. Las enzimas se expresaron a partir de sus genes nativos incluyendo péptidos señal no modificados, por ejemplo *T. fusca* (Figura 14).

#### Condiciones de fermentación

##### 10 Fermentación de cepas de *Streptomyces* productoras de lipasa

En matraces de agitación, se cultivaron cepas de *S. lividans* recombinantes productoras de lipasa en un medio que contenía (por litro) 10 g de peptona, 5 g de extracto de levadura, 2 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 10 g de glucosa (pH 7,0) suplementado con antibióticos apropiados: se usó tiostreptona a 1,2 mg/l, kanamicina a 20 mg/l, cloranfenicol a 1,5 mg/l y eritromicina a 1,5 mg/l. Se usaron suspensiones de esporas producidas por cultivo de los transformantes en placas SM para iniciar los cultivos.

Para fermentaciones alimentadas por lotes, se usó fermentador Braun Biostat E (10 l). El medio inicial (7 l), contenía (por litro): peptona 20 g, extracto de levadura, 10 g, glucosa 20 g y antibióticos apropiados como se ha descrito anteriormente (excepto por tiostreptona, que no se usó en cultivos de 10 l). El cultivo se realizó a 30°C, aireación constante de 10 l/min y 600 rpm de velocidad de agitación. Se cultivaron inóculos (2 x 250 ml por fermentación) en matraces Erlenmeyer de 2 l como se ha descrito en el párrafo previo. La fermentación se realizó en modo discontinuo durante 18-20 h, tiempo después del cual, se suministró una solución que contenía glucosa al 30% y peptona al 12,5% al cultivo de fermentador a una velocidad de 0,5 ml/min. Las muestras (30 ml) del cultivo se extrajeron de forma aséptica dos veces al día.

##### Fermentación de cepas recombinantes de *C. glutamicum*

Se cultivaron cultivos en matraz de agitación de *C. glutamicum* en LB que contenía 50 mg/l de kanamicina a 30°C y 200 rpm de velocidad de agitación.

##### Fermentación de cepas recombinantes de *A. salmonicida*

En matraces de agitación, se cultivaron las cepas recombinantes de *A. salmonicida* en medio 2xYT suplementado con estreptomycin y kanamicina (a 25 mg/l). Para inducir el promotor *tac*, se añadieron IPTG (1-5 mM) o lactosa (1-10%) al medio de cultivo.

Se ensayaron dos series de condiciones para la producción de acil-transferasa recombinante en *A. salmonicida* a escala de fermentador. En el primer experimento, el medio inicial (7 l) era 2xYT suplementado con glucosa al 2%, 50 mg/l de kanamicina y 50 mg/l de estreptomycin y la solución de suministro (3 l) contenía glucosa al 25%, triptona al 10% y extracto de levadura al 5%, 100 mg/l tanto de kanamicina como de estreptomycin. El cultivo se realizó a aireación de 10 l/min, 600 rpm de velocidad de agitación y 28°C. El pH se ajustó a 7,5 por NH<sub>3</sub> al 25% y ácido fosfórico al 10%. El fermentador se inoculó con 0,5 l de cultivo durante una noche de *A. salmonicida* y se cultivó en modo discontinuo durante 24 h. En este punto, se añadió IPTG hasta 5 mM y el suministro se inició a una velocidad de 50 ml/h.

En el segundo experimento, el medio inicial se modificó sustituyendo la glucosa con lactosa. La solución de suministro fue 2 l de lactosa al 20%. La temperatura de fermentación se aumentó hasta 30°C y el pH del medio de cultivo se disminuyó hasta 7,0. La inoculación se hizo como en el primer experimento y el suministro (100 ml/h) se inició después de 20 h de cultivo en el medio inicial.

## ENSAYOS ENZIMÁTICOS

### Método de selección en placa de safranina

En la selección en placa de safranina la capa inferior contenía medio de cultivo + aditivo, agarosa al 1,5% y safranina al 0,002% (solución madre al 0,2% en agua, filtrada a esterilidad) y la capa superior agarosa al 0,7%, DGDG al 1% y safranina al 0,002%.

### 60 Determinación de actividad galactolipasa (ensayo de actividad glucolipasa (GLU-7)):

#### Sustrato:

Se disolvió digalactosildiglicérido al 0,6% (Sigma D 4651), Triton-X 100 al 0,4% (Sigma X-100) y CaCl<sub>2</sub> 5 mM en tampón HEPES 0,05 M pH 7.

#### Procedimiento de ensayo:

Se añadieron 400  $\mu$ l de sustrato a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se colocó en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 5 minutos. A tiempo  $t = 0$  min, se añadieron 50  $\mu$ l de solución enzimática. También se analizó un blanco con agua en lugar de enzima. La muestra se mezcló a 10x00 rpm en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 10 minutos. A tiempo  $t = 10$  min el tubo Eppendorf se colocó en otro thermomixer a 99°C durante 10 minutos para detener la reacción. El ácido graso libre en las muestras se analizó usando el kit NEFA C de WAKO GmbH.

La actividad enzimática GLU a pH 7 se calculó como micromoles de ácido graso producidos por minuto en condiciones de ensayo

#### 10 Determinación de actividad fosfolipasa (ensayo de actividad fosfolipasa (PLU-7)):

##### Sustrato

15 Se dispersó L- $\alpha$  fosfatidilcolina al 0,6% vegetal al 95% (Avanti nº 441601), Triton-X 100 al 0,4% (Sigma X-100) y CaCl<sub>2</sub> 5 mM en tampón HEPES 0,05 M pH 7.

##### Procedimiento de ensayo:

20 Se añadieron 400  $\mu$ l de sustrato a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se colocó en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 5 minutos. A tiempo  $t = 0$  min, se añadieron 50  $\mu$ l de solución enzimática. También se analizó un blanco con agua en lugar de enzima. La muestra se mezcló a 10x100 rpm en un Eppendorf Thermomixer a 37°C durante 10 minutos. A tiempo  $t = 10$  min el tubo Eppendorf se colocó en otro thermomixer a 99°C durante 10 minutos para detener la reacción. El ácido graso libre en las muestras se analizó usando el kit NEFA C de WAKO GmbH.

25 La actividad enzimática PLU-7 a pH 7 se calculó como micromoles de ácido graso producidos por minuto en condiciones de ensayo.

##### Ensayo espectrofotométrico con palmitato de p-nitrofenilo (pNPP)

30 Se midió la actividad lipasa con un ensayo espectrofotométrico a 30°C con pNPP como sustrato, usando tampón Tris-Maleato 50 mM (pH 6,5) con Triton X-100 al 0,4% y goma arábica al 0,1%. La solución madre de sustrato (100 mM) se preparó en dioxano. La medición cinética se inició mediante la adición de enzima a la mezcla de reacción. Para evaluar la actividad hidrolítica inicial, se siguió el aumento en la absorción a 410 nm con el lector de placa Spectramax cada 20 s durante 20 min. Una unidad de actividad lipasa se definió como la cantidad de enzima que liberaba 1  $\mu$ mol de p-nitrofenol por min. La actividad hacia otros ésteres de p-NP se midió del mismo modo, usando 35 1 mM de cada sustrato. (Abramic M. et al. (1999))

##### Determinación de los efectos del pH y la temperatura sobre la actividad lipasa

40 Para la determinación del efecto del pH sobre la actividad enzimática, se midió sobre un intervalo de pH 2-10 usando el ensayo de actividad galactolipasa excepto que los tampones usados en el experimento fueron los siguientes: pH 2-3,5 Glicina-HCl; pH 4-5 NaOAc; pH 5,5-7,5 Tris-Maleato; pH 7,5-9 Tris-HCl; pH 10 CAPS.

45 El efecto de la temperatura sobre la actividad galactolipasa se determinó incubando alícuotas de enzima durante 20 min a diversas temperaturas (22°C-90°C) después de incubación en hielo durante 60 min. La actividad residual se analizó por el ensayo de actividad galactolipasa.

50 Para la detección de la temperatura óptima para la actividad galactolipasa, la mezcla de ensayo usual se equilibró a la temperatura requerida (el intervalo 20°C-70°C) y se añadieron 2 o 4  $\mu$ l de enzima para iniciar la reacción. La actividad se analizó por el ensayo de actividad galactolipasa, pero usando un periodo más corto de tiempo (20 min).

##### Ejemplo 11: Caracterización de candidatos de galactolipasa a partir de estudio de biodiversidad

55 La secuencia de la galactolipasa de *Streptomyces thermosacchari* L131 ofrece la posibilidad de identificación *in silico* de nuevas galactolipasas de la familia II.

Pueden identificarse muchos otros homólogos útiles de galactolipasa de *Streptomyces* L131, por ejemplo, "proteína hipotética" de *Thermobifida fusca* (ZP\_00058717) y "proteína hipotética" de *Corynebacterium efficiens* (NP\_738716).

60 Se clonaron y expresaron 3 homólogos de galactolipasa de *Streptomyces* L131: los genes de *Streptomyces avermitilis* (SAL), *Thermobifida fusca* (TFL), y *Corynebacterium efficiens* (CEL). Todos los genes se expresaron en *E. coli* usando sistema de expresión pET. Las cepas recombinantes de *E. coli* primero se analizaron usando placas indicadoras de DGDG con safranina y se descubrió que las enzimas de *S. avermitilis*, *T. fusca* y *C. efficiens* tenían actividad galactolipasa.

Las enzimas que mostraban actividad galactolipasa se examinaron adicionalmente. Se estudiaron las especificidades de sustrato de esos candidatos de galactolipasa (Figura 13). Se ensayó la actividad de las enzimas candidatas hacia DGDG, lecitina, aceite de oliva, butirato de nitrofenilo, decanoato de nitrofenilo (NP-D) y palmitato de nitrofenilo. Se descubrió que las enzimas tenían perfiles de especificidad de sustrato muy diferentes. La actividad acil-transferasa se ensayó en un ensayo usando NP-D como sustrato y cuantificando tanto la liberación de nitrofenol como ácidos grasos libres por el kit NEFA. Los datos preliminares sugieren que al menos la enzima de *Thermobifida fusca* tiene actividad transferasa hacia glicerol y glucosa.

Se ensayó la termoestabilidad de los candidatos de galactolipasa. Se descubrió que la enzima de *Corynebacterium efficiens* era la más termoestable mientras que la enzima de *Streptomyces avermitilis* era la más termosensible.

Ejemplo 12: Ensayo de desgomado de *Streptomyces thermosacchari* L131

Se ensayó una fosfolipasa de *Streptomyces thermosacchari* L131 en aceite de soja crudo.

Materiales y métodos

K371: Enzima de *Streptomyces thermosacchari* L131 expresada en *S. lividans* secada por congelación en almidón. (Actividad: 108 PLU-7/g).

Lecitase Ultra (nº 3108) de Novozymes, Dinamarca

Éster de colesterol, Fluka 26950

Esterol vegetal: General 122 N de Henkel, Alemania

Aceite de soja crudo de The Solae Company, Aarhus Dinamarca

Lecitina: L- $\alpha$  fosfatidilcolina vegetal al 95% (Avanti nº 441601)

Actividad fosfolipasa

El ensayo de fosfolipasa fue el mismo que el usado en el Ejemplo 10.

HPTLC

Aplicador: Tomamuestras de TLC automático 4, CAMAG

Placa de HPTLC: 20 x 10 cm, Merck nº 1.05641. Activada 30 minutos a 160°C antes de su uso.

Aplicación: se aplicó 1  $\mu$ l de una solución al 8% de aceite en tampón a la palca de HPTLC usando el aplicador de TLC automático.

Tampón de ejecución 4: Cloroformo:Metanol:Agua 75:25:4

Tampón de ejecución 5: P-éter:Metil-terc-butil cetona:Ácido acético 70:30:1

Tiempo de aplicación/elución:

Tampón de ejecución 4: 20 min

Tampón de ejecución 5: 10 min

Desarrollo de TLC

La placa se secó en un horno durante 10 minutos a 160°C, se enfrió, y se sumergió en acetato cúprico al 6% en H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 16%. Se secó adicionalmente 10 minutos a 160°C y se evaluó directamente.

Experimento de desgomado

Se usó *Streptomyces thermosacchari* L131 (K371) para estudios de desgomado en las formulaciones mostradas en la tabla 4.

Las muestras se colocaron a 40°C durante 18 horas con agitación, tiempo después del cual se recogió una muestra para análisis de HPTLC disolviendo la muestra en Cloroformo:Metanol 2:1.

Tabla 4. Desgomado de aceite de soja crudo con *Streptomyces thermosacchari* L131 y Lecitase Ultra™

Carril		1	2	3	4	5	6
Aceite de soja crudo	%	99	99	98	97	99,7	99
K371, 10% en agua	%		1	2	3		
Lecitase Ultra™ nº 3108, 1% en agua	%					0,3	0,3
Agua	%	1	0	0	0		0,7

Los resultados del análisis de HPTLC se muestran en la Figura 16 y Figura 17.

5 La Figura 16 muestra la placa de TLC (tampón 4) de productos de reacción procedentes de tratamiento enzimático de muestras de aceite de soja crudo de acuerdo con la tabla 4. Como se ha referenciado, también se analizó fosfatidilcolina (PC). También se indican fosfatidiletanolamina (PE) y lisofosfatidilcolina (LPC).

10 Los resultados de TLC en la Figura 16 muestran claramente que la fosfatidilcolina se eliminaba completamente añadiendo *Streptomyces thermosacchari* L131 al aceite. Solamente la dosificación más baja (Carril 2) no hidrolizaba completamente los fosfolípidos. Lecitase Ultra™ también hidrolizaba los fosfolípidos en el aceite cuando estaba disponible agua al 5% (Carril 6) pero sin añadir agua extra (Carril 5) solamente se hidrolizaba parte de los fosfolípidos.

15 La Figura 17 muestra TLC (tampón 5) de productos de reacción procedentes del tratamiento enzimático de muestras de aceite de soja crudo de acuerdo con la tabla 4. Como se ha referenciado, también se indican éster de colesterol, monoglicérido, diglicérido, triglicérido y esteroil vegetal, ácido graso libre (FFA).

Los resultados mostrados en la Figura 17 indican que la hidrólisis de fosfolípidos es coincidente con la formación de ácido graso libre.

## 20 Conclusión

Los resultados confirman que *Streptomyces thermosacchari* L131 hidroliza de forma eficaz fosfolípidos en aceite de soja crudo y es una enzima alternativa adecuada para desgoma aceites vegetales.

## 25 Referencias

- Abramic M., Lescic I., Korica T., Vitale L., Saenger W., Pigac J. Purification and properties of extracellular lipase from *Streptomyces rimosus*. *Enzyme and Microbial Technology* 25 522-529 (1999)
- 30 Harayama S., Masataka T., Iino T. High-frequency mobilisation of the chromosome of *Escherichia coli* by a mutant of plasmid RP4 temperature sensitive for maintenance. *Mol. Gen. Genet* 180,47-56 (1980).
- Harwood C.R. y Cutting S.M. *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd., West Sussex, Inglaterra (1990)
- 35 Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. *Practical Streptomyces genetics*. The John Innes Foundation, Crowes, Norwich, Inglaterra (2000)
- Vujaklija D., Schroder W., Abramic M., Zou P., Lescic I., Franke P., Pigac J. A novel streptomycete lipase: cloning, sequencing and high-level expression of the *Streptomyces rimosus* GDS(L)-lipase gene. *Arch. Microbiol.* 178, 124-130 (2002)
- 40 Yoshihama M, Higashiro K, Rao EA, Akedo M, Shanabruch WG, Follettie MT, Walker GC, Sinskey AJ. Cloning vector system for *Corynebacterium glutamicum*. *J Bacteriol.* 162 (2):591-597 (1985).
- 45

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo, en la que la enzima se puede obtener de especies *Streptomyces* y comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la misma.
- 10 2. Una enzima lipolítica capaz de hidrolizar lípidos polares y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido polar hasta uno o más sustratos aceptores de acilo, en la que la enzima está codificada por un ácido nucleico seleccionado entre el grupo que consiste en:
- 15 a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3;  
b) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 por la degeneración del código genético; y  
c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3.
- 20 3. Una enzima lipolítica de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 2 obtenida de las cepas de *Streptomyces* L130 o L131 depositadas con los números de acceso NCIMB 41226 y NCIMB 41227, respectivamente.
- 25 4. Una enzima lipolítica de acuerdo con la reivindicación 2 o reivindicación 3 en la que la enzima es capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o es capaz de transferir un grupo acilo desde un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo.
- 30 5. Una enzima lipolítica de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 4 en la que la enzima es capaz de hidrolizar un lípido polar adicional.
- 35 6. Una enzima lipolítica de acuerdo con la reivindicación 5 en la que el lípido polar es un fosfolípido.
- 40 7. Una enzima lipolítica de acuerdo con la reivindicación 1 o reivindicación 4 en la que la enzima lipolítica es capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido polar hasta uno o más de los siguientes sustratos aceptores de acilo: un esteroil, un estanol, un carbohidrato, una proteína o subunidades de la misma, o un glicerol.
- 45 8. Una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores en la que la enzima es una enzima de tipo silvestre.
- 50 9. Un ácido nucleico que codifica una enzima lipolítica capaz de hidrolizar al menos un galactolípido y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un galactolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo que comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N° 4 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 70% de identidad con la misma.
- 55 10. Un ácido nucleico que codifica una enzima lipolítica capaz de hidrolizar lípidos polares y/o capaz de transferir un grupo acilo desde un lípido polar hasta uno o más sustratos aceptores de acilo, seleccionándose dicho ácido nucleico entre el grupo que consiste en:
- 60 a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3;  
b) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 3 por la degeneración del código genético; y  
c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos un 70% de identidad con la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID N° 3.
- 65 11. Uso de una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en un proceso para preparar un lisoglucolípido por tratamiento de un glucolípido con la enzima lipolítica para producir el producto de hidrólisis parcial, es decir el lisoglucolípido.
12. Uso de una enzima lipolítica de acuerdo con la reivindicación 11, en el que el lisoglucolípido comprende digalactosil monoglicérido (DGMG) o monogalactosil monoglicérido (MGMG).
13. Uso de una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en un proceso para preparar un liso-fosfolípido, por ejemplo lisolectina, por tratamiento de un fosfolípido (por ejemplo, lecitina) con la enzima para producir un producto de hidrólisis parcial, es decir un liso-fosfolípido.
14. Uso de una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en un proceso de desgomado enzimático de aceite vegetal o comestible, que comprende tratar dicho aceite comestible o vegetal con dicha enzima lipolítica para hidrolizar una parte principal de los lípidos polares.



15. Uso de una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en un proceso que comprende el tratamiento de un fosfolípido para hidrolizar grupos acilo grasos.
- 5 16. Uso de una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en un proceso de bioconversión de lípidos polares para preparar productos de alto valor, en el que dicha enzima lipolítica es capaz de hidrolizar dichos lípidos polares.
- 10 17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16 en el que dichos productos de alto valor son uno o más de los siguientes: un éster de carbohidrato, un éster de proteína, un éster de subunidad proteica y un éster de hidroxiácido.
18. Un método para preparar un producto alimenticio comprendiendo el método mezclar la enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 con uno o más ingredientes del producto alimenticio.
- 15 19. El método de acuerdo con la reivindicación 18 en el que dicha enzima lipolítica es capaz de hidrolizar un glucolípido y/o un fosfolípido presente en o como al menos uno de dichos ingredientes.
- 20 20. Un método de acuerdo con la reivindicación 18 o 19 en el que el producto alimenticio se selecciona entre uno o más de los siguientes: huevos, productos basados en huevo, incluyendo aunque sin limitación mahonesa, aliños de ensalada, salsas, helados, huevo en polvo, yema de huevo modificada y productos preparados a partir de la misma; productos horneados, incluyendo panes, tortas, productos de masa dulce, masas laminadas, masas líquidas, muffins, rosquillas, galletas, galletas saladas y galletas dulces; productos de confitería, incluyendo chocolate, golosinas, caramelos, halawa, chicles, incluyendo chicle sin azúcar y edulcorado con azúcar, chicle globo, chicle globo blando, goma de mascar y postres; productos congelados incluyendo sorbetes, preferiblemente productos lácteos congelados, incluyendo helados y leche helada; productos lácteos, incluyendo queso, mantequilla, leche, nata para café, nata montada, crema pastelera, bebidas lácteas y yogures; mousses, nata batida vegetal, productos cárnicos, incluyendo productos cárnicos procesados; aceites y grasas comestibles, productos batidos gaseosos y no gaseosos, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, margarina, productos para untar y mantecas incluyendo mantecas de bajo y muy bajo contenido en grasa; aliños, mahonesa, aderezos, salsas basadas en crema, sopas basadas en crema, bebidas, emulsiones sazonadas y salsas.
- 30 21. Un método de acuerdo con la reivindicación 20 en el que dicho producto alimenticio es un producto lácteo.
22. Un método de acuerdo con la reivindicación 20 en el que dicho producto alimenticio es un huevo o producto basado en huevo.
- 35 23. Un método para preparar un lisoglucolípido que comprende tratar un sustrato que comprende un glucolípido con al menos una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para producir dicho lisoglucolípido, en el que dicha enzima lipolítica tiene actividad glucolipasa.
- 40 24. Un método para preparar un lisofosfolípido que comprende tratar un sustrato que comprende un fosfolípido con al menos una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para producir dicho lisofosfolípido, en el que dicha enzima lipolítica tiene actividad fosfolipasa.
- 45 25. Un método de desgomado enzimático de aceite vegetal o comestible, que comprende tratar dicho aceite comestible o vegetal con una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 capaz de hidrolizar una parte principal de los lípidos polares.
- 50 26. Un método de bioconversión de lípidos polares para preparar productos de alto valor que comprende tratar dichos lípidos polares con una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para producir dichos productos de alto valor, en el que dicha enzima lipolítica es capaz de hidrolizar dichos lípidos polares.
- 55 27. Un método de acuerdo con la reivindicación 26 en el que dichos productos de alto valor son uno o más de los siguientes: un éster de carbohidrato, un éster de proteína, un éster de subunidad proteica y un éster de hidroxiácido.
28. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 27 en el que dicha enzima lipolítica es capaz de transferir un grupo acilo desde un glucolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo.
- 60 29. Un método de acuerdo con la reivindicación 20 en el que dicho producto alimenticio es un producto horneado y al menos uno de dichos ingredientes es una masa.
30. Uso de una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en un sustrato para preparar un lisoglucolípido en el que dicha enzima lipolítica tiene actividad glucolipasa.
- 65 31. Uso de una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en un sustrato para preparar un lisofosfolípido en el que dicha enzima lipolítica tiene actividad fosfolipasa.

32. Uso de una enzima lipolítica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la preparación de un producto alimenticio, en el que dicha enzima lipolítica es capaz de hidrolizar un glucolípido y/o un fosfolípido.
- 5 33. Uso de acuerdo con la reivindicación 30 a 32 en el que dicha enzima lipolítica es capaz de transferir un grupo acilo desde un glucolípido hasta uno o más sustratos aceptores de acilo.
34. Uso de acuerdo con la reivindicación 30 en el que dicho lisoglucolípido es DGMG o MGMTG.
- 10 35. Uso de acuerdo con la reivindicación 32 en el que dicho producto alimenticio es un producto lácteo.
36. Uso de acuerdo con la reivindicación 35 en el que dicho producto alimenticio es un huevo o un producto basado en huevo y en el que dicha enzima lipolítica es capaz de transferir un grupo acilo hasta uno o más sustratos aceptores de acilo para reducir uno o más de los siguientes efectos nocivos: malos olores y/o malos sabores y/o gusto jabonoso.
- 15 37. Uso de acuerdo con la reivindicación 32 en el que dicho producto alimenticio es un producto horneado.
38. Uso de acuerdo con la reivindicación 30 en el que dicho sustrato es un aceite comestible.

**FIGURA 1**

**SEC ID N°: 1**

GACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTG GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA  
CGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCC  
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCG  
GAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGG  
CCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTCG  
TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTGTGTTGCCAGCGGATCCCTTCG  
GGGTGCCGGGGACTCACGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGA

**FIGURA 2**

**SEC ID N°: 2**

GACGCTGAGGAGCGAAAAGCGTG GGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAA  
CGGTGGGCACTAGGTGTGGGCAACATTCCACGTTGTCCGTGCCGCAGCTAACGCATTAAGTGCCCC  
GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAAC TCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCGGCG  
GAGCATGTGGCTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATACACCGGAAACGG  
CCAGAGATGGTCGCCCCCTTGTGGTCGGTGTACAGGTGGTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTCG  
TGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTATCCTGTGTTGCCAGCGGATCCCTTCG  
GGGTGCCGGGGACTCACGGGAGACTGCCGGGTCAACTCGGA

**FIGURA 3**

**SEC ID N°: 3**

ACAGGCCGATGCACGGAACCGTACCTTTCCGCAGTGAAGCGCTCTCCCCCATCGTTCCG  
CGGGACTTCATCCGCGATTTTGGCATGAACACTTCCTTCAACGCGCGTAGCTTGCTACAA  
GTGCGGCAGCAGACCCGCTCGTTGGAGGCTCAGTGAGATTGACCCGATCCCTGTCGGCCG  
CATCCGTCATCGTCTTCGCCCTGCTGCTCGCGCTGCTGGGCATCAGCCCGGCCAGGCAG  
CCGGCCCGGCCTATGTGGCCCTGGGGATTCTATTCTCGGGCAACGGCGCCGGAAGTT  
ACATCGATTGAGCGGTGACTGTCACCGCAGCAACAACGCGTACCCCGCCGCTGGGCGG  
CGGCCAACGCACCGTCTCTTACCTTCGCGCCCTGCTCGGGAGCGGTGACCACGGATG  
TGATCAACAATGAGCTGGGCGCCCTCAACGCGTCCACCGGCCTGGTGAGCATCACCATCG  
GCGGCAATGACGCGGGCTTCGCGGACGCGATGACCACCTGCGTACCAGCTCGGACAGCA  
CCTGCCTCAACCGGCTGGCCACCGCCACCAACTACATCAACACCACCCTGCTCGCCCGGC  
TCGACGCGGTCTACAGCCAGATCAAGGCCCGTGCCCCAACGCCCGCGTGGTCTCTCG  
GCTACCCGCGCATGTACCTGGCCTCGAACCCTGGTACTGCCTGGGCCTGAGCAACACCA  
AGCGCGCGGCCATCAACACCACCGCCGACACCCTCAACTCGGTGATCTCTCCCGGGCCA  
CCGCCACGGATTCCGATTGCGCGATGTCCGCCCGACCTTCAACAACCACGAACTGTTCT  
TCGGCAACGACTGGCTGCACTCACTCACCTGCCGGTGTGGGAGTCGTACCACCCACCA  
GCACGGGCCATCAGAGCGGCTATCTGCCGCTCTCAACGCCAACAGCTCGACCTGATCAA  
CGCACGGCCGTGCCCGCCCGCGCGTACGCTCGGCGCGGGCGCCGAGCGCGTTGATCA  
GCCACAGTGCCGGTGACGGTCCCACCGTACGCGTACGGGTGTACGTCACGGTGGCGCC  
GCTCCAGAAGTGGAACGTGAGCAGGACCGTGGAGCCGTCCTGACCTCGTGAAGAACTC  
CGGGGTGAGCGTATCACCCCTCCCCGTAGCCGGGGCGAAGGCGGCGCCGAACCTCCT  
GTAGGACGTCCAGTCGTGCGGCCGCGCGTTCACCGTCCGCGTAGACCGCTTCCATGGT  
CGCCAGCCGGTCCCCGCGGAACCTCGGTGGGGATGTCCGTGCCAAGGTGGTCCCGGTGGT  
GTCCGAGAGCACCGGGGGCTCGTACCGGATGATGTGCAGATCCAAAGAATT

**FIGURA 4**

**SEC ID N°: 4**

MRLTRLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAGPAYVALGDSYSSGNGAGSYIDSSGDCHRSN  
NAYPARWAAANAPSSFTFAACSGAVTTDVINQLGALNASTGLVSIITGGNDAGFADAMTT  
CVTSSDSTCLNRLATATNYINTLLARLDAVYSQIKARAPNARVWLGYPRMYLASNPWYC  
LGLSNTKRAAINTTADTLNSVSSRATAHGFRFGDVRPTFNNHELFFGNDWLHSLTLPWE  
SYHPTSTGHQSGYLPVLNANSST

FIGURA 5

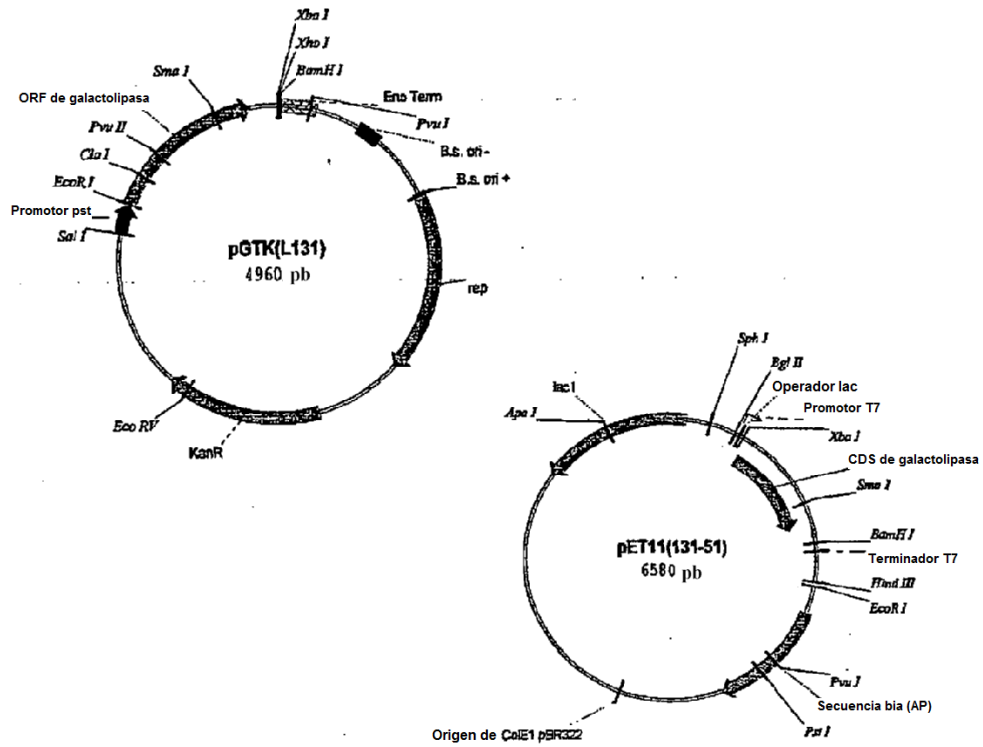


FIGURA 6

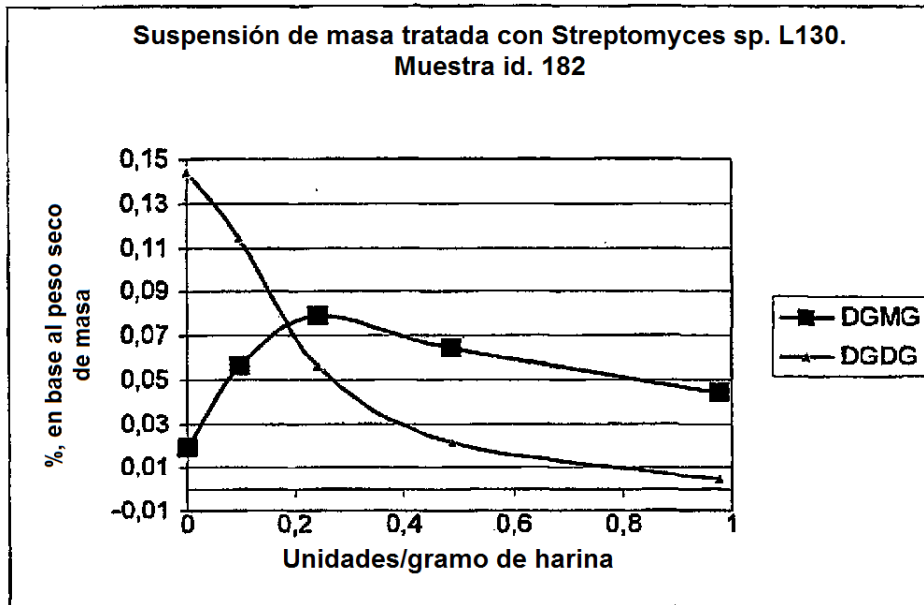


FIGURA 7

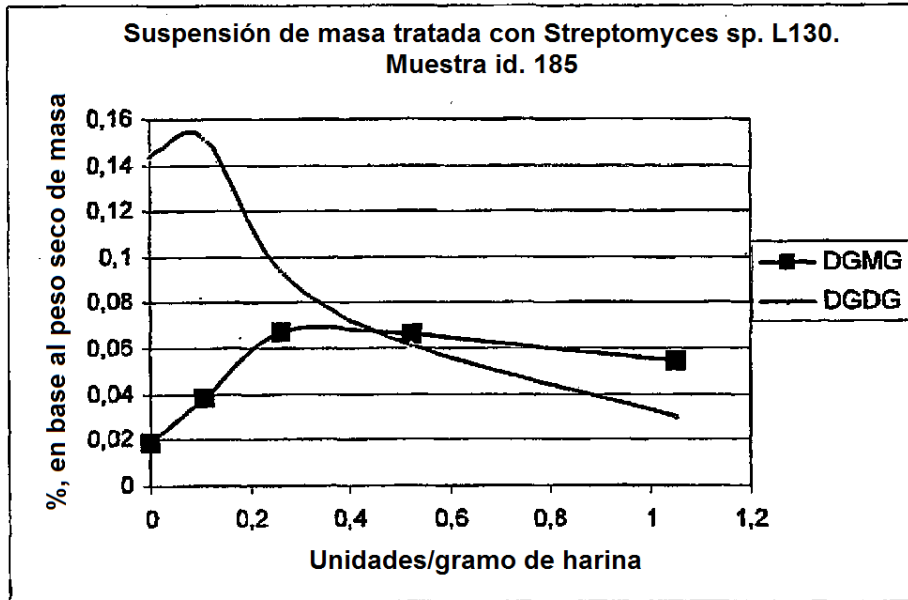


FIGURA 8

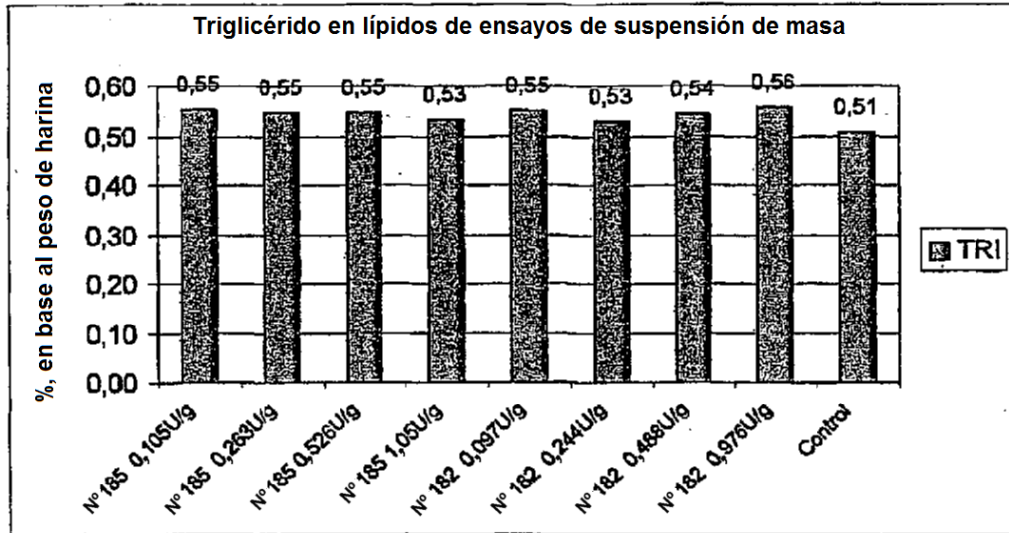
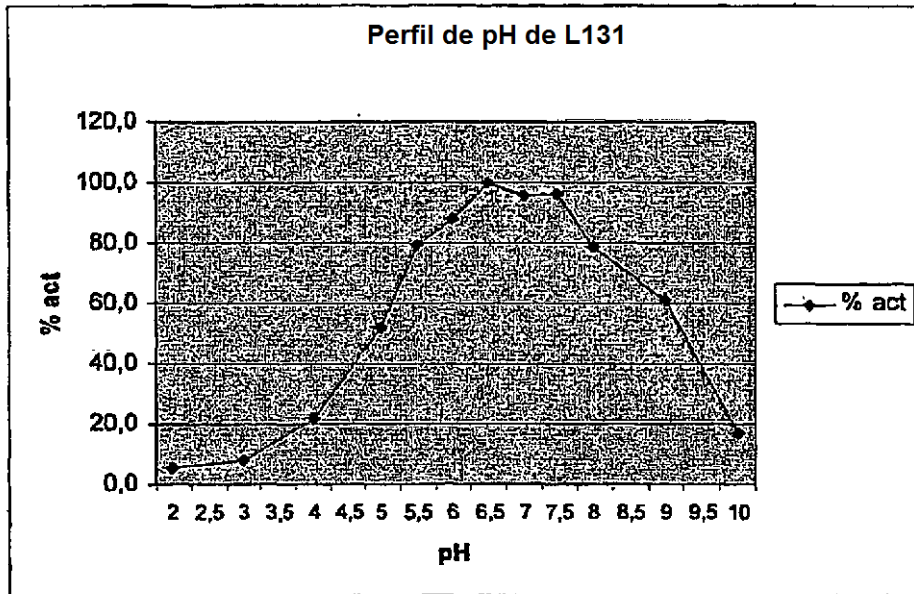




FIGURA 9



**FIGURA 10**

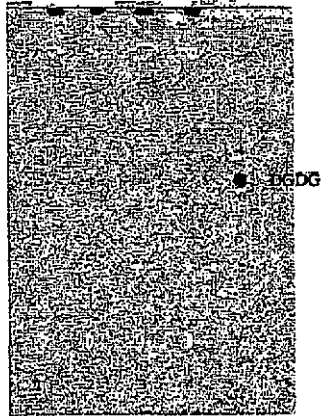


Figura 11

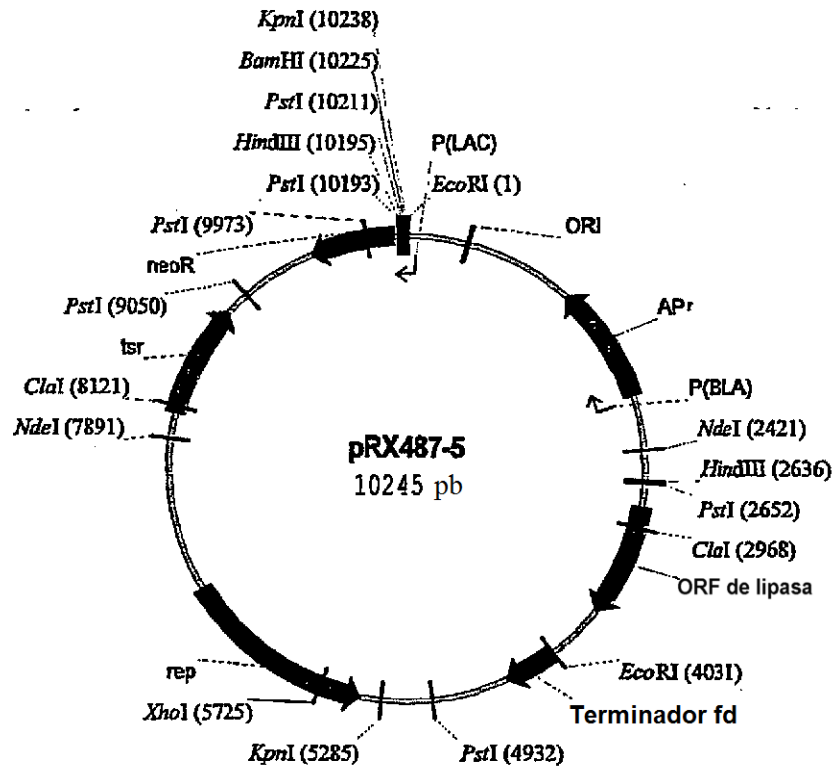


FIGURA 12

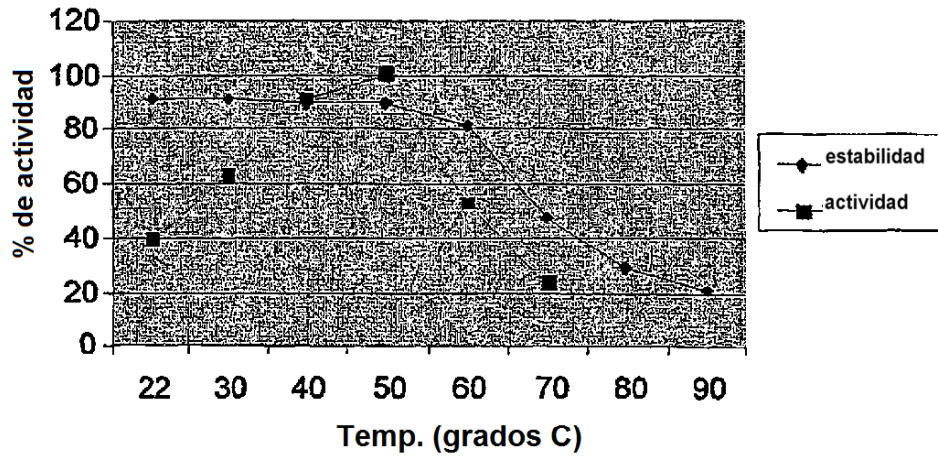


FIGURA 13

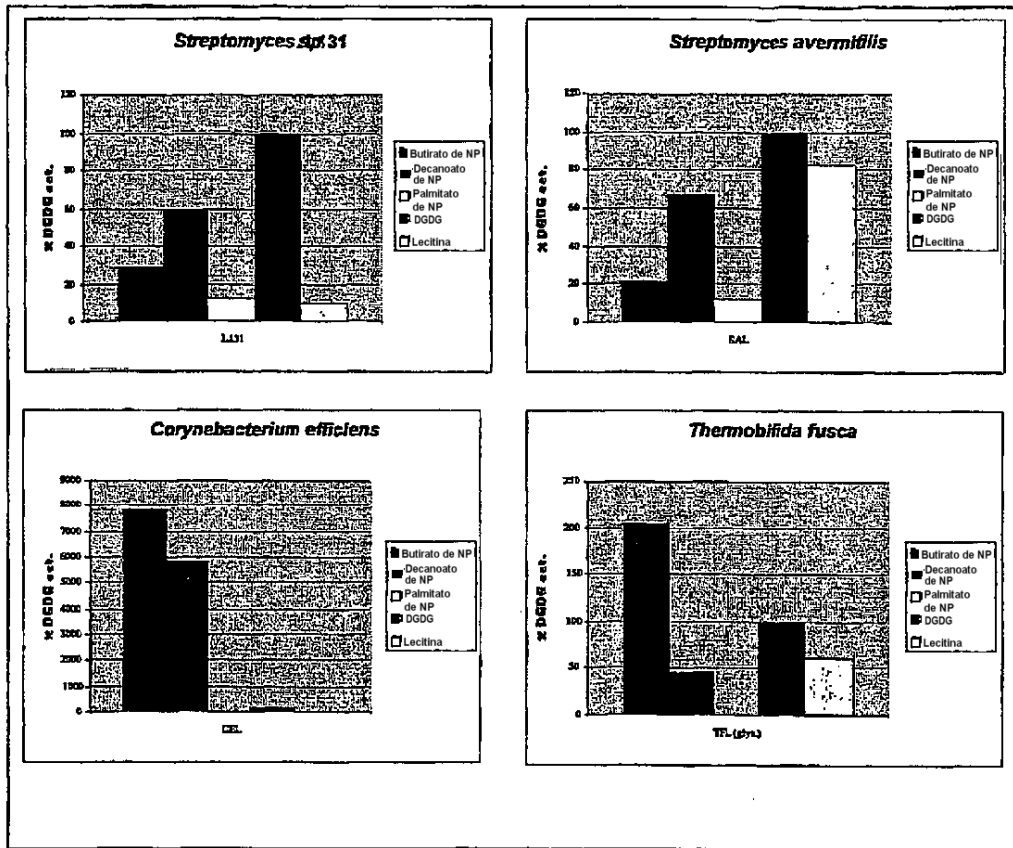


FIGURA 14

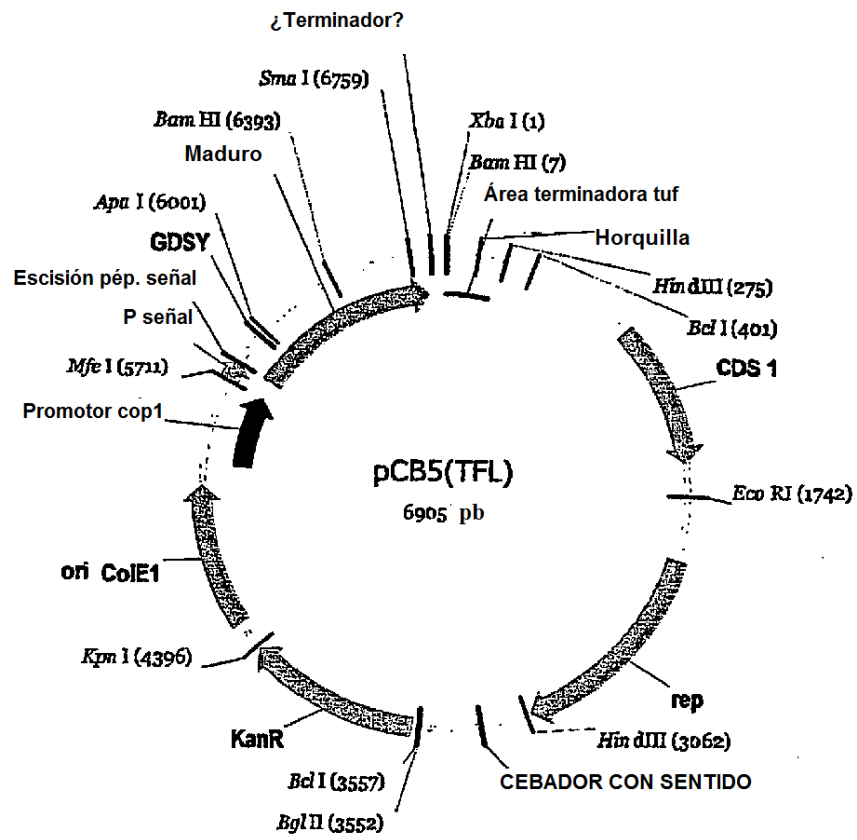


FIGURA 15

1. L131
2. S. avermitilis
3. T. fusca
4. Consenso

```

1                                     50
1 (1) -----MRLTRSLSAASVIVFALLLALLGISPAQAAG-----
2 (1) -----MRRSRITAYVTSLLLVGCALTGAATAQASPA-----
3 (1) VGS GPRAATRRRLFLGIPALVLTALTTLVLAVPTGRETLWRMWCEATODW
4 (1)          MRRSRFLA ALILLTLA AL GAA ARAAP

101                                     100
1 (32) -----P-AYVALGDSYSSGNGAGSYID
2 (33) -----AAATGYVALGDSYSSGVGAGSYLS
3 (51) CLGVPVDSRGQPAEDGEFLLLSPVQAATWGNYYALGDSYSSGDGARDYYP
4 (51)          A A YVALGDSYSSG GAGSY

101                                     150
1 (53) SSGD---CHRSNNAYPARWAAANAP---SSFTFAACSGAVTTDVIN---
2 (57) SSGD---CKRSSKAYPYLWQAAHSP---SSFSFMACSGARTGDVLA---
3 (101) GTAVKGGCWRSANAYPELVAEAYDFA---GHL SFLACSGQRGYAMLDAIDE
4 (101) SSGD C RSTKAYPALWAAAAHA SSFSF ACSGARTYDVLA

151                                     200
1 (93) --NQLGALNAST--GLVSIITIGGNDAGFADAMTTCVTS-----SDSTCL
2 (97) --NQLGTLNSST--GLVSLTIGGNDAGFSDVMTTCVLQ-----SDSACL
3 (149) VGSQLDWNSPHT--SLVTIIGGNDLGFSTVLKTCMVR-----VPLLDS
4 (151)  QL LNS T LVSITIGGNDAGFAD MTTCVL SDSACL

201                                     250
1 (133) NRLATATNYINTTLA-----RLDAVYSQIKARAPNARVVVLGYPRMY
2 (137) SRINTAKAYVDSTLPG-----QLDSVYTAISTKAPSAHVAVLGYPRFY
3 (191) KACTDOEDAIRKRAKF----ETTFEELISEVRTRAPDARILVVGYPRIF
4 (201)  RIA AK YI TLPA RLDSVYSI TRAP ARVVVLGYPRIY

251                                     300
1 (176) LASNPWYCLGLSNTKRAAINTTADTLNSVISSRATAH-----GF
2 (180) KLGG-SCLAGLSETKRSAINDAADYLNSAIKRAADH-----GF
3 (237) PEEPTGAYYTLTASNQRWLNETIQEFNQQLAEAVAVHDEEIAASGGVGSV
4 (251)  SG LGLS TKRAAINDAAD LNSVIKRAADH GF

301                                     350
1 (215) RFGDVRPTFNNEELFFGNDWLHSLTLP-----VWESYH
2 (218) TFGDVKSTFTGHEICSSSTWLHSLDLLN-----IGQSYH
3 (287) EFVDVYHALDGHEIGSDEPWVNGVQLRDLATG-----VTVDRSTFH
4 (301) TFGDV TF GHELCSA PWLHSLTLP V SYH

351                                     395
1 (248) PTSTGHQSGYLPVLNANSST-----
2 (252) PTAAGQSGGYLPVMNSVA-----
3 (328) PNAAGHRAVGERVIEQIETGPGRPLYATFAVVAGATVDTLAGEVG
4 (351) PTA GRAAGYLPVLNSI T

```

FIGURA 16

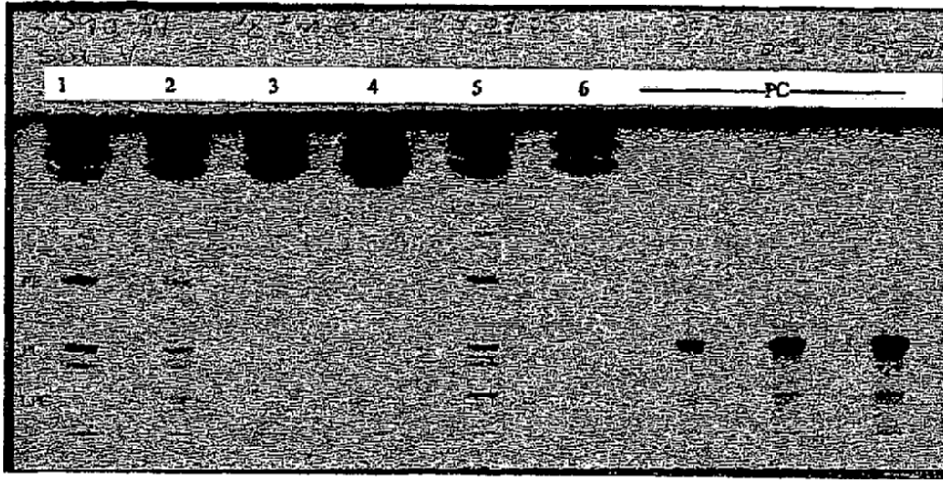


FIGURA 17

