

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 574 089**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2007 E 07818345 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.04.2016 EP 2084272**

54 Título: **Clonación, expresión y empleo de lisofosfolipasas ácidas**

30 Prioridad:

02.10.2006 DE 102006046857

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

14.06.2016

73 Titular/es:

**AB ENZYMES GMBH
FELDBERGSTRASSE 78
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:

**NGUYEN, KHANH, Q.;
MARSCHNER, VOLKER;
TITZE, KORNELIA y
WINTER, BRUNO**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 574 089 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

Clonación, expresión y empleo de lisofosfolipasas ácidas

La invención se refiere a nuevas secuencias de ADN, que codifican polipéptidos con actividad de lisofosfolipasa. La invención se refiere además a nuevos polipéptidos con actividad de lisofosfolipasa. En el caso de estos polipéptidos se trata de lisofosfolipasas ácidas con alta termoestabilidad. Además, la invención se refiere también al empleo de estas lisofosfolipasas para la mejora de la aptitud para filtración de siropes de almidón de trigo, mejora de masas, etc.

Fosfolípidos, como lecitina o fosfatidilcolina, están constituidos por glicerol, esterificado con dos ácidos grasos en la posición externa (sn-1) y en la posición media (sn-2) de glicerol, así como un grupo fosfato unido a éster en la tercera posición (sn-3). El grupo fosfato por su parte puede estar de nuevo esterificado, por ejemplo con aminoalcoholes. Fosfolipasas catalizan la hidrólisis del enlace acílico o de los enlaces tipo éster de los fosfolípidos. En el caso de fosfolipasas existen diversos tipos, que se diferencian en su modelo de disociación. En el caso de fosfolipasas que disocian acilo se diferencia entre las fosfolipasas A1 y A2, que hidrolizan el grupo acilo en la posición sn-1 o sn-2, y en este caso producen lisofosfolípido. Por este motivo, mediante lisofosfolipasa (LPL) se puede hidrolizar el ácido graso remanente. Para las lisofosfolipasas no es conocida una selectividad de posición.

En la bibliografía se describen fosfolipasas tipo B, que en parte hidrolizan casi simultáneamente ambos grupos acilo, sin que se pueda observar la formación de un intermedio de lisolecitina (FEMS Microbiol. Lett. 18 (1983) 15-18; Annu. Rev. Biochem. 41 (1972) 129-160). Esto es ocasionado frecuentemente, como por ejemplo en el caso de actividad PLB1 y PLB3 de *Saccharomyces cerevisiae* (Biochemistry 1999 May 4; 38(18): 5864-5871) al tener el enzima mucha más actividad LPL que actividad PLA_n. Las lisofosfolipasas puras sin actividad secundaria de fosfolipasa no pueden disociar ácidos grasos a partir de fosfolípidos que contienen ácido grasos en las posiciones sn-1 y sn-2.

Las lisofosfolipasas de tipo B descritas anteriormente, de las cuales es conocida la secuencia de aminoácidos y/o ácidos nucleicos, se pueden dividir en 2 grupos. En su caso se trata de lisofosfolipasas que pueden presentar adicionalmente una actividad de fosfolipasa A muy reducida.

- a) Son conocidas las secuencias de varios enzimas con pesos moleculares de 45-100 kDa. A éstas pertenecen los PLB de *Aspergillus niger* (WO 01/27251, WO 03/097825), los PLB de *Aspergillus fumigatus* (Shen et al. FEMS Microbiol Lett. 2004, 239 (1):87-93), los PLB de *Aspergillus oryzae* (WO 01/27251 & WO 01/29222), los PLB de *Fusarium venenatum* und *Fusarium verticillioides* (WO 00/28044), los PLB de *Penicillium notatum* auch *P. chrysogenum* genannt (N. Masuda et al., Eur. J. Biochem., 202: 783-787 (1991)), los PLB 1-3 de *Saccharomyces cerevisiae* (Lee et al., 1994 J. Biol. Chem. 269: 19725-19730, Merkel et al., 1999 J. Biol. Chem. 274: 28121-28127), los PLB de *Torulasporea delbrueckii*(alter Name *Saccharomyces rosei*) (Watanabe et al., 1994, FEMS Microbiology Letters 124: 29-34), *Kluyveromyces lactis* (Oishi et al., 1999 Biosci. Biotechnol. Biochem. 63: 83-90), *Neurospora crassa* (EMBL 042791) y *Schizosaccharomyces pombe* (EMBL O13857).
- b) Son conocidas varias secuencias de enzimas con un peso molecular de 30-40 kDa. A éstas pertenecen las lisofosfolipasas de *Aspergillus foetidus*, EP 0 808 903, los PLB de *A. niger*, WO 01/27251 y WO 03/097825, los PLB1 und PLB2 de *Candida albicans* (J. Biol. Chem. 273 (40): 26078-26086, 1998, Medical Mycology 37:61-67, 1998), y los PLB aus *Pseudomonas* PS21, JP 03151879. Por lo demás, en la literatura se mencionan fosfolipasas tipo A.
- c) El grupo de fosfolipasas tipo A con un peso molecular de aproximadamente 30-40 kDa. A éstas pertenecen las siguientes fosfolipasas del estado de la técnica: en el documento WO 98/31790 (AB Enzymes GmbH) se describe que, en *Aspergillus niger*, se encontró una fosfolipasa A apropiada para el desgomado de aceite comestible. La proteína (36 kDa) desarrolla actividad de fosfolipasa solo tras disociación proteolítica, permaneciendo unidos los dos fragmentos (30 + 6 kDa) a través de puentes disulfuro. El enzima disocia lecitina para dar lisolecitina, pero también es apto para disociar adicionalmente lisolecitina, por ejemplo para dar fosfatidilcolina. En el documento WO 98/26057 se describe una fosfolipasa A de *Fusarium* sp. con un peso molecular de 29 ± 10 kDa y un punto isoelectrico entre pl 4.5-8. En el documento JP 10-155493 A2 se describe una fosfolipasa A1 de *A. oryzae* (295 aa); a partir del documento WO 02/24881 es conocida una fosfolipasa A de la levadura *Zygosascus hellenicus* (407 aa) con un punto isoelectrico pl de aproximadamente 4,2, y en el documento JP 03151879 se describe una fosfolipasa bacteriana de *Pseudomonas* sp. con un peso molecular de aproximadamente 30 kDa. Además, en el documento EP 0 575 133 A2 (US 5,538,874, US 5,378,623, US 5,521,080) se describen fosfolipasas A1 de *Aspergillen* con un peso molecular de 30-40 kDa und un pl de 2,8-4,5, pero sin indicación de informaciones de secuencia. Además, estas solicitudes de patente no contienen referencias o estrategias para la obtención del correspondiente ADN mediante clonación.
- d) El grupo de fosfolipasas tipo A con un peso molecular de aproximadamente 60-100 kDa. A éstas pertenecen: fosfolipasas de *Hyphozyma*, un tipo de hongo similar a levadura, descrito en el documento WO 98/18912, y fosfolipasas de *Aspergillus niger*, según el documento WO 03/097825.

Además, el documento WO 2004/097012 describe „péptidos nucleares“ de fosfolipasas A2 conocidas, con una actividad de fosfolipasa elevada.

Los documentos WO 00/32758, WO 03/060112 y WO 2004/111216 describen métodos por medio de „ingeniería proteica“ de lipasas conocidas, por ejemplo de *Thermomyces lanuginosus* y otras fosfolipasas para llegar a variantes enzimáticas, que presentan una actividad de lipasa, o bien fosfolipasa modificada.

El documento WO 02/066622 describe nuevos genes con homología elevada a los genes de *Thermomyces lanuginosus*, así como su empleo para la recombinación genética para la generación de nuevos enzimas lipolíticos.

WRIGHT LESLEY C ET AL: "Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*.", BIOCHEMICAL JOURNAL 1 DEC 2004, tomo 384, Nr. Pt 2, 1 de Diciembre de 2004, páginas 377-384, XP002463390 describe la purificación de una lisofosfolipasa de *Cryptococcus gattii*, que es una glicoproteína de 66 kDa, y es baja a temperaturas elevadas. El documento EP 0 808 903 describe una lisofosfolipasa obtenida por vía recombinante a partir de *Aspergillus*, preferentemente *Aspergillus foetidus*, así como su empleo para la mejora del rendimiento de filtración de hidrolizados de almidón. FUJINO SHUJI ET AL: "Purification and characterization of phospholipase B from *Candida utilis*", BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY AND BIOCHEMISTRY, tomo 70, nº 2, Febrero de 2006 (2006-02), páginas 377-386, XP002463398 describe la purificación y caracterización de una fosfolipasa B de *Candida utilis*.

GHANNOUM MAHMOUD A: "Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis", CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, tomo 13, nº 1, Enero de 2000, páginas 122-143, XP002463391 describe aplicaciones de fosfolipasas fúngicas, en especial respecto a su virulencia.

LEIDICH STEVEN D ET AL: "Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, tomo 273, nº 40, 2 de Octubre de 1998, páginas 26078-26086, XP002463392 describe la clonación y expresión de una fosfolipasa B de *Candida albicans*.

HOOVER CHARLES I ET AL: "Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) gene", FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, tomo 167, nº 2, 15 de Octubre de 1998, páginas 163-169, XP002463393 describe interacciones enzima-substrato entre fosfolipasas de *Candida* y fosfolipasas de célula huésped.

Lisofosfolipasas se emplean en el proceso de obtención de sirope de glucosa y otros productos derivados del mismo para facilitar la separación de componentes no deseados (véase el documento EP 0 219 269 B1). Estos componentes se separan mediante un procedimiento de filtración, en el que solo se obtienen frecuentemente filtrados turbios. Mediante el empleo de lisofosfolipasas se puede influir positivamente tanto en la velocidad de filtración, como también en la claridad del filtrado. Debido a la alta viscosidad de los siropes (hidrolizado parcial de almidón, preferentemente hidrolizado parcial de almidón de trigo), éstos se deben mantener y elaborar adicionalmente a temperaturas elevadas. Esto requiere enzimas con una alta estabilidad térmica.

Por consiguiente, la presente invención toma como base la tarea de poner a disposición proteínas, o bien polipéptidos, con propiedades de lisofosfolipasa mejoradas. Las nuevas lisofosfolipasas deben presentar especialmente una proporción elevada de lisofosfolipasas respecto a actividad de fosfolipasa. Las proteínas con actividad de lisofosfolipasa deben poseer igualmente una alta estabilidad térmica.

Además, las proteínas con actividad de lisofosfolipasa de deben poder producir de manera sencilla, económica y rentable. Además, según la invención se deben poner a disposición segmentos de expresión que son apropiados para la producción de proteínas con actividad de lisofosfolipasa.

Las anteriores tareas se solucionan mediante una secuencia de ADN que codifica un polipéptido con actividad de lisofosfolipasa, caracterizada por que la secuencia de ADN es seleccionada a partir de a) secuencias de ADN que comprenden una secuencia de nucleótido según SEQ ID NO: 1, b) secuencias de ADN que comprenden la secuencia codificante según SEQ ID NO: 1, c) secuencias de ADN que codifican la secuencia de proteínas según SEQ ID NO: 2, d) secuencias de ADN que se codifican por el plásmido B6Sma35 con el mapa de restricción según la figura 4, y depositadas bajo el número de depósito DSM 18370, e) secuencias de ADN que son análogas a las secuencias a), b), c) o d) debido a la degenerabilidad del código genético, y f) hebras complementarias a las secuencias según a) a e), siendo derivada la secuencia de ADN preferentemente de *Aspergillus*, y de modo aún más preferente de *Aspergillus fumigatus*, y manteniendo el polipéptido con actividad de lisofosfolipasa una actividad de al menos un 80 % a una temperatura de 65°C, pH 5 en hidrolizado parcial de almidón de maíz, durante al menos 4 horas.

La invención se refiere además a un polipéptido con actividad de lisofosfolipasa, seleccionado a partir de

- a) un polipéptido que se codifica por la parte codificante de una secuencia de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 2,
- b) un polipéptido con una secuencia que presenta al menos un 89 % de identidad con los aminoácidos 16 a 611 de SEQ ID NO: 2, manteniendo el polipéptido con actividad de lisofosfolipasa una actividad de al menos un 80 % a una temperatura de 65°C, pH 5 en hidrolizado parcial de almidón de maíz, durante al menos 4 horas.

La invención se refiere además a segmentos de expresión, o bien hospedantes que son aptos para exprimir los polipéptidos con actividad de lisofosfolipasa según la invención. Además, la invención se refiere también a los correspondientes plásmidos de expresión y vectores. La invención se refiere además al empleo de polipéptidos según la invención para aplicaciones en el intervalo de la tecnología de productos alimenticios, en especial para la elaboración de productos de hidrólisis de almidón a partir de almidón de trigo.

Las secuencias de lisofosfolipasas citadas en el anterior estado de la técnica se excluyen del alcance de protección de la invención explícitamente. En especial se excluyen del alcance de protección de la invención las secuencias de proteínas con actividad de lisofosfolipasa, así como las correspondientes secuencias de ADN de los siguientes documentos: WO 01/27251, WO 2004/111216, WO 2004/097012, WO 03/060112, WO 02/24881, WO 00/28044, WO 00/32758, WO 03/097825, EP 999 73 065.8, así como solicitudes parciales pertinentes. La exclusión de secuencias se refiere a estos documentos en su totalidad, así como por separado y en cualquier combinación.

Sorprendentemente, ahora se descubrió que una secuencia de ADN, que codifica un polipéptido con actividad de lisofosfolipasa que posee un peso molecular elevado, una proporción elevada de actividad de lisofosfolipasa respecto a fosfolipasa, así como una estabilidad térmica elevada, se puede aislar a partir de una cepa de la especie *Aspergillus fumigatus*. En el caso de esta lisofosfolipasa se trata de una lisofosfolipasa ácida, procedente de un hongo, con un peso molecular de aproximadamente 64 a 78 kDa, que puede hidrolizar ácidos grasos de lisolecitina, posee una proporción elevada de actividad de lisofosfolipasa respecto a fosfolipasa y una estabilidad térmica elevada, y se puede aislar a partir de un organismo de la especie *Aspergillus*.

En este caso se debe entender por estabilidad térmica elevada que el enzima mantenga una actividad de al menos un 80 % a una temperatura de 65°C, pH 5 en hidrolizado parcial de almidón de trigo, durante al menos 4 horas.

La estabilidad térmica elevada de las lisofosfolipasas según la invención era sorprendente, al igual que la proporción elevada de actividad de lisofosfolipasa respecto a fosfolipasa, y no evidente en base a las lisofosfolipasas descritas en el estado de la técnica. En ninguna de las lisofosfolipasas que se presentan naturalmente, descritas en el estado de la técnica, se describen ni se sugieren estas propiedades.

Ya que no hay ninguna publicación respecto a lisofosfolipasas termoestables a partir de hongos filamentosos, y con ello tampoco ningún punto de referencia sobre qué elementos estructurales (hélices, hojas plegadas β , bucles) se deben configurar especialmente en una lisofosfolipasa (presencia de interacciones iónicas a través de aminoácidos cargados, puentes disulfuro, interacciones de Van-der-Waals, interacciones hidrófobas), para garantizar una estabilidad térmica elevada, no era previsible que la lisofosfolipasa hallada poseyera estas propiedades. Del mismo modo, no es conocido suficientemente donde y como se deben llevar a cabo modificaciones en un polipéptido lipolítico para obtener una proporción elevada de actividad de lisofosfolipasa respecto a fosfolipasa. Los genes de la familia de las lipasas en el más amplio sentido, a las que pertenecen también las fosfolipasas y lisofosfolipasas, muestran que modificaciones reducidas en la secuencia pueden influir en gran medida sobre las propiedades del enzima codificado por este enzima. Esto se muestra, por ejemplo, en la solicitud WO 03/060112. Esta solicitud describe un procedimiento para la producción de variantes de enzimas lipolíticas. En este caso se consiguieron las modificaciones en la especificidad de sustrato a través de mutagénesis aleatoria, no a través de mutaciones específicas, orientadas. Esta solicitud muestra también que, a pesar de la homología elevada en la secuencia, no se puede predecir la propiedad del enzima codificado por la misma. Esta deficiente correlación entre secuencia de ADN y enzima codificado, así como las diferencias en el empleo de codón a través de las cepas aisladas, no permiten una derivación de cebadores a partir de secuencias conocidas para hallar nuevas secuencias con propiedades selectivas, como estabilidad térmica elevada, actividad de lipasa reducida, proporción elevada de actividad de fosfolipasa respecto a lisofosfolipasa, y viceversa. Además, mediante la homología elevada entre fosfolipasas y lisofosfolipasas no ha sido previsible que con la carga seleccionada se aisle una lisofosfolipasa con las citadas propiedades. Las posibles regiones para cargas de cebadores muestran partes de secuencias cortas de 2 a 3 aminoácidos conservados, con interrupciones debidas a aminoácidos variables, en el plano de aminoácidos. En los aminoácidos variables no existe una tendencia sobre qué aminoácidos se pueden encontrar preferentemente en fosfolipasas y qué aminoácidos se pueden encontrar preferentemente en lisofosfolipasas. Por lo tanto, junto con el empleo de codón específico de la cepa, en el plano de ADN no se muestran regiones de consenso, que se pueden emplear para un aislamiento selectivo de lisofosfolipasas. Por lo tanto, las regiones de ADN seleccionadas para el cebador tampoco son previsibles a partir de la parte de enzima en la que están localizados los aminoácidos específicos, codificantes para las citadas propiedades. Las cargas de cebador seleccionadas no coincidían con lisofosfolipasas conocidas. Por lo tanto, es tanto más sorprendente que el polipéptido hallado presente una proporción elevada de actividad de lisofosfolipasa respecto a fosfolipasa.

La secuencia de lisofosfolipasa conforme a la invención, según SEQ ID NO: 1, se comparó con secuencias de lisofosfolipasa del estado de la técnica. La secuencia SEQ ID NO: 1 muestra la máxima identidad de un 88 % con la secuencia PLB3 de *Aspergillus fumigatus* CBS 14489 (Shen et al., FEMS Microbiol. Letters 2004, 239 (1): 87-93). También se halló una coincidencia elevada en el plano de la secuencia de aminoácidos en la secuencia 13 de la secuencia de aminoácidos de *Aspergillus niger* (68%), conocida por el documento WO 03/097825, así como del LPL 1 de *Aspergillus oryzae*, WO 01/027251 (73%). El enzima según la invención se distingue además por una proporción elevada de actividad de lisofosfolipasa respecto a fosfolipasa, en contrapartida a los enzimas descritos en el estado de la técnica.

Por consiguiente, la invención se refiere también a polipéptidos con actividad de lisofosfolipasa con una secuencia que posee al menos un 89 % de identidad con la secuencia según SEQ ID NO: 1. La invención se refiere preferentemente a un polipéptido con actividad de lisofosfolipasa con una secuencia que posee al menos un 89 % de identidad con los aminoácidos 16 a 611 de SEQ ID NO: 2. El grado de intensidad asciende preferentemente al menos a un 90 %, de modo más preferente al menos un 93 %, de modo aún más preferente al menos un 95 %, y de modo especialmente preferente al menos un 98 %, con la condición de que las respectivas secuencias presenten actividad de lisofosfolipasa.

En este caso, el grado de identidad secuencial se determina preferentemente de modo que se calcula el número de restos de la secuencia más corta que participa en la comparación y posee una „correspondiente“ contrario en la otra secuencia. En este caso, la identidad se determina preferentemente de modo habitual bajo empleo de algoritmos habituales para los fines de la presente invención. Según la invención, como comparación se recurre solo a los cADNs, o bien aminoácidos de la respectiva proteína madura. Según la invención se determinan como secuencias homólogas contrarios secuenciales similares, preferentemente idénticos, con ayuda de programas informáticos conocidos. Un ejemplo de tal programa es el programa Clone Manager Suite, que contiene la parte de programa Align Plus, y es distribuido por Scientific & Educational Software, Durham, NC, USA. En este caso se lleva a cabo una comparación de dos secuencias de ADN, o bien aminoácidos, como se definen anteriormente, bajo la opción de alineamiento lineal según el método FastScan – MaxScore, o bien según el método de Needleman-Wunsch, bajo mantenimiento de los valores por defecto. Según la invención, para el cálculo de la identidad se aplicó especialmente la versión de programa "Clone Manager 7 Align Plus 5" con las funciones "Compare Two Sequences/Local Fast Scan-Max Score/Compare DNA sequences", o bien para aminoácidos "Compare Two Sequences/Global/Compare sequences as Amino Acids". En este caso se emplearon los algoritmos accesibles a partir de las siguientes fuentes: Hirschberg, D.S. 1975. A linear space algorithm for computing longest common subsequences. Commun Assoc Comput Mach 18:341-343; Myers, E.W. and W. Miller. 1988. Optimal alignments in linear space. CABIOS 4:1, 11-17; Chao, K-M, W.R. Pearson and W. Miller. 1992. Aligning two sequences within a specified diagonal band. CABIOS 8:5, 481-487.

La invención se refiere además a moléculas de adición y/o deleción de los anteriores polipéptidos con actividad de lisofosfolipasa. De este modo, un polipéptido con actividad de lisofosfolipasa modificado según la invención se puede prolongar mediante adición de otras sustancias en el extremo N-terminal y/o C-terminal, debiendo presentar aún actividad de lisofosfolipasa las secuencias de aminoácido obtenidas de este modo. De este modo se pueden obtener moléculas híbridas que poseen otras propiedades ventajosas. A modo de ejemplo se pueden añadir proteínas de suspensión, o bien sus formas precursoras nativas, en proteínas secretadas en medida elevada, mediante lo cual se mejora adicionalmente la eficiencia de secreción. Además se pueden añadir otras secciones secuenciales activas de otros enzimas para obtener enzimas con especificidad múltiple. Además se pueden añadir secuencias polares o apolares para influir de modo selectivo sobre las propiedades de solubilidad, o bien la accesibilidad por membrana del enzima obtenido de este modo.

Según la invención, también se pueden someter a deleción secciones secuenciales de polipéptido con actividad de lisofosfolipasa bajo mantenimiento de la actividad de lisofosfolipasa. Las mutaciones, elongaciones y acortamientos se pueden llevar a cabo de modo conocido en sí según procedimientos convenientemente conocidos en el campo especializado. Polipéptidos acortados se distinguen frecuentemente por una altura de secreción mejorada en comparación con los polipéptidos de longitud completa. Éstos pueden contener también estabilidades térmicas más elevadas en comparación con el polipéptido de longitud completa, ya que éstos contienen solo el „núcleo comprimido“.

La producción de tales variantes es conocida generalmente en el campo especializado. A modo de ejemplo, se pueden obtener variantes secuenciales de aminoácido de polipéptidos mediante mutación en el ADN. Los procedimientos para la mutagénesis y modificación de la secuencia de nucleótidos son convenientemente conocidos en el campo especializado (véase, a modo de ejemplo, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488 (1985), Kunkel et al., Methods in Enzymol., 154:367 (1987), patente US nº 4,873,192, Walker y Gaastra, eds., Techniques in Molecular Biology, Mac Millan Publishing Company, New York (1983)). Se encuentran referencias sobre sustituciones de aminoácidos apropiadas, que no reducen la actividad biológica de la proteína de interés, en el modelo de Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C. (1978). Son preferentes sustituciones conservadoras, como el reemplazo de un aminoácido por otro con propiedades similares. Estas sustituciones se pueden dividir en 2 grupos principales, junto con 4 grupos subordinados, y se considera

substitución conservadora una substitución en cualquier grupo subordinado que no influya preferentemente sobre la actividad o el plegamiento de la proteína.

Alifáticas	No polares	G A P
		I L V
	No polares y no cargadas	C S T M N Q
	Polares y cargadas	D E
K R		
Aromáticas		H F W Y

5 Las expresiones „proteína“, „péptido“ y „polipéptido“ se pueden emplear esencialmente de forma intercambiable. Un polipéptido o enzima con actividad de fosfolipasa o una fosfolipasa debe designar un enzima que cataliza la liberación de ácidos grasos a partir de fosfolípidos, por ejemplo lecitinas. La actividad de fosfolipasa se puede determinar bajo empleo de cualquier ensayo conocido en sí, en el que se emplee uno de estos substratos.

10 Un polipéptido o enzima con actividad de lisofosfolipasa o una lisofosfolipasa debe designar un enzima que cataliza la liberación de ácido graso a partir de lisofosfolípidos, por ejemplo lisolecitinas. La actividad de lisofosfolipasa se puede determinar bajo empleo de cualquier ensayo conocido en sí, en el que se emplee uno de estos substratos.

En relación con los polipéptidos según la invención, la expresión „fosfolipasa“, o bien fosfolipasa A, debe designar tanto enzimas con actividad de fosfolipasa A1, como también con actividad de fosfolipasa A2. En este caso, A1, o bien A2, se definen como EC 3.1.1.2, o bien 3.1.1.4, según la clasificación estándar de enzimas EC.

Fosfolipasas B o lisofosfolipasas son polipéptidos EC 3.1.1.5. según la clasificación estándar de enzimas EC.

15 Además se describen secuencias de ADN que codifican un polipéptido con actividad de lisofosfolipasa, que comprenden mutaciones, modificaciones, o bien variaciones de la secuencia según SEQ ID NO: 1. También se describen secuencias que hibridan con las anteriores secuencias bajo condiciones relajadas o restrictivas. Como condiciones restrictivas son válidas: hibridación a 65°C, 18 h en disolución de sulfato de dextrano (Geneescreen Plus, DuPont), a continuación lavado del filtro respectivamente 30 minutos en primer lugar con 6 x SSC, dos veces 2 x SSC, dos veces 2 x SSC, 0,1 % SDS, y a continuación con 0,2 x SSC a 65°C (Membrane transfer and detection methods, Amersham).

25 Además, la invención se refiere también a secuencias de ADN que, debido a la degenerabilidad del código genético, son análogas a las secuencias anteriores según la invención, así como a variantes alélicas de las mismas. En este caso, la degenerabilidad del código genético puede resultar de una degenerabilidad natural, o de un empleo de codón seleccionado especialmente. Variantes alélicas presentes naturalmente se pueden identificar bajo empleo de técnicas de biología molecular convenientemente conocidas, como por ejemplo la reacción en cadenas de polimerasa (PCR) y técnicas de hibridación.

30 La invención se refiere además a un procedimiento para la obtención de un polipéptido con actividad de lisofosfolipasa según técnicas recombinantes que comprenden el cultivo de células hospedantes recombinantes procariotas y/o eucariotas, que contienen una secuencia de ADN según la invención, bajo condiciones que favorecen la expresión del enzima, así como la siguiente obtención del enzima. La invención se refiere además al empleo de las secuencias de polinucleótido según la invención para la obtención de sondas para hallar secuencias similares que codifican enzimas correspondientes en otros organismos, así como para la transformación de células hospedantes.

35 Una secuencia de ADN que codifica un polipéptido según la invención se puede emplear para transformar cualquier célula hospedante, como por ejemplo células de hongos, levaduras, bacterias, plantas o mamíferos. Células transformadas de tal modo se distinguen por una secreción de las lisofosfolipasas según la invención. El enzima de lisofosfolipasa producido de este modo ocasiona una hidrólisis eficiente de ácidos grasos a partir de lisofosfolípidos.

La invención se refiere también a cassettes de expresión que se emplean para la inclusión de una secuencia de ADN que codifica lisofosfolipasas según la invención, o bien de una ventana de lectura abierta, en una célula hospedante. Estos comprenden preferentemente una región iniciadora de transcripción, a la que está enlazado el marco de lectura abierto. Tal cassette de expresión puede contener una pluralidad de puntos de disociación de restricción para la inserción del marco de lectura abierto y/u otros ADNs, por ejemplo de una región reguladora de transcripción y/o genes marcadores seleccionables. En el sentido de transcripción 5' → 3', La cassette de transcripción comprende una región de transcripción y una región de traslación, la secuencia de ADN de interés, y una región de detención de transcripción y traslación, que es funcional en una célula microbiana. La región de terminación puede ser nativa respecto a la región de iniciación de transcripción, puede ser nativa respecto a la secuencia de ADN de interés, o puede ser derivada de cualquier otra fuente.

La expresión „marco de lectura abierto“ (ORF) designa la secuencia de aminoácido que codifica entre el codón de iniciación y detención de traslación de una secuencia codificante. Las expresiones „codón de iniciación“ y „codón de detención“ designan una unidad constituida por tres nucleótidos adyacentes (codones) en una secuencia codificante, que especifican el inicio y el final de la cadena de síntesis proteica (traslación de mRNA).

En relación con un ácido nucleico, „enlace funcional“ designa una unión como parte de la misma molécula de ácido nucleico en posición y orientación apropiada respecto al inicio de transcripción del promotor. ADN en enlace funcional en un promotor se encuentra bajo la regulación de iniciación de la transcripción del promotor. Las secuencias codificantes pueden estar enlazadas funcionalmente a la secuencia reguladora en orientación sentido o antisentido. En relación con polipéptidos, enlace funcional significa la unión como parte del mismo polipéptido, es decir, a través de enlaces peptídicos.

Según la invención se puede emplear cualquier promotor. Promotor designa la secuencia de nucleótidos habitualmente en línea de entrada (5') respecto a la secuencia codificante, y controla la expresión de la secuencia codificante poniéndose a disposición la identificación para la ARN-polimerasa y otros factores que son necesarios para la transcripción correcta. El promotor empleado según la invención puede comprender un promotor mínimo, es decir, una secuencia corta de ADN de una TATA-Box, y otras secuencias que especifican el punto de inicio de transcripción, a las que se han añadido los elementos reguladores para el control de la expresión.

El promotor empleado según la invención puede comprender también una secuencia de nucleótidos, que comprende un promotor mínimo y elementos reguladores, que pueden controlar la expresión de una secuencia codificante o ARN funcional. Este tipo de secuencia promotora está constituida por elementos proximales y distales dispuestos en línea de entrada, denominándose frecuentemente potenciadores los elementos citados en último lugar. Consecuentemente, un potenciador es una secuencia de ADN que puede estimular la actividad del promotor, y puede ser un elemento interno del promotor o un elemento heterólogo insertado, para reforzar la altura de expresión o la especificidad con tejidos de un promotor. Puede funcionar en ambas orientaciones, y ser eficaz incluso en el caso de ubicación en línea de entrada o línea de salida del promotor. Tanto el potenciador, como también otros elementos promotores situados en línea de entrada, unen proteínas que enlazan ADN de manera específica a la secuencia, que transmiten sus efectos. Los promotores en su totalidad pueden ser derivados de un gen nativo, o pueden estar compuestos por diversos elementos que son derivados de diferentes promotores presentes naturalmente, o pueden estar compuestos incluso por segmentos de ADN sintéticos. Un promotor puede contener también secuencias de ADN, que participan en la unión de factores proteicos, que controlan la eficiencia de la iniciación de transcripción como respuesta a condiciones fisiológicas o debidas al desarrollo.

Elementos promotores, en especial elementos TATA, que son inactivos o poseen una actividad de promotor fuertemente reducida en ausencia de una activación de línea de entrada, se denominan promotores mínimos o promotores nucleares. En presencia de un factor de transcripción apropiado, o bien factores de transcripción apropiados, la función del promotor mínimo consiste en hacer posible la transcripción. Por consiguiente, un promotor mínimo o nuclear está constituido solo por todos los elementos básicos que son necesarios para la iniciación de la transcripción, por ejemplo una TATA-box y/o un iniciador.

La invención se refiere también a segmentos vectoriales que contienen secuencias de ADN según la invención. Estos segmentos vectoriales comprenden cualquier plásmido, cósmido, fagos, y otros vectores en forma de hebra doble o hebra simple, lineales o circulares, que, en caso dado, incluso se pueden transmitir o movilizar, y pueden transformar un organismo hospedante procarionta o eucariota mediante integración en el genoma celular, o se presentan en forma extracromosómica (por ejemplo plásmidos de replicación autónoma con un origen de replicación).

Vectores, plásmidos, cósmidos, cromosomas de levadura artificiales (YACs), cromosomas bacterianos artificiales (BACs) y segmentos de ADN para empleo para la transformación de células comprenden generalmente el ADN que codifica la fosfolipasa según la invención, así como otro ADN, como cADN, un gen o genes que se pueden incluir en las células. Estos segmentos de ADN pueden comprender otras estructuras, como promotores, potenciadores, poliengarces o también genes reguladores, en tanto sea necesario. Uno de los segmentos de ADN o genes, que se

seleccionó, o bien se seleccionaron para la inclusión celular, codifica/n convenientemente una proteína que se expresa en las células (recombinantes) transformadas obtenidas de este modo, lo que conduce a una característica rastreada o seleccionable y/o concede un fenotipo mejorado a las células transformadas.

5 La construcción de vectores que se pueden emplear según la invención es conocida por un especialista en el campo relativo a la manifestación anterior y al conocimiento técnico general (véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y. (1989)).

10 Un cassette de expresión según la invención puede contener uno o varios puntos de corte de restricción, para situar el polinucleótido que codifica la lisofosfolipasa bajo la regulación de una secuencia reguladora. El cassette de expresión puede contener también una señal de terminación en enlace funcional con el polinucleótido, así como secuencias reguladoras que se requieren para la traducción apropiada del polinucleótido. El cassette de expresión que contiene el polinucleótido según la invención puede ser quimérico, es decir, al menos uno de sus componentes es heterólogo respecto a al menos uno de los otros componentes. La expresión del polinucleótido en el cassette de expresión puede estar bajo el control de un promotor constitutivo, un promotor inducible, un promotor regulado, un promotor viral, o un promotor sintético.

15 Los vectores pueden contener ya elementos reguladores, por ejemplo promotores, o las secuencias de ADN según la invención se pueden manipular de modo que contengan tales elementos. Elementos promotores apropiados, que se pueden emplear, son conocidos en el campo técnico y son, a modo de ejemplo para *Trichoderma reesei*, el promotor *cbh1* o el promotor *cbh2*, para *Aspergillus oryzae*, el promotor *amy*, para *Aspergillus niger*, el promotor *xyl*, *glaA*, *alcA*, *aphA*, *tpiA*, *gpdA*, *sucl* y el promotor *pkiA*. Elementos promotores apropiados, que se pueden emplear para la expresión en levaduras, son conocidos en el campo técnico y son, a modo de ejemplo, el promotor *pho5* o el promotor *gap* para la expresión en *Saccharomyces cerevisiae* y para *Pichia pastoris*, por ejemplo, el promotor *aox1* o el promotor *fmd*, o el promotor *mox* para *H. Polymorpha*.

25 El ADN que es apropiado para la inclusión en células puede comprender, además de ADN según la invención, también ADN que se obtuvo a partir de cualquier fuente, o se aisló a partir de la misma. Un ejemplo de un ADN derivado es una secuencia de ADN que se identificó como fragmento útil en un organismo dado, y que se sintetizó entonces por vía química en forma sensiblemente pura. Un ejemplo de tal ADN es una secuencia de ADN apropiada, que se obtuvo, a modo de ejemplo, bajo empleo de endonucleasas de restricción, de modo que se puede manipular adicionalmente, a modo de ejemplo amplificar, según la invención. Entre estos cuenta, entre otros, el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans* empleable como gen marcador, y sus secuencias reguladoras, así como poliengarces.

30 Tal ADN se denomina habitualmente ADN recombinante. Por lo tanto, un ADN apropiado comprende ADN completamente sintético, ADN semisintético, ADN aislado a partir de fuentes biológicas y ADN derivado de ARN incluido. En general, el ADN incluido no es un componente original del genotipo de ADN receptor, pero, según la invención, también se puede aislar un gen a partir de un genotipo dado, y eventualmente modificar el mismo, y a continuación se pueden incluir copias múltiples del gen en el mismo genotipo, por ejemplo para reforzar la producción de un producto génico dado.

El ADN incluido comprende sin limitación ADN de genes, como por ejemplo de bacterias, levaduras, hongos o virus. El ADN incluido puede comprender genes modificados o sintéticos, partes de genes o genes quiméricos, incluyendo genes del mismo o de diferente genotipo. A tal efecto, por ejemplo también el ADN puede pertenecer a los plásmidos *pUC18*, *pCU19*.

40 El ADN empleado para la transformación según la invención puede ser circular o lineal, de hebra doble o de hebra simple. El ADN se presenta en general en forma de un ADN quimérico, como un ADN plasmídico, que contiene también regiones codificantes, que están flanqueadas por secuencias reguladoras, y favorecen la expresión de ADN recombinante presente en la célula transformada. A modo de ejemplo, el propio ADN puede contener o estar constituido por un promotor, que es activo en una célula que es derivada de una fuente que se diferencia de la célula, o se puede emplear un promotor que está presente ya en la célula, es decir, la célula objetivo de transformación.

En general, el ADN incluido es relativamente reducido, menos de aproximadamente 30 kb, para minimizar la sensibilidad frente a degradación física, química o enzimática, que aumenta con el tamaño del ADN.

50 La selección de un vector de expresión apropiado depende de las células hospedantes. Vectores de expresión de levaduras u hongos pueden comprender un origen de replicación, un promotor y un engarce apropiado, y también cualquier punto de enlace ribosómico apropiado, puntos de poliadenilación, puntos donadores y aceptores de unión, secuencias de terminación de transcripción y secuencias no transcritas 5'-flanqueantes. Son ejemplos de células hospedantes apropiadas: células fúngicas de la especie *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Mucor*, *Penicillium*, etc., como por ejemplo levaduras de las especies *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Trichosporon*, *Schwanniomyces*, *Hansenula*, *Pichia* y similares. Sistemas

hospedantes apropiados son, a modo de ejemplo, hongos como *Aspergilli*, por ejemplo *Aspergillus niger* (ATCC 9142) o *Aspergillus ficuum* (NRL 3135) o *Trichoderma* (por ejemplo *Trichoderma reesei* QM6a) y levaduras, como *Saccharomyces*, por ejemplo *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia*, como por ejemplo *Pichia pastoris* o *Hansenula*, por ejemplo *H. polymorpha* (DSMZ 70277). Tales microorganismos se pueden obtener en puntos de depósito reconocidos, por ejemplo American Type Culture Collection (ATCC), Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) oder Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), o cualquier otro punto de depósito.

Un cassette de expresión puede contener en el sentido de transcripción 5'-3' una región de iniciación de transcripción y translación del polinucleótido según la invención, y una región de transcripción y terminación que es funcional in vivo o in vitro. La región de terminación puede ser nativa respecto a la región de iniciación de transcripción, o puede ser nativa o de otro origen respecto al polinucleótido. Las secuencias reguladoras pueden estar localizadas en línea de entrada (secuencias no codificantes 5'), en el interior (intron) o en línea de salida (secuencias no codificantes 3') de una secuencia codificante, e influir sobre la transcripción, el procesado de ARN o la estabilidad y/o la traducción de la secuencia codificante asociada. Las secuencias reguladoras pueden comprender sin limitación engarces, promotores, puntos de enlace de represor, secuencias conductoras de traducción, intrones o secuencias de señal de poliadenilación. Estas pueden comprender secuencias naturales y sintéticas, así como secuencias que son una combinación de secuencias naturales y sintéticas.

El vector empleado según la invención puede comprender también secuencias apropiadas para la amplificación de la expresión.

Son ejemplos de promotores, que se pueden emplear según la invención, promotores de los que se sabe que controlan la expresión en las células eucariotas. Se puede emplear cualquier promotor con la capacidad de expresión en hongos filamentosos. Son ejemplos un promotor que se induce en gran medida por almidón o celulosa, por ejemplo un promotor para glucoamilasa o α -amilasa de la especie *Aspergillus* o celulasa (celobiohidrolasa) de la especie *Trichoderma*, un promotor para enzimas en la vía metabólica glicolítica, como por ejemplo fosfogliceratoquinasa (PGK) y 3-fosfato-dehidrogenasa de gliceraldehído (GPD), etc. Es preferente el promotor de celobiohidrolasa-I, de celobiohidrolasa-II, de amilasa, de glucoamilasa, de xilanaso o de enolasa.

Adicionalmente al empleo de un promotor especial, otros tipos de elementos pueden influir sobre la expresión de transgenes. En especial se mostró que los intrones poseen el potencial para el refuerzo de la expresión transgénica.

El cassette de expresión puede comprender aún otros elementos, a modo de ejemplo aquellos que se pueden regular mediante elementos endógenos o exógenos, como proteínas Zink finger, incluyendo proteínas Zink finger presentes naturalmente, o proteínas Zink finger quiméricas.

El cassette de expresión empleado según la invención puede contener además elementos de engarce o elementos promotores en línea de entrada.

Vectores para empleo según la invención se pueden construir de modo que contengan un elemento de engarce. Por consiguiente, los segmentos según la invención comprenden el gen de interés junto con una secuencia de 3'-ADN, que actúa como señal, para terminar la transcripción, y permiten la poliadenilación del mRNA obtenido de este modo. Se puede emplear cualquier secuencia de señal que posibilite la secreción a partir del organismo hospedante seleccionado. Una secuencia de señal preferente es la secuencia de señal de lisofosfolipasa de *Aspergillus fumigatus* o secuencias de señal derivadas de la misma para la secreción de hongos filamentosos.

También se puede emplear una secuencia conductora especial, ya que la secuencia de ADN entre el punto de iniciación de transcripción y el inicio de la secuencia codificante, es decir la secuencia conductora no traducida, puede influir sobre la expresión génica. Secuencias conductoras preferentes comprenden secuencias que controlan la expresión óptima del gen adherido, es decir, comprenden una secuencia conductora de consenso preferente, que aumenta o mantiene la estabilidad del mRNA, e impide una iniciación de traducción inapropiada. La selección de tales secuencias es convenientemente conocida por un especialista en este campo.

Para mejorar la posibilidad de identificación de los transformantes, se puede alojar un gen marcador seleccionable o rastreable en el cassette de expresión. Tales genes marcadores son convenientemente conocidos por un especialista en este campo.

El cassette de expresión o un segmento vectorial, que contiene la cassette de expresión, se introduce en una célula hospedante. Una pluralidad de técnicas se encuentran disponibles y son convenientemente conocidas para un especialista en el campo de la inclusión de segmentos en una célula hospedante. La transformación de células microbianas se puede llevar a cabo bajo empleo de polietilenglicol, cloruro de calcio, infección viral, dextrano DEAE, infecciones por fagos, electroporación y otros métodos conocidos en el campo técnico. La transformación de hongos se puede llevar a cabo según Penttilä et al., Gene 61: 155-164, 1987. La inclusión de un vector recombinante en

levaduras se puede llevar a cabo según procedimientos conocidos, incluyendo electroporación, empleo de esferoplastos, acetato de litio y similares.

5 Tan pronto se ha obtenido el cassette de expresión, o bien la secuencia de ADN según la invención, se puede insertar en vectores de modo conocido en sí para sobreexpresar el polipéptido codificado en sistemas hospedantes apropiados. No obstante, también se pueden emplear secuencias de ADN como tales para transformar sistemas hospedantes apropiados de la invención, para conseguir una sobreexpresión del polipéptido codificado.

10 Tan pronto se extrimió una secuencia de ADN según la invención en una célula hospedante apropiada en un medio apropiado, la lisofosfolipasa codificada se puede concentrar y/o aislar a partir del medio, si la lisofosfolipasa se segrega en el medio, o a partir del organismo hospedante, si la lisofosfolipasa está presente intracelularmente, por ejemplo en el espacio periplasmático, según procedimientos conocidos en sí. Procedimientos conocidos para la separación de componentes insolubles del medio de cultivo y la biomasa, seguidos de procedimientos para la concentración de lisofosfolipasa, se pueden aplicar para la obtención de disoluciones concentradas de lisofosfolipasa, o como preparación para el secado de lisofosfolipasa. A modo de ejemplo, se pueden emplear procedimientos de filtración o procedimientos de centrifugación para la separación de componentes insolubles, seguidos de procedimientos de ultrafiltración para la concentración, o se aplican procedimientos de filtración de flujo cruzado. El secado se puede efectuar mediante liofilizado y secado por pulverización, procedimientos de granulación, extrusión, u otros procedimientos. Se pueden emplear procedimientos conocidos de purificación de proteínas para aislar las lisofosfolipasas según la invención. A modo de ejemplo se pueden emplear diversos procedimientos cromatográficos o cromatográficos en gel, por separado o en combinación. En dependencia de la célula hospedante empleada en un procedimiento de producción recombinante, el enzima según la invención puede estar modificado no mediante glicosilación por vía covalente. En células eucariotas, la glicosilación de las proteínas segregadas sirve para modular el plegamiento de proteínas, la estabilidad de conformación, la estabilidad térmica y la resistencia frente a proteólisis. Respecto a una aplicación específica de lisofosfolipasas, una variante glicosilada del enzima puede ser preferente frente a una variante no glicosilada.

25 La invención se refiere también a composiciones de ácidos nucleicos o proteínas aisladas, o esencialmente purificadas. En este caso, un polinucleótido/polipéptido aislado y purificado, o bien un segmento del mismo, designa un polinucleótido, o bien polipéptido, o bien segmento del mismo, que se presenta aislado a partir de su entorno nativo y en forma purificada para empleo adicional. Un segmento de ácido polinucleico o polipéptido aislado se puede presentar en forma purificada, o se puede presentar en un entorno no nativo, como por ejemplo en una célula hospedante transgénica. A modo de ejemplo, un segmento de polinucleótido aislado o purificado, o una proteína o una parte de la misma con actividad biológica, puede estar sensiblemente exento de material celular o medio de cultivo adicional en la producción según técnicas recombinantes, o esencialmente exento de precursores químicos u otros compuestos químicos. Un polinucleótido aislado está preferentemente exento de secuencias (preferentemente secuencias que codifican proteínas) que flanquean naturalmente el ácido nucleico (es decir, secuencias que están localizadas en los extremos 5' y 3' del ácido nucleico) en el ADN genómico del organismo del que procede el ácido nucleico. A modo de ejemplo, según diversas formas de ejecución, la molécula de ácido nucleico aislada puede contener menos de aproximadamente 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb o 0,1 kb secuencias de nucleótido, que flanquean naturalmente la molécula de ácido nucleico en el ADN genómico de la célula de la que se deriva el ácido nucleico. Una proteína, que está sensiblemente exenta de material celular, comprende composiciones de proteína o polipéptido con menos de aproximadamente un 70 %, un 50 %, un 30 %, un 20 %, un 10 %, un 5 % (referido al peso anhidro) de proteína impurificada. Si la proteína según la invención, o un fragmento de la misma con actividad biológica, se producen por vía recombinante, el medio de cultivo comprende de modo preferente menos de aproximadamente un 70 %, un 50 %, un 30 %, un 20 %, un 10 % o un 5 % (referido al peso anhidro) de precursor químico o sustancias químicas de tipo no proteico.

45 La invención se refiere también a composiciones de lisofosfolipasa que contienen el polipéptido según la invención. En general, las composiciones de lisofosfolipasa son líquidas o anhidras. Las composiciones líquidas contienen el enzima de lisofosfolipasa preferentemente en una forma purificada o concentrada. No obstante, también se pueden añadir sustancias auxiliares, como por ejemplo un estabilizador y/o glicerina, sorbita o monopropilenglicol, aditivos, como sales, azúcares, sustancias conservantes, agentes para el ajuste del valor de pH y proteínas. Las composiciones líquidas típicas son suspensiones acuosas u oleaginosas.

55 Las composiciones anhidras pueden ser composiciones liofilizadas, secadas por pulverización, granuladas o extrusionadas, que pueden contener exclusivamente el enzima. Las composiciones anhidras pueden ser granulados, que se pueden mezclar fácilmente con otros componentes. El tamaño de partícula del granulado enzimático es compatible preferentemente con el de los demás componentes de la mezcla. Esto posibilita medios seguros y convenientes para incorporar enzimas, a modo de ejemplo, en productos compuestos.

De modo similar se puede reunir un aditivo de productos alimenticios nutriente según esta forma de ejecución de la presente invención con otros componentes de productos alimenticios, mediante lo cual se generan productos alimenticios elaborados. Tales componentes alimenticios diferentes comprenden uno o varios suplementos enzimáticos, vitaminas, minerales y oligoelementos. El complemento alimenticio combinado obtenido de este modo

se puede mezclar entonces en un medio apropiado con otros componentes de productos alimenticios, como cereales y proteínas vegetales, para dar un producto alimenticio mejorado. La elaboración de estos componentes para dar un producto alimenticio elaborado se puede llevar a cabo en dispositivos de elaboración conocidos en sí.

5 En una forma de ejecución preferente, las composiciones de lisofosfolipasa según la invención comprenden adicionalmente una cantidad eficaz de uno o varios enzimas para productos alimenticios o piensos, o para la aplicación en precursores para la obtención de productos alimenticios o piensos, preferentemente seleccionados a partir de alfa-galactosidasas, beta-galactosidasas, lacasas, otros fosfolipanos, fosfatasa, endoglucanasas, en especial endo-beta-1,4-glucanasas, endo-beta-1,3(4)-glucanasas, endo-1,2-beta-glucanasas y endo-1,3-alfa-glucanasas, celulasas, xilosidasas, galactanasas, en especial A-rabinogalactan-endo-1,4-beta-galactosidasas y arabinogalactan-endo-1,3-beta-galactosidasas, enzimas que degradan pectina, en especial pectinasas, pectinesterasas, pectinilinasas, poligalacturonasas, arabananasas, ramnogalacturonasas, ramnogalacturonanacetilesterasas, ramnogalactoronan-alfa-ramnosidasas, pectatoliasas y alfa-garacturonidasas, mananasas, beta-manosidasas, mananoacetilesterasas, xilanacetilesterasas, proteasas, xilanasas, arabinoxilanasas, enzimas lipolíticos, como lipasas, digalactósido-diglicérido esterases y cutinasas, y otros enzimas, como lacasas y transglutaminasas.

Las lisofosfolipasas según la invención se pueden emplear para una pluralidad de aplicaciones. Son ejemplos a tal efecto aplicaciones en la elaboración de hidrolizados de almidón de trigo, o como catalizadores para la transesterificación en lisofosfolípidos.

20 Las lisofosfolipasas según la invención se pueden emplear también en la preparación de masas de pan o pasteles, por ejemplo para mejorar la elasticidad del pan o del pastel. La lisofosfolipasa se puede añadir a tal efecto a la masa durante la obtención, seguido de los pasos amasado, moldeado de la masa y horneado.

La lisofosfolipasa se puede emplear también junto con fosfolipasas para el desgomado de aceite, por ejemplo en un procedimiento como se describe en la patente EP 0 513 709 B2 (Röhm GbmH/Metallgesellschaft AG, ahora AB Enzymes GmbH/mg technologies ag).

25 El gen para la lisofosfolipasa aislado a partir del microorganismo *Aspergillus fumigatus* se depositó en el plásmido B6Sma35 bajo el número de depósito 18370 el 14-06-2006 en la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig según las condiciones del contrato de Budapest.

La invención se explica más detalladamente por medio de las figuras adjuntas. Muestran:

30 la figura 1: la secuencia de nucleótidos del gen de lisofosfolipasa cromosómico de la cepa *Aspergillus fumigatus* RH3949 (SEQ ID NO: 1),

la figura 2: la secuencia de aminoácidos del gen de lisofosfolipasa de la cepa *Aspergillus fumigatus* RH3949 (SEQ ID NO: 2),

35 la figura 3: la secuencia de nucleótidos y la secuencia de aminoácidos, derivada de la misma, del gen de lisofosfolipasa cromosómico de la cepa *Aspergillus fumigatus* RH3949 (SEQ ID NOs: 1 y 2),

la figura 4: el mapa de restricción del vector B6Sma35,

la figura 5: el mapa de restricción del vector de expresión pKB6Sma35d.

Los siguientes ejemplos explican la invención más detalladamente.

Ejemplo de referencia 1

40 Determinación de la actividad de lisofosfolipasa

1 unidad LPL corresponde a la cantidad de enzimas que ocasiona una velocidad de hidrólisis de 1 micromol por minuto en una disolución acuosa 0,01 molar de lisolecitina, a pH 4,5 y 55°C.

45 Para la determinación de la actividad de lisofosfolipasa se incubaba una mezcla de 0,25 ml de L-lisofosfatidilcolina de Sigma Type 1 Cat. N°. L4129 [se disuelve 10 mg de L-lisofosfatidilcolina en 1 ml de agua destilada (20 mmoles)], 0,250 ml de tampón acetato sódico 0,02 M, pH 4,5, y 0,1 ml de dilución enzimática en agua destilada a 55°C durante 10 min. Tampón y disolución de substrato se incubaban previamente durante 5 min a 55°C. Las muestras se extraen después de 1 min y 10 min de tiempo de reacción, y los ácidos grasos liberados se determinan con ayuda del

ensayo de color enzimático optimizado para la determinación de ácidos grasos libres (Non-Esterified Fatty Acids, NEFA, Best. Nr 1383 175 de la firma Boehringer-Mannheim). Como tiempo de reacción se utiliza el intervalo de tiempo entre la 1ª y la 2ª toma de muestras.

Ejemplo de referencia 2

5 Determinación de la actividad de fosfolipasa

1 unidad de fosfolipasa corresponde a la cantidad de enzimas que libera 1 µmol de ácido graso por minuto bajo condiciones estándar a partir de fosfatidilcolina.

Reactivos

Disolución de sustrato

- 10 Se homogeneiza 1 g de Epikuron 200 (fosfatidilcolina purificada a partir de soja de LUCAS MEYER, BestNr. 139029), 100 ml de agua desionizada y 5 ml de disolución de CaCl₂ 0,32 M con un Ultra Turrax 2 min a 24000 rpm. La disolución de sustrato es estable 3-4 días a 4°C-8°C.

Otras disoluciones

- 15 Disolución de MgCl₂ 0,32 M, disolución fresca de ácido cítrico monohidrato 3,3 mM, disolución de KOH 10 mM, disolución al 1 % de Triton X100 (firma Fluka) en agua completamente desalinizada.

Disolución enzimática

Los preparados enzimáticos se disuelven en agua desionizada. La concentración de enzimas en la carga no debe sobrepasar 2,5 U g⁻¹.

Puesta en práctica de la determinación

20 Valores principales

Se pipetea

10 ml de disolución de sustrato,

10 ml de disolución al 1 % de Triton X100,

5 ml de disolución de ácido cítrico monohidrato 3,3 mM,

- 25 en un matraz Erlenmeyer de 25 ml y se tempera 10 min a 40°C. El valor de pH se ajusta a aproximadamente 3,3-3,5.

Tras la adición de 0,1 ml de disolución enzimática se incuba la carga de análisis 10 min a 40°C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se titra con KOH 0,01 M a pH 10,0, añadiéndose rápidamente los primeros 5 ml de KOH (tiempo: aproximadamente 1 min). Se registra el consumo en KOH.

Valores obtenidos mediante ensayo en blanco.

- 30 Se calienta, y por consiguiente se desactiva la disolución madre enzimática 15 min a 95°C. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente se efectúa el tratamiento subsiguiente, como en los valores principales.

No es necesaria una incubación de los valores obtenidos mediante ensayo en blanco.

Valoración:

$$PLU / g = \frac{\Delta V_{KOH} * C_{KOH} * 1000}{\Delta I * C_s * V}$$

V_{KOH}	[ml]	Diferencia de consumo entre valor obtenido mediante ensayo en blanco y valor principal
C_{KOH}	[mol l ⁻¹]	Concentración de KOH
t	[min]	Tiempo de incubación
c_s	[g ml ⁻¹]	Concentración de muestra
v	[ml]	Volumen empleado

Ejemplo 1

Obtención de lisofosfolipasa con *Aspergillus fumigatus*

- 5 Se cultivó *Aspergillus fumigatus* RH3949 en un matraz vibratorio de 200 ml, cargado con 50 ml de medio a 28°C, 200 rpm, durante 5 días. El medio estaba constituido por un 0,5 % de Epicuron 200 (Lucas Meyer), 0,5 % de polvo de maíz hinchado, un 0,2 % de NH₄NO₃, KH₂PO₄ 100 mM y un 0,1 % de Triton X100. El valor de pH se ajustó a pH 6 antes de la esterilización. El medio se inoculó con una suspensión de esporas. Después de 5 días se separó el exceso de cultivo de la micela mediante filtración, y se midió la actividad de lisofosfolipasa en el líquido.

Ejemplo 2

- 10 Clonación y expresión del gen lisofosfolipasa (lpl) a partir de la cepa *Aspergillus fumigatus* RH3949

a) Síntesis de la primera hebra de ADN

- 15 Se inocularon y se cultivaron a 45°C durante 2 a 5 días aproximadamente 1×10^7 esporas de la cepa *Aspergillus fumigatus* RH3949 en 100 ml de medio (3,75 % de Glucidex, 3 % de polvo de maíz hinchado, 0,5 % de (NH₄)₂H₂PO₄). La micela obtenida se empleó para la preparación de ARN por medio de la columna Qiagen (Rneasy Mini Plant Kit, Qiagen).

La síntesis de la primera hebra de cADN se efectuó según la prescripción del fabricante (BRL). En este caso se pipetearon conjuntamente en una carga de reacción de 20 µl 4 µl de tampón 5 x BRL (250 mM Tris/HCl, pH 8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 1 µl de 10 mM dNTP, 2 µl de 100 mM DTT, 50 µMol de cebador EA13, 1 µl de RNA (2 µg de RNA total) y 2000 U RTase Super Script (BRL). La carga de reacción se incubó durante 50 min a 45°C.

- 20 Para la posterior amplificación de cADN de lisofosfolipasa por medio de la reacción en cadenas de polimerasa se diluyó la carga con 20 µl de agua bidestilada, y se conservó a -20°C.

La secuencia de ADN del cebador EA13 es la siguiente:

5'-gAC TCg AgT CgA CAT CgA (T)₂₀ (A/C/g)-3' (SEQ ID NO: 3)

- 25 b) Amplificación de una secuencia parcial de cADN de lisofosfolipasa por medio de la reacción en cadenas de polimerasa (PCR)

30 A partir de la comparación de la secuencia de aminoácidos de lisofosfolipasa de *S. cerevisiae* (Lee et al., J. Biol. Chem., 1994, 269, 19725-19730), *P. notatum* (Masuda et al., 1991, Eur. J. Biochem., 202, 783-787) y *Aspergillus awamori* RH3312, se deducieron diversos oligocebadores para la amplificación de cADN de lisofosfolipasa. En este caso se mostró que el par de cebadores 3949/875 y 3949/4710iv conduce al fragmento génico de cADN de lisofosfolipasa correcto.

3949/875 5'-GAT GGC GGC GAG GAT GGA CAG AA-3' (SEQ ID NO: 4)

3949/8710iv 5'-AGT GCC GTT CCA GCA ATA-3'(SEQ ID NO: 5)

A partir de la carga de la síntesis de la primera hebra de cADN se llevó a cabo la amplificación de una secuencia parcial de cADN de lisofosfolipasa por medio del método PCR. La carga de reacción de 100 µl contenía: 10 µl de tampón 10 x (200 mM Tris/HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 2 µl de 10 mM dNTP, respectivamente 50 pMol oligocebador, 1 µl de la carga de primera hebra de cDNA, 5U Taq de ADN-polimerasa (BRL). Se llevó a cabo la carga para la desnaturalización a 95°C durante 5 min, seguidos de 45 ciclos (95°C durante 1 min, 45°C durante 1 min, 72°C durante 1 min), y a continuación la extinción a 72°C durante 5 min.

Los productos PCR se purificaron a través de la columna (Concert Rapid PCR Purification System, Gibco BRL) y se clonaron en el plásmido pGEMT (Promega).

Un transformante contiene la secuencia parcial de cADN de lisofosfolipasa correcta, y se denominó 3949/19/16.

10 c) Clonación del gen de lisofosfolipasa cromosómico (lpl) a partir de la cepa RH3949

La preparación de ADN cromosómica se llevó a cabo según una prescripción de Hynes, M.J et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3, 1430-1439.

15 Tras hidrólisis parcial con Sau3A I se fraccionó el ADN según su tamaño mediante una centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa. Las fracciones que contenían fragmentos de ADN de 9-20 kb se reunieron y se precipitaron con etanol a -20°C. Tras el lavado y el secado se insertó el ADN en EMBL3-ADN hidrolizado con BamHI/EcoRI, y se envasó in vitro. El envasado en el producto sometido a lisis por fagos Gigapack III Gold Packaging se efectuó según la prescripción descrita por el fabricante (manual de instrucciones Stratagene).

20 Para la identificación del gen de lisofosfolipasa cromosómico en un banco génico Lambda EMBL3 se empleó el fragmento de cADN del plásmido 3949/19/16 como sonda génica radioactiva. La hibridación se llevó a cabo a 65°C, 18 horas en disolución de sulfato de dextrano (GenescreenPlus, DuPont). Tras la hibridación se lavaron los filtros respectivamente 30 min, en primer lugar con 6 x SSC, dos veces 2x SSC, dos veces 2 x SSC, un 0,1 % de SDS, y a continuación con 0, 2 x SSC a 65°C (Membrane transfer and detection methods, Amersham).

25 Se identificaron seis clones positivos. De los resultados del análisis con las endonucleasas de restricción e hibridación Southern se hidrolizó el ADN de fagos del clon B6 con SmaI. El fragmento SmaI de 2,5 kb insertado en pUC18 se denominó B6Sma35 (figura 4). Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN de 2,5 kb y la secuencia de aminoácidos derivada de la misma (SEQ ID NOs: 1 und 2).

30 El gen contiene 2507 bp, un péptido señal de 15 aminoácidos: Met Lys Ala Ile Phe Thr Leu Leu Thr Ala Leu Ala Val Thr Ala (Prediction of Protein Localization Sites, PSORT, Nakai und Kanehisa, 1992, Genomics 14, 897-911) y tiene un peso molecular calculado de 64068 Da. Una comparación de las secuencias de aminoácidos entre la lisofosfolipasa de *A. fumigatus* según la invención y la lisofosfolipasa PLB3 de *A. fumigatus* publicada muestra una identidad de un 88 % (determinación BLAST, <http://www.ncbi.nlm.gov/blast>. Altschul Stephen F., et. al.(1997), Gapped BLAST and PSI-Blast: a new generation of protein database search programs, Nucleic Acids Res. 25, 3389-3402).

d) Construcción del vector de expresión pKB6Sma35d

35 En primer lugar se amplificó la zona N-terminal del gen de lisofosfolipasa por medio del método PCR. Los cebadores empleados a tal efecto tienen la siguiente secuencia:

B6Sma3 5'-GAA TTC CGC GGA CTG CGC ATG ATG AAG GCC ATT TTC ACC CTT CTG AC-3' (SEQ ID NO: 6)

B6Sma4 5'-TGA GGA TCC TGG AGA AGG CCG CCT TG-3' (SEQ ID NO: 7)

40 La reacción en cadenas de polimerasa se efectuó bajo las siguientes condiciones: desnaturalización a 95°C durante 5 min, 45 ciclos a 95°C durante 1 min, 45°C durante 1 min, 72°C durante 1 min, y extinción durante 5 min a 72°C. La carga de reacción de 100 µl contenía: 10 µl de tampón 10 x PCR (200 mM Tris/HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 3 µl de 50 mM MgCl₂, 2 µl de 10 mM dNTP (respectivamente 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP), 50 pMol de oligocebador, 10 ng de ADN plasmídico como matriz y 5 U Taq-DNA polimerasa (BRL). El producto PCR se purificó, se hidrolizó con los enzimas SacII / BamHI y se insertó en el plásmido pALK487 disociado con los mismos enzimas. Mediante la secuenciación del plásmido obtenido pKB6Sma35b se confirmó la exactitud de la clonación. En el mismo procedimiento se amplificó la zona C-terminal del gen con el par de cebadores B6Sma5 y Sma35/5. La secuencia del cebador es la siguiente:

Sma35/5 5'-ATG GGC ACC TCG TCC TCA CTC TTC-3' (SEQ ID NO: 8)

B6Sma5 5'-CGG GAT CCT AGC ACC TAC AG TAT ACG GAA G-3' (SEQ ID NO: 9)

Tras la hidrólisis con BamHI, el producto PCR se incorporó en el plásmido pKB6Sma35b disociado con el mismo enzima. Se preparó y secuenció el plásmido resultante, con la denominación pKB6Sma35c, que contenía el gen de lisofosfolipasa total (lpl) bajo el control del promotor *T. reesei* cbhl.

- 5 Mediante incorporación del fragmento EcoRI, fill-in/ Spel, fill-in del plásmido pALK424, que contenía el marcador de selección amdS, en el plásmido pKB6Sma35c disociado con el enzima SmaI, se construyó el vector de expresión pKB6Sma35d (figura 5).

e) Transformación de la cepa *T. reesei* RH31013

- 10 El ADN empleado para la transformación se aisló a partir del vector pKB6Sma35d como fragmento NotI. Este fragmento NotI contenía el gen de lisofosfolipasa bajo control del promotor *T. reesei* cbhl y del marcador de selección amdS.

- 15 Para el aislamiento del fragmento de 9,3 kb se separó mediante electroforesis el vector pKB6Sma35d tras la hidrólisis con NotI en 1,2 % de agarosa de fusión lenta. El gel de agarosa, que contenía un fragmento de NotI-ADN de 9,7 kb se digirió con β -agarasa I (Biolabs), y después se precipitó el ADN con isopropanol. Para la transformación se requiere entre 10 y 15 μ g de fragmento de ADN.

La transformación en *T. reesei* RH31013 se llevó a cabo según la prescripción de Penttilä M., et al. (1987, Gene 61, 155-64).

- 20 Los 13 transformantes obtenidos tras la transformación se purificaron dos veces a través de colonias de esporas aisladas en placas de selección, y en último lugar se transfirió a medio PD (agar de patata-dextrosa). Los transformantes RH31202 y RH31204 se utilizaron para otros ensayos.

Ejemplo 3

Obtención recombinante de LPL a partir de *A. fumigatus* RH 3949

- 25 El cultivo de los transformantes RH31202 y RH31204 se efectuó en un matraz vibratorio de 250 ml sin deflectores, con 50 ml de medio (3 % de lactosa, 3 % de distiller spent grain, 5 % de KH_2PO_4 , 0,5 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, y un 1 % de polvo de maíz hinchado, valor de pH 4,4). El medio se inoculó con una suspensión de esporas.

Después de 6 días de incubación a 28°C, 200 rpm, 25 mm de desviación, se separó el exceso de cultivo de la micela mediante filtración en medio estéril, y se utilizó para los otros ensayos.

Ejemplo 4

Caracterización de LPL obtenido por vía recombinante a partir de *A. fumigatus*

- 30 La actividad de lisofosfolipasa y la actividad de fosfolipasa de las disoluciones de cultivo de RH31202 y RH31204 filtradas en medio estéril se determinaron según el ejemplo de referencia 1 y 2.

Tabla 1: actividades enzimáticas de los excesos de cultivo de RH31202 y RH31204, que expresen la lisofosfolipasa de *A. fumigatus* RH3949

Cepa	[LPL g ⁻¹]	[PLU g ⁻¹]	[LPL/PLU]
RH 31013	3	1	3
RH 31202	22618	153	148
RH 31204	22860	152	150

- 35 La lisofosfolipasa de *Aspergillus fumigatus* RH3949 producida por vía recombinante tiene una proporción de

actividad de LPL respecto a LP muy elevada. El enzima no muestra apenas actividad de fosfolipasa. Este no es el caso en las fosfolipasas B descritas en la bibliografía. Estas últimas muestran una proporción de actividad de LPL respecto a LP menor que el enzima según la invención.

Ejemplo 5

5 Mejora de la filtrabilidad de sirope de maltosa

La LPL obtenida por vía recombinante a partir de *Aspergillus fumigatus* RH3949 se empleó en otros ensayos para la mejora de la filtración de hidrolizados parciales de almidón de trigo (llamados sirope de manera abreviada).

Parte A

10 Se incubó hidrolizado parcial de almidón de trigo de la firma Cerestar/Cargill (almidón de trigo B) a 60°C y 65°C hasta 4 h a pH 4, con enzimas de los excesos de cultivo del ejemplo 3. A tal efecto se ajustó el hidrolizado parcial de almidón de trigo a pH 4 con HCl. Se incubaron 100 ml de hidrolizado parcial de almidón de trigo en un matraz Erlenmeyer de 200 ml con la LPL del ejemplo 4, con una dosificación de 280 LPL por kg de sirope, y la disolución se agitó con un agitador magnético. Durante el tiempo de incubación y al final del mismo se verificó visualmente el resultado. La aparición de copos, que dejan una disolución clara en el caso de acción de lisofosfolipasa, muestra la acción del enzima en comparación con sirope no tratado, que permanece turbio. La floculación se clasificó de manera semicuantitativa en las etapas muy buena, buena, mala, sin modificación. El exceso enfriado a 35°C se filtró a continuación a través de un filtro de papel (Whatman nº 4), y se determinó la velocidad de filtración tras 2,5 y 10 min en este caso. La claridad del filtrado se determinó mediante fotometría a 720 nm.

20 En el caso de adición de lisofosfolipasa según la invención, ya después de 1 h era visible una buena formación de copos, en el valor obtenido mediante ensayo en blanco no se produjo una formación de copos tampoco después de 4 h, y la carga permaneció turbia. Después de 4 h, la formación de copos en la carga con enzima era muy buena.

Mediante la adición de la lisofosfolipasa según la invención también se aumentó claramente la velocidad de filtración del sirope tratado por vía enzimática, como se desprende de la tabla 2.

Tabla 2: tratamiento de hidrolizado parcial de almidón de trigo con lisofosfolipasa a diversas temperaturas

25

Enzima	Temperatura [°C]	Dosificación [LPL por kg de sirope]	Filtrado tras 2,5 min [ml]	Filtrado tras 10 min [ml]
Valor obtenido mediante ensayo en blanco	60°C	0	7,5	11,5
RH31202	60°C	280	11,0	17,5
Valor obtenido mediante ensayo en blanco	65°C	0	8,0	13,0
RH31202	65°C	280	14,0	23,0

Parte B

30 En otro ensayo se añadió también β -amilasa, adicionalmente a la lisofosfolipasa según la invención, al hidrolizado parcial de almidón de trigo, como se lleva a cabo a escala industrial en la industria del almidón. En este caso, el valor de pH se ajusta a pH 4,9 con HCl, y el tiempo de incubación asciende a 6 h a 60°C. A continuación se valoró ópticamente la floculación y se determinó la velocidad de filtración como en la parte A. Los resultados del ensayo de filtración se reúnen en la tabla 3.

Tabla 3: tratamiento de hidrolizado parcial de almidón de trigo con β -amilasa y lisofosfolipasa a pH 4,9, 60°C durante 6 h. La cantidad añadida de lisofosfolipasa (RH 31202) ascendía a 280 LPL por kg de sirope.

35

Enzima	Filtrado tras 2,5 min [ml]	Filtrado tras 10 min [ml]
Valor obtenido mediante ensayo en blanco	7,0	10,5
Solo β -amilasa	14,5	25,0
Lisofosfolipasa y β -amilasa	19,5	33,0

Los resultados muestran que, también en presencia de β -amilasa, que conduce a una reducción adicional de la viscosidad del hidrolizado parcial de almidón de trigo, se ocasiona un claro aumento de la velocidad de filtración mediante la adición de la lisofosfolipasa según la invención.

- 5 La adición de β -amilasa no conduce a la formación de copos. Solo mediante la adición de lisofosfolipasa se llega a una muy buena formación de copos.

El filtrado con adición de β -amilasa tenía una extinción de 0,116 AU a 720 nm, mientras que la extinción del filtrado se redujo a 0,017 AU mediante la adición de lisofosfolipasa. Esto muestra una evidente mejora de la claridad del filtrado, ocasionada por la adición de la lisofosfolipasa según la invención.

- 10 Protocolo de secuencia

<110> AB ENZYMES GMBH

<120> KLONIERUNG, EXPRESSION UND VERWENDUNG SAURER LYPOPHOSPHOLIPASEN

<130> 16826WO

<160> 9

- 15 <170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 2507

<212> DNA

<213> Aspergillus fumigatus

- 20 <220>

<221> CDS

<222> (535)..(2370)

<223>

<400> 3

```

ccccggggca gtgcaacggc agtggttatg gttctggtgg cagtgctggc gggggtgatt    60
cggatggtgc ataccaggat gaacaagagg ctggaggagg atgaaaggga acatgaagtg    120
gagcatccag gttttagata cattctataa ctgtctttat agtattgaac acatgcagct    180
gaatagtgct gcctggacag tgtgcataaa ttatccgaag cagcaaatgg aaaagatcac    240
tgcctaatagc ccagccctga cgacaacaca acgtctggaa tcaaccctag acaaccaca    300
ttcccgcggg gaccgaagcc taaatgattg gcagttcttc tggcatttcc actgttcggt    360
tttctatagc catccgattc gtggagaggg ccatcgggag atgggtcgat gatgatttac    420
ggctgtcccg gaagtatgtg ctgacgcgga gaaccgagta tatctactac gtcaatgtta    480
gctatccttt ggattggcaa tgttctttct tttgagacag tgagaggtat cgac atg    537
Met

```

- 25

1

ES 2 574 089 T3

aag gcc att ttc acc ctt ctg acg gcc ctg gcc gta acg gca act cct Lys Ala Ile Phe Thr Leu Leu Thr Ala Leu Ala Val Thr Ala Thr Pro 5 10 15	585
ctc gac ctg tct att cga gct ctc ccc aac gcc ccc aat ggc tat act Leu Asp Leu Ser Ile Arg Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Gly Tyr Thr 20 25 30	633
ccg gcg aat gtg tcc tgt cca gcg aca cga ccc agc att cgc ggt gca Pro Ala Asn Val Ser Cys Pro Ala Thr Arg Pro Ser Ile Arg Gly Ala 35 40 45	681
ggg tca ctt tct ccg aat gaa acc gcc tgg ctc cag atc cgt cgc aac Gly Ser Leu Ser Pro Asn Glu Thr Ala Trp Leu Gln Ile Arg Arg Asn 50 55 60 65	729
aat aca gtc cag ccc atg aag gac ttg ctg ggc cga ctg aat ctc acc Asn Thr Val Gln Pro Met Lys Asp Leu Leu Gly Arg Leu Asn Leu Thr 70 75 80	777
ttc gac gca gcg agc tac atc gat cgc gtg tcg agt aac gta tct aac Phe Asp Ala Ala Ser Tyr Ile Asp Arg Val Ser Ser Asn Val Ser Asn 85 90 95	825
ctg cct aat atc gcg atc gct gtc tct ggg ggt gga tac cgg gct ctg Leu Pro Asn Ile Ala Ile Ala Val Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala Leu 100 105 110	873
acc aat gga gct gga gct ata aaa gcc ttt gac aac cga aca aaa ggc Thr Asn Gly Ala Gly Ala Ile Lys Ala Phe Asp Asn Arg Thr Lys Gly 115 120 125	921
tcg act gca cct gga cag cta ggg ggt cta ctg cag tct gcc acg tac Ser Thr Ala Pro Gly Gln Leu Gly Gly Leu Leu Gln Ser Ala Thr Tyr 130 135 140 145	969
gta tct gga ctg agc gga gga gga tgg ctc gtg ggc tca gtg tat gtg Val Ser Gly Leu Ser Gly Gly Gly Trp Leu Val Gly Ser Val Tyr Val 150 155 160	1017
aac aac ttc acg acc atc tcg gac ctc caa tcc gga ggc aat ggc gac Asn Asn Phe Thr Thr Ile Ser Asp Leu Gln Ser Gly Gly Asn Gly Asp 165 170 175	1065
gta tgg cag ttt tcc acg tct atc ctg gaa ggc ccc aag acc aga cac Val Trp Gln Phe Ser Thr Ser Ile Leu Glu Gly Pro Lys Thr Arg His 180 185 190	1113
ctg cag ttt cta tcc aca gtc gac tac tgg agg aat ttg ctt gat gca Leu Gln Phe Leu Ser Thr Val Asp Tyr Trp Arg Asn Leu Leu Asp Ala 195 200 205	1161
gtc aac ggt aaa agc aac gcg ggt ttc aac acc tcg cta act gac tac Val Asn Gly Lys Ser Asn Ala Gly Phe Asn Thr Ser Leu Thr Asp Tyr 210 215 220 225	1209
tgg ggc cgt gct cta tcc tac cag ttc atc aac gat ccg act ggg aac Trp Gly Arg Ala Leu Ser Tyr Gln Phe Ile Asn Asp Pro Thr Gly Asn 230 235 240	1257

ES 2 574 089 T3

ggc ggg gtc agc tac acc tgg tgc tcc atc gcc ttg aac gac agc ttc Gly Gly Val Ser Tyr Thr Trp Ser Ser Ile Ala Leu Asn Asp Ser Phe 245 250 255	1305
cag cgc ggg gag atg cca ctc ccc atc ctg gtc gcg gac ggc cgc aac Gln Arg Gly Glu Met Pro Leu Pro Ile Leu Val Ala Asp Gly Arg Asn 260 265 270	1353
cca ggc gag cgg ctg atc ggc agc aac tgc acc gtc tac gag ttc aac Pro Gly Glu Arg Leu Ile Gly Ser Asn Ser Thr Val Tyr Glu Phe Asn 275 280 285	1401
ccg tgg gag ttt ggc tgc ttc gac ccg tcc atc ttc ggc ttt gca ccg Pro Trp Glu Phe Gly Ser Phe Asp Pro Ser Ile Phe Gly Phe Ala Pro 290 295 300 305	1449
ctc gag tat ctc ggc tca cgc ttc gac aac ggc cag ctt cct agc ggc Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Arg Phe Asp Asn Gly Gln Leu Pro Ser Gly 310 315 320	1497
gaa tcc tgc gtc cgt ggt ttc gat aat gca ggc ttc gtc atg ggc acc Glu Ser Cys Val Arg Gly Phe Asp Asn Ala Gly Phe Val Met Gly Thr 325 330 335	1545
tgc tcc tca ctc ttc aac cag ttc atc ctg cgg ctc aac act acc gat Ser Ser Ser Leu Phe Asn Gln Phe Ile Leu Arg Leu Asn Thr Thr Asp 340 345 350	1593
ctc ccg gac ctg gtc aag gcg gcc ttc tcc agg atc ctc acc gcg cta Leu Pro Asp Leu Val Lys Ala Ala Phe Ser Arg Ile Leu Thr Ala Leu 355 360 365	1641
ggt cgg gat ggc gac gat atc gcc atc tac gcc ccc aac ccg ttc tac Gly Arg Asp Gly Asp Asp Ile Ala Ile Tyr Ala Pro Asn Pro Phe Tyr 370 375 380 385	1689
ggg tat cgc aac tgc acc gcg gtc tac tgc cac agc cgc gag ctc gac Gly Tyr Arg Asn Ser Thr Ala Val Tyr Ser His Ser Arg Glu Leu Asp 390 395 400	1737
gtc gtc gac ggc ggc gag gac ggc cag aat atc ccc tta cac ccc ctc Val Val Asp Gly Gly Glu Asp Gly Gln Asn Ile Pro Leu His Pro Leu 405 410 415	1785
atc cag cca acc cgc cac gtc gac gtg atc ttc gcg gtt gac tcc tgc Ile Gln Pro Thr Arg His Val Asp Val Ile Phe Ala Val Asp Ser Ser 420 425 430	1833
gcc gac acg gcg tac aac tgg ccg aat ggg acc tgc cta gtc gcg acc Ala Asp Thr Ala Tyr Asn Trp Pro Asn Gly Thr Ser Leu Val Ala Thr 435 440 445	1881
tac gag cga agc ctc aac agc tgc gga atc ggc aat agg acg gtc ttc Tyr Glu Arg Ser Leu Asn Ser Ser Gly Ile Gly Asn Arg Thr Val Phe 450 455 460 465	1929
ccc gcc gtg ccg gac gtg aac acc ttc gtc aac ctg ggc ttg aac acc Pro Ala Val Pro Asp Val Asn Thr Phe Val Asn Leu Gly Leu Asn Thr 470 475 480	1977

ES 2 574 089 T3

aga ccg acc ttc ttc ggg tgc gat ccc gcg aat ctg tcg gcg ccg gcg 2025
 Arg Pro Thr Phe Phe Gly Cys Asp Pro Ala Asn Leu Ser Ala Pro Ala
 485 490 495

ccc ttg gtg gta tac ctg ccg aat gcg ccg tac agc gcg cat agc aac 2073
 Pro Leu Val Val Tyr Leu Pro Asn Ala Pro Tyr Ser Ala His Ser Asn
 500 505 510

acc tcc acc ttc cag ttg tcg tac gcg gat tcc cag cgc gat gag atc 2121
 Thr Ser Thr Phe Gln Leu Ser Tyr Ala Asp Ser Gln Arg Asp Glu Ile
 515 520 525

atc acg aat ggg tat aac gtt gtg acg ccg ggg aat gca acc gcc gac 2169
 Ile Thr Asn Gly Tyr Asn Val Val Thr Arg Gly Asn Ala Thr Ala Asp
 530 535 540 545

aag gcc tgg ccg agc tgt gtg ggg tgt gcc att ctg cag cgg tcg atg 2217
 Lys Ala Trp Pro Ser Cys Val Gly Cys Ala Ile Leu Gln Arg Ser Met
 550 555 560

tat cgg acc aac acg tcc atg ccg gcg gtg tgt tcc agt tgc ttc aag 2265
 Tyr Arg Thr Asn Thr Ser Met Pro Ala Val Cys Ser Ser Cys Phe Lys
 565 570 575

gcg tat tgc tgg aac ggg acg gtg gat agc aag act cct cgg act tat 2313
 Ala Tyr Cys Trp Asn Gly Thr Val Asp Ser Lys Thr Pro Arg Thr Tyr
 580 585 590

gag ccg agc cag gtg gtg ggg agt aag tcc acg tct gcg gct tac agg 2361
 Glu Pro Ser Gln Val Val Gly Ser Lys Ser Thr Ser Ala Ala Tyr Arg
 595 600 605

gag ggt tga attggctggt gggcggggtt gctgttgggc tgggagtgtg 2410
 Glu Gly
 610

gacagttag acagatggca taaatctatc tcgctgttat ttgcgccatc tactcgetag 2470

cacctcttcc gtatactgta ggtgctagca tcccg 2507

<210> 2

<211> 611

<212> PRT

5 <213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 4

Met Lys Ala Ile Phe Thr Leu Leu Thr Ala Leu Ala Val Thr Ala Thr
 1 5 10 15

Pro Leu Asp Leu Ser Ile Arg Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Gly Tyr
 20 25 30

ES 2 574 089 T3

Thr Pro Ala Asn Val Ser Cys Pro Ala Thr Arg Pro Ser Ile Arg Gly
 35 40 45
 Ala Gly Ser Leu Ser Pro Asn Glu Thr Ala Trp Leu Gln Ile Arg Arg
 50 55 60
 Asn Asn Thr Val Gln Pro Met Lys Asp Leu Leu Gly Arg Leu Asn Leu
 65 70 75 80
 Thr Phe Asp Ala Ala Ser Tyr Ile Asp Arg Val Ser Ser Asn Val Ser
 85 90 95
 Asn Leu Pro Asn Ile Ala Ile Ala Val Ser Gly Gly Gly Tyr Arg Ala
 100 105 110
 Leu Thr Asn Gly Ala Gly Ala Ile Lys Ala Phe Asp Asn Arg Thr Lys
 115 120 125
 Gly Ser Thr Ala Pro Gly Gln Leu Gly Gly Leu Leu Gln Ser Ala Thr
 130 135 140
 Tyr Val Ser Gly Leu Ser Gly Gly Gly Trp Leu Val Gly Ser Val Tyr
 145 150 155 160
 Val Asn Asn Phe Thr Thr Ile Ser Asp Leu Gln Ser Gly Gly Asn Gly
 165 170 175
 Asp Val Trp Gln Phe Ser Thr Ser Ile Leu Glu Gly Pro Lys Thr Arg
 180 185 190
 His Leu Gln Phe Leu Ser Thr Val Asp Tyr Trp Arg Asn Leu Leu Asp
 195 200 205
 Ala Val Asn Gly Lys Ser Asn Ala Gly Phe Asn Thr Ser Leu Thr Asp
 210 215 220
 Tyr Trp Gly Arg Ala Leu Ser Tyr Gln Phe Ile Asn Asp Pro Thr Gly
 225 230 235 240
 Asn Gly Gly Val Ser Tyr Thr Trp Ser Ser Ile Ala Leu Asn Asp Ser
 245 250 255
 Phe Gln Arg Gly Glu Met Pro Leu Pro Ile Leu Val Ala Asp Gly Arg
 260 265 270
 Asn Pro Gly Glu Arg Leu Ile Gly Ser Asn Ser Thr Val Tyr Glu Phe
 275 280 285

ES 2 574 089 T3

Asn Pro Trp Glu Phe Gly Ser Phe Asp Pro Ser Ile Phe Gly Phe Ala
 290 295 300

Pro Leu Glu Tyr Leu Gly Ser Arg Phe Asp Asn Gly Gln Leu Pro Ser
 305 310 315 320

Gly Glu Ser Cys Val Arg Gly Phe Asp Asn Ala Gly Phe Val Met Gly
 325 330 335

Thr Ser Ser Ser Leu Phe Asn Gln Phe Ile Leu Arg Leu Asn Thr Thr
 340 345 350

Asp Leu Pro Asp Leu Val Lys Ala Ala Phe Ser Arg Ile Leu Thr Ala
 355 360 365

Leu Gly Arg Asp Gly Asp Asp Ile Ala Ile Tyr Ala Pro Asn Pro Phe
 370 375 380

Tyr Gly Tyr Arg Asn Ser Thr Ala Val Tyr Ser His Ser Arg Glu Leu
 385 390 395 400

Asp Val Val Asp Gly Gly Glu Asp Gly Gln Asn Ile Pro Leu His Pro
 405 410 415

Leu Ile Gln Pro Thr Arg His Val Asp Val Ile Phe Ala Val Asp Ser
 420 425 430

Ser Ala Asp Thr Ala Tyr Asn Trp Pro Asn Gly Thr Ser Leu Val Ala
 435 440 445

Thr Tyr Glu Arg Ser Leu Asn Ser Ser Gly Ile Gly Asn Arg Thr Val
 450 455 460

Phe Pro Ala Val Pro Asp Val Asn Thr Phe Val Asn Leu Gly Leu Asn
 465 470 475 480

Thr Arg Pro Thr Phe Phe Gly Cys Asp Pro Ala Asn Leu Ser Ala Pro
 485 490 495

Ala Pro Leu Val Val Tyr Leu Pro Asn Ala Pro Tyr Ser Ala His Ser
 500 505 510

Asn Thr Ser Thr Phe Gln Leu Ser Tyr Ala Asp Ser Gln Arg Asp Glu
 515 520 525

ES 2 574 089 T3

Ile Ile Thr Asn Gly Tyr Asn Val Val Thr Arg Gly Asn Ala Thr Ala
 530 535 540

Asp Lys Ala Trp Pro Ser Cys Val Gly Cys Ala Ile Leu Gln Arg Ser
 545 550 555 560

Met Tyr Arg Thr Asn Thr Ser Met Pro Ala Val Cys Ser Ser Cys Phe
 565 570 575

Lys Ala Tyr Cys Trp Asn Gly Thr Val Asp Ser Lys Thr Pro Arg Thr
 580 585 590

Tyr Glu Pro Ser Gln Val Val Gly Ser Lys Ser Thr Ser Ala Ala Tyr
 595 600 605

Arg Glu Gly
 610

<210> 3
 <211> 39
 <212> DNA
 5 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 3
 gactcgagtc gacatcgatt tttttttt ttttttv 39

10 <210> 4
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

15 <220>
 <223> Primer

<400> 4
 gatggcggcg aggatggaca gaa 23

20 <210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

25 <400> 5
 agtgccgttc cagcaata 18

<210> 6
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

30 <220>
 <223> Primer

<400> 6
 gaattccgcg gactcgcgat catgaaggcc atttcacccttctgac 47

<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Primer

<400> 7
tgaggatcct ggagaaggcc gccttg 26

10 <210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

15 <400> 8
atgggcacct cgtcctcact cttc 24

20 <210> 9
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 9
cgggatccta gcacctacag tatacggaag 30

25

REIVINDICACIONES

- 1.- Secuencia de ADN que codifica un polipéptido con actividad de lisofosfolipasa, caracterizada por que la secuencia de ADN es seleccionada a partir de
- a) secuencias de ADN que comprenden una secuencia de nucleótidos según SEQ ID NO: 1,
- 5 b) secuencias de ADN que comprenden la secuencia codificante según SEQ ID NO: 1,
- c) secuencias de ADN que codifican la secuencia de proteínas según SEQ ID NO: 2,
- d) secuencias de ADN que se codifican por el plásmido B6Sma35 con el mapa de restricción según la figura 4, y depositadas bajo el número de depósito DSM 18370,
- 10 e) secuencias de ADN que, debido a la degenerabilidad del código genético, son análogas a las secuencias de ADN según a), b), c) o d), y
- f) hebras complementarias a las secuencias según a) a e),
- siendo derivada la secuencia de ADN preferentemente de *Aspergillus*, y de modo aún más preferente de *Aspergillus fumigatus*, y manteniendo el polipéptido con actividad de lisofosfolipasa una actividad de al menos un 80 % a una temperatura de 65°C, pH 5 en hidrolizado parcial de almidón de trigo, durante al menos 4 h.
- 15 2.- Secuencia de ácidos nucleicos que comprende un análogo de una de las secuencias según la reivindicación 1, caracterizada por que la secuencia codifica un polipéptido con actividad de lisofosfolipasa, y
- a) presenta al menos un 89 % de identidad con estas secuencias, o
- b) se hibrida con una de estas secuencias bajo condiciones restrictivas, o
- c) es una hebra complementaria a las secuencias según a) a b),
- 20 siendo obtenible la secuencia mediante sustitución, delección, inserción, adición o mutación de uno o varios ácidos nucleicos de la secuencia de ADN según SEQ ID NO: 1, y manteniendo el polipéptido con actividad de lisofosfolipasa una actividad de al menos un 80 % a una temperatura de 65°C, pH 5 en hidrolizado parcial de almidón de trigo, durante al menos 4 h.
- 25 3.- Segmento de expresión que comprende una secuencia según una de las reivindicaciones 1 a 2 en enlace funcional con una o varias secuencias para el control de la expresión del polipéptido con actividad de lisofosfolipasa en una célula hospedante apropiada, comprendiendo la secuencia para el control de la expresión del polipéptido preferentemente un promotor, seleccionado a partir del promotor de glucoamilasa o α -amilasa de la especie *Aspergillus*, del promotor de celulasa (celobiohidrolasa) de la especie *Trichoderma*, un promotor para un enzima en la vía metabólica glicolítica, como fosfogliceratoquinasa o 3-fosfato-dehidrogenasa de gliceraldehído, el promotor de xilanasas o el promotor de enolasa, y comprendiendo en caso dado una secuencia conductora secretora.
- 30 4.- Célula hospedante recombinante, caracterizada por que se ha transformado con un segmento de expresión según la reivindicación 3.
- 5.- Célula hospedante recombinante según la reivindicación 4, caracterizada por que es derivada de una célula fúngica de la especie *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichoderma*, *Neurospora*, *Mucor* oder *Penicillium* oder einer Hefezelle der Gattung *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Trichosporon*, *Schwanniomyces*, *Hansenula* o *Pichia*.
- 35 6.- Plásmido B6Sma35 con el mapa de restricción según la figura 4, y depositado bajo el número de depósito DSM 18370.
- 7.- Polipéptido con actividad de lisofosfolipasa seleccionado a partir de
- 40 a) un polipéptido que se codifica por la parte codificante de una secuencia de ADN según una de las reivindicaciones 1 a 2,
- b) un polipéptido con una secuencia que presenta al menos un 89 % de identidad con los aminoácidos 16 a 611 de SEQ ID NO: 2, manteniendo el polipéptido con actividad de lisofosfolipasa una actividad de al

menos un 80 % a una temperatura de 65°C, pH 5 en hidrolizado parcial de almidón de maíz, durante al menos 4 horas.

- 8.- Polipéptido con actividad de lisofosfolipasa según la reivindicación 7, caracterizado por que
- posee un peso molecular en el intervalo de 64 a 78 kDa,
- 5
- puede hidrolizar el ácido graso de lisolecitina,
 - presenta una proporción elevada de actividad de lisofosfolipasa respecto a actividad de fosfolipasa,
 - se puede aislar a partir de un organismo de la especie *Aspergillus*, y
 - es reactivo por vía inmunológica con un anticuerpo orientado contra la secuencia SEQ ID NO: 2.
- 9.- Polipéptido según la reivindicación 8, caracterizado por que se puede aislar a partir de *Aspergillus fumigatus*.
- 10
- 10.- Polipéptido según una de las reivindicaciones 8 a 9, caracterizado por que comprende la secuencia según SEQ ID NO: 2.
- 11.- Composición de lisofosfolipasa, caracterizada por que comprende un polipéptido según una de las reivindicaciones 7 a 10 junto con sustancias auxiliares, y por que comprende además, en caso dado, uno o varios enzimas para productos alimenticios o piensos.
- 15
- 12.- Empleo de un polipéptido según una de las reivindicaciones 7 a 10, o de una composición de lisofosfolipasa según la reivindicación 11, para la mejora de la filtración de sirope, preferentemente de sirope, seleccionado a partir de sirope de glucosa y sirope de maltosa.
- 13.- Empleo de un polipéptido según una de las reivindicaciones 7 a 10, o de una composición de lisofosfolipasa según la reivindicación 11, para la transesterificación de lisolecitinas.
- 20
- 14.- Procedimiento para la producción de un polipéptido con actividad de lisofosfolipasa según una de las reivindicaciones 7 a 10, caracterizado por que se cultiva una célula hospedante según una de las reivindicaciones 4 o 5, bajo condiciones que favorecen la expresión del polipéptido, y a continuación se obtiene el polipéptido.

```

1   CCCGGGGGCA GTGCAACGGC AGTGGTTATG GTTCTGGTGG CAGTGCTGGC
51  GGGGGTGATT CGGATGGTGC ATACCAGGAT GAACAAGAGG CTGGAGGAGG
101 ATGAAAGGGA ACATGAAGTG GAGCATCCAG GTTTTAGATA CATTCTATAA
151 CTGTCTTTAT AGTATTGAAC ACATGCAGCT GAATAGTGCT GCCTGGACAG
201 TGTGCATAAA TTATCCGAAG CAGCAAATGG AAAAGATCAC TGCCTAATGC
251 CCAGCCCTGA CGACAACACA ACGTCTGGAA TCAACCCTAG ACAACCCACA
301 TTCCCGCGGG GACCGAAGCC TAAATGATTG GCAGTTCTTC TGGCATTTC
351 ACTGTTCGTT TTTCTATAGC CATCCGATTC GTGGAGAGGG CCATCGGGAG
401 ATGGGTCGAT GATGATTTAC GGCTGTCCCG GAAGTATGTG CTGACGCGGA
451 GAACCGAGTA TATCTACTAC GTCAATGTTA GCTATCCTTT GGATTGGCAA
501 TGTTCTTTCT TTTGAGACAG TGAGAGGTAT CGACATGAAG GCCATTTTCA
551 CCCTTCTGAC GGCCCTGGCC GTAACGGCAA CTCCTCTCGA CCTGTCTATT
601 CGAGCTCTCC CCAACGCCCC CAATGGCTAT ACTCCGGCGA ATGTGTCTTG
651 TCCAGCGACA CGACCCAGCA TTCGCGGTGC AGGGTCACTT TCTCCGAATG
701 AAACCGCCTG GCTCCAGATC CGTCGCAACA ATACAGTCCA GCCCATGAAG
751 GACTTGCTGG GCCGACTGAA TCTCACCTTC GACGCAGCGA GCTACATCGA
801 TCGCGTGTCT AGTAACGTAT CTAACCTGCC TAATATCGCG ATCGCTGTCT
851 CTGGGGGTGG ATACCGGGCT CTGACCAATG GAGCTGGAGC TATAAAAGCC
901 TTTGACAACC GAACAAAAGG CTCGACTGCA CCTGGACAGC TAGGGGGTCT
951 ACTGCAGTCT GCCACGTACG TATCTGGACT GAGCGGAGGA GGATGGCTCG
1001 TGGGCTCAGT GTATGTGAAC AACTTCACGA CCATCTCGGA CCTCCAATCC
1051 GGAGGCAATG GCGACGTATG GCAGTTTTCC ACGTCTATCC TGGAAGGCCC
1101 CAAGACCAGA CACCTGCAGT TTCTATCCAC AGTCGACTAC TGGAGGAATT
1151 TGCTTGATGC AGTCAACGGT AAAAGCAACG CGGGTTTCAA CACCTCGCTA
1201 ACTGACTACT GGGGCCGTGC TCTATCCTAC CAGTTCATCA ACGATCCGAC
1251 TGGGAACGGC GGGGTCAGCT ACACCTGGTC GTCCATCGCC TTGAACGACA
1301 GCTTCCAGCG CGGGGAGATG CCACTCCCCA TCCTGGTCGC GGACGGCCGC
1351 AACCCAGGCG AGCGGCTGAT CGGCAGCAAC TCGACCGTCT ACGAGTTCAA
1401 CCCGTGGGAG TTTGGCTCGT TCGACCCGTC CATCTTCGGC TTTGCACCGC
1451 TCGAGTATCT CGGCTCACGC TTCGACAACG GCCAGCTTCC TAGCGGCGAA
1501 TCCTGCGTCC GTGGTTTCGA TAATGCAGGC TTCGTATGG GCACCTCGTC
1551 CTCACTCTTC AACCAGTTCA TCCTGCGGCT CAACACTACC GATCTCCCGG
1601 ACCTGGTCAA GGCGGCCCTT TCCAGGATCC TCACCGCGCT AGGTCGGGAT
1651 GGCGACGATA TCGCCATCTA CGCCCCAAC CCGTTCTACG GGTATCGCAA
1701 CTCGACCGCG GTCTACTCGC ACAGCCGCGA GCTCGACGTC GTCGACGGCG
1751 GCGAGGACGG CCAGAATATC CCCTTACACC CCCTCATCCA GCCAACCCGC
1801 CACGTCGACG TGATCTTCGC GGTTGACTCC TCGGCCGACA CGGCGTACAA
1851 CTGGCCGAAT GGGACCTCGC TAGTCGCGAC CTACGAGCGA AGCCTCAACA
1901 GCTCGGGAAT CGGCAATAGG ACGGTCTTCC CCGCCGTGCC GGACGTGAAC
1951 ACCTTCGTCA ACCTGGGCTT GAACACCAGA CCGACCTTCT TCGGGTGCGA
2001 TCCCGCGAAT CTGTGCGGCG CGGCGCCCTT GGTGGTATAC CTGCCGAATG
2051 CGCCGTACAG CGCGCATAGC AACACCTCCA CCTTCCAGTT GTCGTACGCG
2101 GATTCCCAGC GCGATGAGAT CATCACGAAT GGGTATAACG TTGTGACGCG
2151 GGGGAATGCA ACCGCCGACA AGGCCTGGCC GAGCTGTGTG GGGTGTGCCA
2201 TTCTGCAGCG GTCGATGTAT CGGACCAACA CGTCCATGCC GGCGGTGTGT
2251 TCCAGTTGCT TCAAGGCGTA TTGCTGGAAC GGGACGGTGG ATAGCAAGAC
2301 TCCTCGGACT TATGAGCCGA GCCAGGTGGT GGGGAGTAAG TCCACGTCTG
2351 CGGCTTACAG GGAGGGTTGA ATTGCTGGT GGGCGGGTTT GCTGTTGGGC
2401 TGGGAGTGTG GACAGTTTAC ACAGATGGCA TAAATCTATC TCGCTGTTAT
2451 TTGCGCCATC TACTCGCTAG CACCTCTTCC GTATACTGTA GGTGCTAGCA
2501 TCCCGGG

```

```

1  MKAIFTLLTA  LAVTATPLDL  SIRALPNAPN  GYTPANVSCP  ATRPSIRGAG
51  SLSPNETAWL  QIRRNNTVQP  MKDLLGRLNL  TFDAASYIDR  VSSNVSNLPN
101 IAIAVSGGGY  RALTNGAGAI  KAFDNRTKGS  TAPGQLGGLL  QSATYVSGLS
151 GGGWLVGSVY  VNNFTTISDL  QSGGNGDVWQ  FSTSILEGPK  TRHLQFLSTV
201 DYWRNLLDAV  NGKSNAGFNT  SLTDYWGRAL  SYQFINDPTG  NGGVSYTWSS
251 IALNDSFQRG  EMPLPILVAD  GRNPGERLIG  SNSTVYEFNP  WEFGSFDPSI
301 FGFAPLEYLG  SRFDNGQLPS  GESCVRGFDN  AGFVMGTSSS  LFNQFILRLN
351 TTDLPDLVKA  AFSRILTALG  RDGDDIAIYA  PNPFGYRNS  TAVYSHSREL
401 DVVDGGEDGQ  NIPLHPLIQP  TRHVDVIFAV  DSSADTAYNW  PNGTSLVATY
451 ERSLNSSGIG  NRTVEPAVPD  VNTFVNGLGN  TRPTFFGCDP  ANLSAPAPLV
501 VYLPNAPYSA  HSNTSTFQLS  YADSQRDEII  TNGYNVVTRG  NATADKAWPS
551 CVGCAILQRS  MYRTNTSMPA  VCSSCFKAYC  WNGTVDSKTP  RTYEPSQVVG
601 SKSTSAAAYRE  G

```

Figura 2

1 CCGGGGGGCA GTGCAACGGC AGTGGTTATG GTTCTGGTGG CAGTGCTGG
 51 GGGGGTGATT CGGATGGTGC ATACCAGGAT GAACAAGAGG CTGGAGGAGG
 101 ATGAAAGGGA ACATGAAGTG GAGCATCCAG GTTTTAGATA CATTCTATAA
 151 CTGTCTTTAT AGTATTGAAC ACATGCAGCT GAATAGTGCT GCCTGGACAG
 201 TGTGCATAAA TTATCCGAAG CAGCAAATGG AAAAGATCAC TGCCTAATGC
 251 CCAGCCCTGA CGACAACACA ACGTCTGGAA TCAACCCTAG ACAACCCACA
 301 TTCCCGCGGG GACCGAAGCC TAAATGATTG GCAGTTCTTC TGGCATTTC
 351 ACTGTTTCGT TTTCTATAGC CATCCGATTC GTGGAGAGGG CCATCGGGAG
 401 ATGGGTCGAT GATGATTTAC GGCTGTCCCG GAAGTATGTG CTGACGCGGA
 451 GAACCGAGTA TATCTACTAC GTCAATGTTA GCTATCCTTT GGATTGGCAA
 501 TGTTCTTTCT TTTGAGACAG TGAGAGGTAT CGACATGAAG GCCATTTTCA
 551 CCCTTCTGAC GGCCCTGGCC GTAACGGCAA CTCCTCTCGA CCTGTCTATT
 t l l t a l a v t a t p l d l s i
 601 CGAGCTCTCC CCAACGCCCC CAATGGCTAT ACTCCGGCGA ATGTGCTG
 r a l p n a p n g y t p a n v s
 651 TCCAGCGACA CGACCCAGCA TTCGCGGTGC AGGGTCACTT TCTCCGAATG
 c p a t r p s i r g a g s l s p n
 701 AAACCGCCTG GCTCCAGATC CGTCGCAACA ATACAGTCCA GCCCATGAAG
 e t a w l q i r r n n t v q p m k
 751 GACTTGCTGG GCCGACTGAA TCTCACCTTC GACGCAGCGA GCTACATCGA
 d l l g r l n l t f d a a s y i
 801 TCGCGTGTGC AGTAACGTAT CTAACCTGCC TAATATCGCG ATCGCTGTCT
 d r v s s n v s n l p n i a i a v
 851 CTGGGGGTGG ATACCGGGCT CTGACCAATG GAGCTGGAGC TATAAAGCC
 s g g g y r a l t n g a g a i k a
 901 TTTGACAACC GAACAAAAGG CTCGACTGCA CCTGGACAGC TAGGGGGTCT
 i d n r t k g s t a p g q l g g
 951 ACTGCAGTCT GCCACGTACG TATCTGGACT GAGCGGAGGA GGATGGCTCG
 l l q s a t y v s g l s g g g w l
 1001 TGGGCTCAGT GTATGTGAAC AACTTCACGA CCATCTCGGA CCTCCAATCC
 v g s v y v n n f t t i s d l q s
 1051 GGAGGCAATG GCGACGTATG GCAGTTTTCC ACGTCTATCC TGGAAGGCCC
 g g n g d v w q f s t s i l e g
 1101 CAAGACCAGA CACCTGCAGT TTCTATCCAC AGTCGACTAC TGGAGGAATT
 p k t r h l q f l s t v d y w r n
 1151 TGCTTGATGC AGTCAACGGT AAAAGCAACG CGGGTTTCAA CACCTCGCTA
 l l d a v n g k s n a g f n r s l
 1201 ACTGACTACT GGGGCCGTGC TCTATCCTAC CAGTTCATCA ACGATCCGAC
 t d y w g r a l s y q f i n d p
 1251 TGGAACCGGC GGGGTCAGCT ACACCTGGTC GTCCATCGCC TTGAACGACA
 t g n g g v s y t w s s i a l n d
 1301 GCTTCCAGCG CGGGGAGATG CCACTCCCA TCCTGGTCGC GGACGGCCGC
 s f q r g e m p l p i l v a d g r
 1351 AACCCAGGCG AGCGGCTGAT CGGCAGCAAC TCGACCGTCT ACGAGTTCAA
 n p g e r l i g s n s t v y e f
 1401 CCCGTGGGAG TTTGGCTCGT TCGACCCGTC CATCTTCGGC TTTGCACCGC
 n p w e f g s f d p s i f g f a p
 1451 TCGAGTATCT CGGCTCACGC TTCGACAACG GCCAGCTTCC TAGCGGCGAA
 l e y l g s r f d n g q l p s g e
 1501 TCCTGCGTCC GTGGTTTCGA TAATGCAGGC TTCGTCATGG GCACCTCGTC
 s c v r g f d n a g f v m g t s
 1551 CTCACTCTTC AACCACTTCA TCCTGCGGCT CAACACTACC GATCTCCCGG
 s s l f n q f i l r l n t t d l p
 1601 ACCTGGTCAA GCGGCCTTC TCCAGGATCC TCACCGCGCT AGGTGGGGAT
 d l v k a a f s r i l t a l g r d
 1651 GCGGACGATA TCGCCATCTA CGCCCCAAC CCGTCTACG GGTATCGCAA
 g d d i a i y a p n p f y g y r

1701 CTCGACCGCG GTCTACTCGC ACAGCCGCGA GCTCGACGTC GTCGACGGCG
 n s t a v y s h s r e i o v v d g
 1751 GCGAGGACGG CCAGAATATC CCCTTACACC CCCTCATCCA GCCAACCCGC
 g e d g q n i p l h p l i q p t r
 1801 CACGTCGACG TGATCTTCGC GGTTGACTCC TCGGCCGACA CGGCGTACAA
 h v d v i f a v d s s a d t a y
 1851 CTGGCCGAAT GGGACCTCGC TAGTCGCGAC CTACGAGCGA AGCCTCAACA
 n w p n g t s l v a t y e r s l n
 1901 GCTCGGGAAT CGGCAATAGG ACGGTCTTCC CCGCCGTGCC GGACGTGAAC
 s s g i g n r t v f p a v p d v n
 1951 ACCTTCGTCA ACCTGGGCTT GAACACCAGA CCGACCTTCT TCGGGTGC GA
 t f v n l g l n t r p t f f g c
 2001 TCCCGCGAAT CTGTGCGCGC CGGCGCCCTT GGTGGTATAC CTGCCGAATG
 d p a n l s a p a p l v v y l p n
 2051 CGCCGTACAG CGCGCATAGC AACACCTCCA CCTTCCAGTT GTCGTACGCG
 a p y s a h s n t s t f q l s y a
 2101 GATTCCAGC GCGATGAGAT CATCACGAAT GGGTATAACG TTGTGACGCG
 d s q r d e i i t n g y n v v t
 2151 GGGGAATGCA ACCGCCGACA AGGCTGGCC GAGCTGTGTG GGGTGTGCCA
 r g n a t a d k a w p s c v g c a
 2201 TTCTGCAGCG GTCGATGTAT CGGACCAACA CGTCCATGCC GGCGGTGTGT
 i l q r s m y r t n t s m p a v c
 2251 TCCAGTTGCT TCAAGGCGTA TTGCTGGAAC GGGACGGTGG ATAGCAAGAC
 s s c f k a y c w n g t v d s k
 2301 TCCTCGGACT TATGAGCCGA GCCAGGTGGT GGGGAGTAAG TCCACGTCTG
 t p r t y e p s q v v g s k s t s
 2351 CGGCTTACAG GGAGGGTTGA ATTGCTGGT GGGCGGGTTT GCTGTTGGGC
 a a y r e g -
 2401 TGGGAGTGTG GACAGTTTAC ACAGATGGCA TAAATCTATC TCGCTGTTAT
 2451 TTGCGCCATC TACTCGCTAG CACCTCTTCC GTATACTGTA GGTGCTAGCA
 2501 TCCCGGG

Figura 3

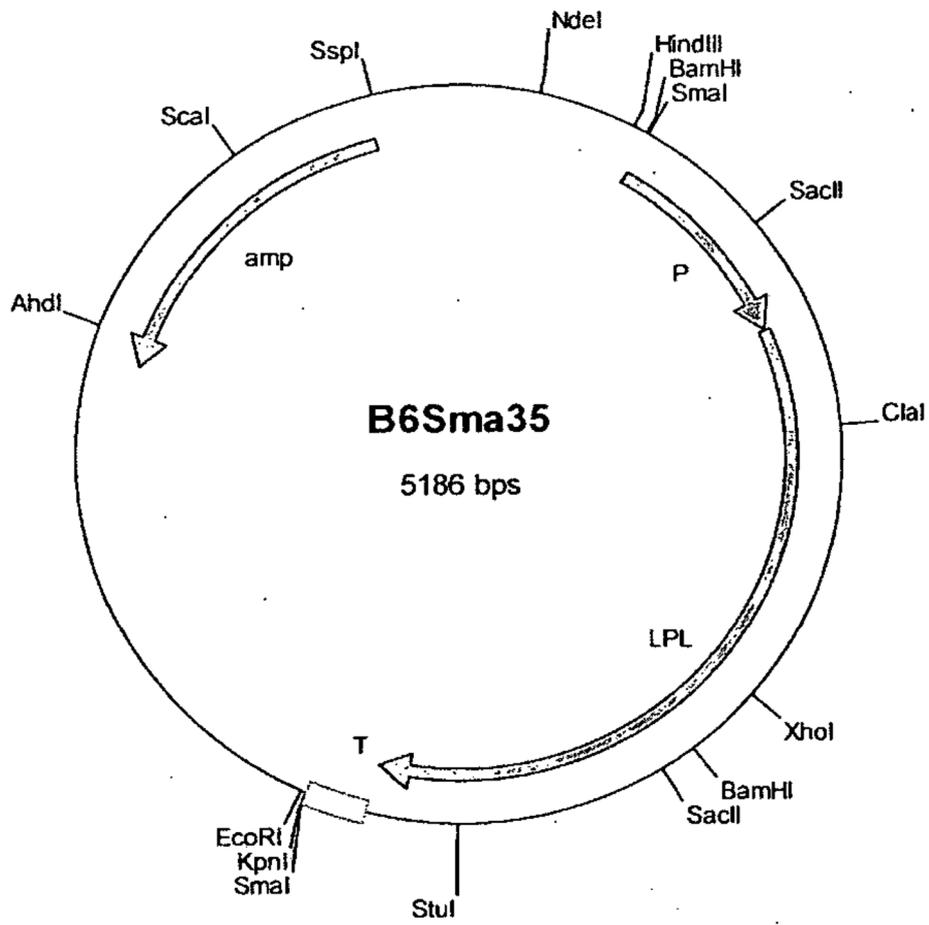


Figura 4

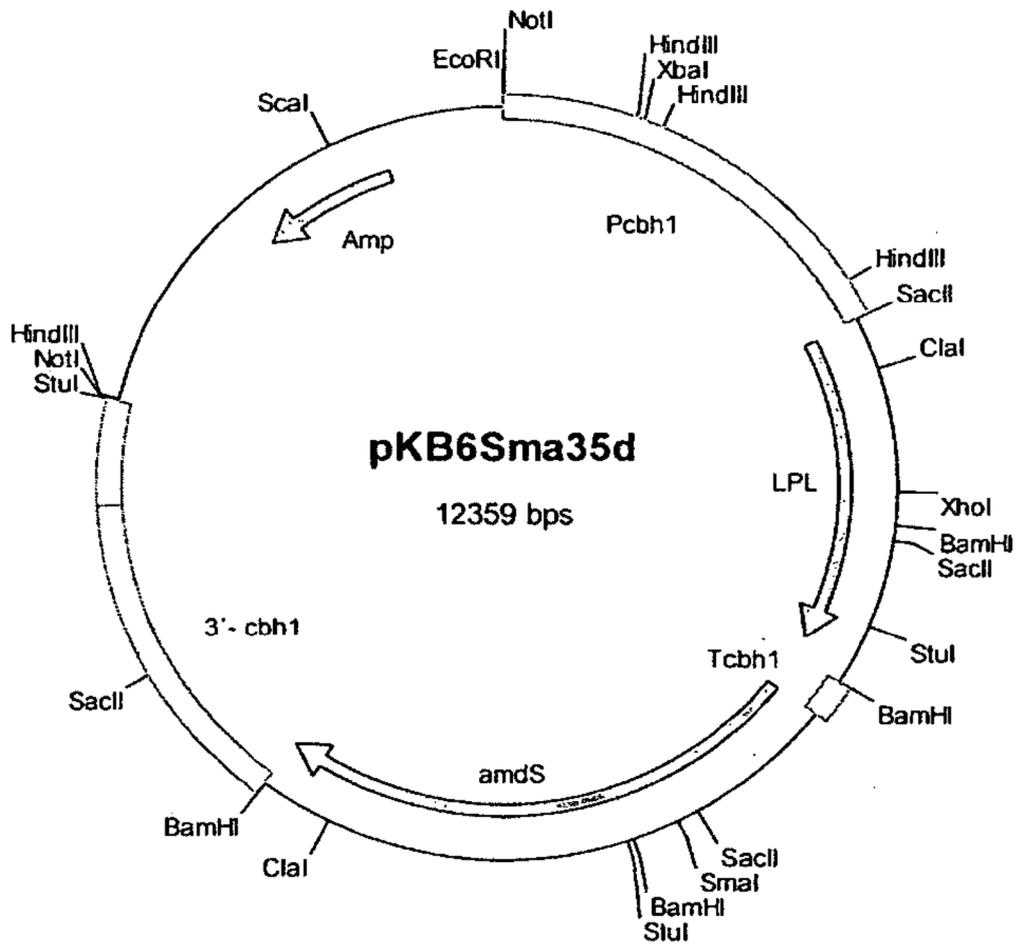


Figura 5