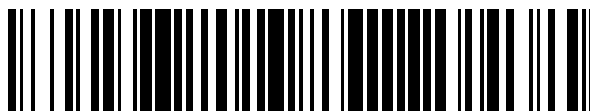


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 590 037**

51 Int. Cl.:

C11D 3/386 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2010 PCT/US2010/051903**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011 WO11046812**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2010 E 10823862 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.06.2016 EP 2488542**

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

30 Prioridad:

16.10.2009 US 252313 P

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

17.11.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**BARTON, NELSON, R.;
HITCHMAN, TIM, S.;
LYON, JONATHAN, D.;
O'DONOGHUE, EILEEN y
WALL, MARK, A.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 590 037 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

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

REFERENCIA AL LISTADO DE SECUENCIAS PRESENTADO VÍA EFS-WEB

- 5 Esta solicitud se presentó electrónicamente vía el servidor de USPTO EFS-WEB, como se autoriza y se expone en MPEP §502.05(IX), y esta presentación electrónica incluye un listado de secuencias (SEQ ID) presentado electrónicamente; todo el contenido de este listado de secuencias se incorpora aquí como referencia para todos los fines. El listado de secuencias se identifica en el archivo.txt presentado electrónicamente como sigue:

Nombre del archivo	Fecha de creación	Tamaño
20101002_Sequence_Listing_D12506WO.txt	2 de octubre de 2010	17.881 bites

CAMPO DE LA INVENCIÓN

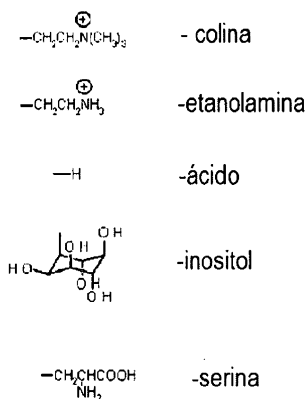
- 10 Esta invención en general se refiere a enzimas de fosfolipasa, a polinucleótidos que codifican las enzimas, a métodos para obtener y utilizar estos polinucleótidos y polipéptidos. En realizaciones alternativas, la invención proporciona enzimas de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), ácidos nucleicos que codifican éstas, anticuerpos que se unen específicamente a éstas, y métodos para obtenerlas y utilizarlas. Se proporcionan métodos industriales y productos que comprenden el uso de estas fosfolipasas. También se proporcionan aquí
- 15 métodos para la hidratación de fosfolípidos no hidratables (NHPs) dentro de una matriz de lípido. Los métodos posibilitan la migración de los NHPs a una interfaz aceite-agua permitiendo por consiguiente que los NHPs sean reaccionados y/o eliminados de los lípidos. En ciertas realizaciones, se proporcionan métodos para eliminar NHPs, fosfolípidos hidratables, y lecitinas (conocidos colectivamente como "gomas") de los aceites vegetales para producir un producto de grasa o aceite desgomado que se puede utilizar para la producción de alimentos y/o aplicaciones no
- 20 alimentarias. En ciertas realizaciones, se proporcionan aquí métodos para la hidratación de NHPs seguido del tratamiento enzimático y la eliminación de varios fosfolípidos y lecitinas. Los métodos proporcionados aquí se pueden practicar sobre ya sea aceites desgomados con agua o brutos. En cierta realización, se proporcionan aquí métodos para obtener fosfolípidos a partir de un aceite comestible.

ANTECEDENTES

- 25 Los aceites vegetales brutos obtenidos a partir de ya sea métodos de prensado o extracción con disolventes son una mezcla compleja de triacilgliceroles, fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, ácidos grasos libres, metales en trazas, y otros compuestos menores. Es deseable eliminar los fosfolípidos, ácidos grasos libres y metales en trazas a fin de producir un aceite para ensaladas de calidad con un sabor blando, color ligero, y una larga vida de anaquel o un
- 30 aceite adecuado para la transformación en una alimentación lista para la conversión química o enzimática en un biocombustible (ésteres metílicos o etílicos), bio-plástico (aceite epoxidado), y otros materiales tradicionales basados en petróleo.

- La eliminación de fosfolípidos genera casi todas las pérdidas asociadas con el refinado de los aceites vegetales. La mayoría de las moléculas de fosfolípidos poseen tanto un grupo funcional hidrofílico como cadenas de ácidos grasos lipofílicos, tienen tendencia a ser excelentes emulsionantes naturales. El grupo funcional en los fosfolípidos puede
- 35 ser cualquiera de varios de una variedad de tipos conocidos, unos cuantos de los cuales se ilustran en el esquema 1 debajo.

Esquema 1: Grupos funcionales en los fosfolípidos



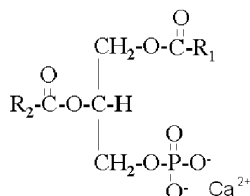
Grupos funcionales

5 Los fosfolípidos que contienen los grupos funcionales -colina, -inositol y -etanolamina tienen la afinidad más grande por el agua, mientras que los ácidos, sales de ácidos (Calcio (Ca), Magnesio (Mg), y Hierro (Fe)), y sales de -etanolamina (Ca, Mg, y Fe) tienen las afinidades mucho más bajas por el agua. El ácido fosfatídico y las sales de ácido fosfatídico son comúnmente conocidos como "fosfolípidos no hidratables" o NHPs. La Tabla 1 contiene las tasas relativas de hidratación de diferentes fosfolípidos según se reporta por Sen Gupta, A. K., Fette Seifen Anstrichmittel 88 pages 79 - 86 (1986), y más tarde por Segers, J.C., et al., "Degumming-Theory and Practice" publicado por American Oil Chemists's Society en "Edible fats and Oils processing: basic principals and modern practices: World conference proceedings"/editado por David Erickson, (1990) páginas 88-93.

Tabla 1: Tasas Relativas de Hidratación

Fosfolípidos	Tasa relativa de hidratación
Fosfatidilcolina (PC)	100
Fosfatidilinositol (PI)	44
Sal de calcio de fosfatidilinositol	24
Fosfatidiletanolamina (PE)	16
Ácido fosfatídico (PA)	8,5
Sal de calcio de fosfatidiletanolamina	0,9
Sal de calcio de ácido fosfatídico	0,6

10 Las sales de calcio, magnesio, y hierro de los fosfolípidos se forman por una enzima presente en las semillas oleaginosas, la fosfolipasa D (PLD). La enzima permanece latente dentro de la semilla madura hasta que el recubrimiento protector de la semilla se ha dañado durante el almacenamiento o las "preparaciones" de la semilla antes de la eliminación del aceite. La reacción de la PLD dentro de la semilla escindirá la -colina, -inositol, -serina o etanolamina a partir del grupo fosfato produciendo el Ácido Fosfatídico (PA). Adicionalmente, debido a que la escisión ocurre en la presencia de una abundancia de metales divalentes (Ca, Mg, y Fe), se forman los NHPs. El complejo de ión de calcio del ácido fosfatídico se muestra debajo:



Sal de Calcio del Ácido Fosfatídico

20 Los fosfolípidos comúnmente se miden en el aceite como "contenido de fósforo" en partes por millón. La Tabla 2 establece las cantidades típicas de los fosfolípidos presentes en los cultivos de semillas oleaginosas principales, y la distribución de los diversos grupos funcionales como un porcentaje de los fosfolípidos presentes en el aceite.

Tabla 2: Niveles típicos y distribuciones de los fosfolípidos para las semillas oleaginosas comunes

	Aceite de soja	Aceite de cáñola	Aceite de girasol
Fósforo (ppm)	400 - 1500	200 - 900	300 - 700
PC (%)	12 - 46	25 - 40	29 - 52
PE (%)	8 - 34	15 - 25	17 - 26
PA (%)	2 - 21	10 - 20	15 - 30
PS (%)	< 0,5	< 0,5	< 0,5
PI (%)	2 - 15	2 - 25	11 - 22

5 La Tabla 3 debajo proporciona las cantidades típicas de los fosfolípidos y las distribuciones para las gomas de soja. En la Tabla 3, “según se encuentra” significa la composición típica del fosfolípido eliminado del aceite vegetal con el aceite arrastrado (2 moléculas de fosfolípidos y 1 molécula de aceite), produciendo un contenido Insoluble de Acetona de 67%. “Normalizado” significa la composición del fosfolípido sin aceite alguno presente, produciendo un contenido Insoluble de Acetona de 100%.

Tabla 3: Cantidades Típicas de los Fosfolípidos y Distribuciones para las Gomas de Soja

	Porcentaje “según se encuentra”	Porcentaje “normalizado”
Fosfatidilcolina (PC)	33,9	47,2
Fosfatidiletanolamina (PE)	14,3	19,9
Fosfatidilserina (PS)	0,4	0,6
Ácido fosfatídico (PA)	6,4	8,9
Fosfatidilinositol (PI)	16,8	23,4
Total	71,8	100,0

10 La conversión de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico en cualquiera de sus formas liso o fosfo cambia grandemente la economía del desgomado en una operación moderna de refinado industrial. La conversión de todos los fosfolípidos en sus formas liso eliminando la pérdida de aceite neutro representa un incremento en el rendimiento del aceite de hasta 1,4%, mientras que convertir todos los fosfolípidos en sus formas fosfo- representa un incremento del rendimiento del aceite de hasta 3,0% para un aceite bruto sobre el desgomado con agua que contiene 1000 ppm de fósforo.

15 Los fosfolípidos se pueden eliminar parcialmente o totalmente de los aceites vegetales a través de diversos medios conocidos diferentes. Los procedimientos más comúnmente utilizados en la industria son el desgomado con agua, desgomado con ácido, refinado cáustico y desgomado enzimático. Procedimientos ejemplares se describen en las Patentes U.S. n^{os} 4.049.686; 4.698.185; 5.239.096; 5.264.367; 5.286.886; 5.532.163; 6.001.640; 6.103.505; U.S. 6.127.137; 6.143.545; 6.172.248; 6.548.633; 7.494.676; y 7.226.771, y publicaciones U.S. n^{os} 2007/0134777, 2005/0059130, 2008/0182322, y 2009/0069587.

20 Los métodos existentes no son suficientes para eliminar o hacer reaccionar los fosfolípidos no hidratables presentes en el aceite debido a que los NHPs no están disponibles para ser hidratados o reaccionados para posibilitar su eliminación.

25 Existe una necesidad de métodos eficientes y efectivos en coste para eliminar NHPs, fosfolípidos hidratables, y lecitinas (conocidos colectivamente como “gomas”) de los aceites vegetales para producir un producto de grasa o aceite desgomado que se pueda utilizar para la producción de alimentos y/o aplicaciones no alimentarias.

30 Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan los enlaces de éster de los fosfolípidos. Correspondiendo a su importancia en el metabolismo de los fosfolípidos, estas enzimas se esparcen entre las procariotas y eucariotas. Las fosfolipasas afectan el metabolismo, la construcción y la reorganización de las membranas biológicas y están involucradas en las cascadas de señales. Se conocen varios tipos de fosfolipasas que difieren en su especificidad de acuerdo con la posición del enlace atacado en la molécula de fosfolípido.

Las enzimas de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) son una familia de enzimas intracelulares eucariotas que juegan un papel importante en los procesos de transducción de señales. La reacción catalizada de PI-PLC es: 4,5-bisfosfato de 1-fosfatidil-1D-mio-inositol (también denominado PIP₂, bisfosfato de fosfatidilinositol) + H₂O ↔ 1,4,5-trisfosfato de 1D-mio-inositol (también denominado IP₃, trifosfato de inositol) + diacilglicerol

35 Las familias de las enzimas de fosfolipasa C (PLC) se han identificado en bacterias y en tripanosomas eucariotas. Las enzimas PLC pertenecen a la familia de las hidrolasas y las fosfodiesterasas. La PLC participa en el metabolismo del 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) y en las rutas de señalización del lipido en una manera dependiente del calcio. Las isoformas de la PLC pueden diferir en su modo de activación, niveles de expresión, regulación catalítica, localización celular, avidéz de unión a la membrana y distribución del tejido. Todas son capaces de catalizar la hidrólisis de PIP₂ en dos importantes segundas moléculas mensajeras, que proceden a alterar las respuestas de la célula tales como la proliferación, diferenciación, apoptosis, remodelación del citoesqueleto, tráfico vesicular, conductancia del canal iónico, función endocrina y neurotransmisión. Las PLCs se describen en, por

40

ejemplo, Carmen, G., J. Biol. Chem. 270 (1995) 18711-18714, Jianag, Y., J. Biol. Chem, 271 (1996) 29528-29532, Waggoner, D., J. Biol. Chem. 270 (1995) 19422-19429, Molecular Probes Product Sheet 2001, y Sano et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 281:844-851, 2001.

5 Las enzimas de fosfolipasa A1 (PLA1) eliminan el ácido graso de la posición 1 para producir ácido graso libre y 1-liso-2-acilfosfolípido. Las enzimas de fosfolipasa A2 (PLA2) eliminan el ácido graso de la posición 2 para producir ácido graso libre y 1-acil-2-lisofosfolípido. Las enzimas de PLA1 y PLA2 pueden ser intra- o extra-celulares, se pueden unir a la membrana o pueden ser solubles. La PLA2 intracelular se encuentra en casi todas las células mamíferas. Las enzimas de fosfolipasa C (PLC) eliminan el radical fosfato para producir 1,2-diacilglicerol y un éster de fosfato. Las enzimas de fosfolipasa D (PLD) producen 1,2-diacilglicerofosfato y un grupo base.

10 SUMARIO DE LA INVENCION

Se proporcionan aquí polipéptidos y polinucleótidos que codifican los polipéptidos que tienen una actividad de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) o de una enzima equivalente, y/u otra actividad de fosfolipasa, incluyendo una actividad de fosfolipasa A, B, C, D, patatina, fosfatasa del ácido fosfatídico (PAP) y/o lípido acil-hidrolasa (LAH) o de una actividad enzimática equivalente, y métodos para obtener y utilizar estos polinucleótidos y polipéptidos. En un aspecto, se proporcionan aquí polipéptidos, por ejemplo, enzimas, que tienen una actividad de fosfolipasa, por ejemplo, actividad de fosfolipasa A, B, D o C, por ejemplo actividad de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC). Las actividades enzimáticas de los polipéptidos y péptidos según se proporcionan aquí incluyen (comprenden o consisten en) una actividad de fosfolipasa, una actividad de fosfolipasa C, o una actividad de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), incluyendo la hidrólisis de lípidos, reacciones de acidólisis (por ejemplo, reemplazar un ácido graso esterificado por un ácido graso libre), reacciones de transesterificación (por ejemplo, intercambio de ácidos grasos entre triacilglicéridos), síntesis de ésteres, reacciones de intercambio de ésteres y actividad de lípido acil-hidrolasa (LAH). En otro aspecto, los polipéptidos según se proporcionan aquí se utilizan para sintetizar productos quirales enantioméricamente puros. Los polipéptidos según se proporcionan aquí se pueden utilizar en una variedad de contextos farmacéuticos, agrícolas e industriales, incluyendo la fabricación de cosméticos y nutracéuticos. Adicionalmente, los polipéptidos según se proporcionan aquí se pueden utilizar en el procesamiento de alimentos, fabricación de cerveza, aditivos de baño, producción de alcohol, síntesis de péptidos, enantioselectividad, preparación de la piel de animal en la industria del cuero, manejo de los desperdicios y degradación de los desperdicios animales, recuperación de la plata en la industria fotográfica, tratamiento médico, desgomado de la seda, degradación de biopelículas, conversión de biomasa a etanol, biodefensa, agentes antimicrobianos y desinfectantes, cuidado personal y cosmética, reactivos de biotecnología, en incrementar el rendimiento del almidón de la molienda húmeda del maíz, y como fármacos tales como adyuvantes digestivos y agentes anti-inflamatorios (antiflogísticos).

En ciertas realizaciones, se proporcionan aquí composiciones (por ejemplo, fosfolipasa, fosfolipasa C, fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC)) y métodos para producir aceites con bajo contenido de fosfolípidos, por ejemplo, aceites con un contenido más bajo de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y/o ácido fosfatídico. Cualquier aceite, por ejemplo aceite vegetal, por ejemplo aceite de cáñola, aceite de soja, o aceite animal o grasa, por ejemplo, sebo, se puede tratar con una composición, o mediante un método, según se proporciona aquí. Cualquier alimento, producto comestible, o producto horneado, frito o cocinado (por ejemplo, salsas, escabeches, condimentos, aceites en aerosol, margarinas, aceites de horneado, mayonesa, aceites de cocinado, aceites para ensaladas, aderezos que se aplican con cuchara y que se pueden verter, y similares, y productos obtenidos con los mismos) pueden comprender un aceite vegetal o grasa animal que se ha tratado con una composición o mediante un método según se proporciona aquí. Los aceites vegetales modificados para ser aceites con contenido más bajo de fosfolípidos se pueden utilizar en cualquier alimento, producto comestible o producto horneado o cocinado, por ejemplo, salsas, escabeches, condimentos, aceites en aerosol, margarinas, aceites de horneado, mayonesa, aceites de cocinado, aceites para ensaladas, aderezos que se aplican con cuchara y que se pueden verter, y similares. En una realización, se proporcionan aquí aceites, tales como aceites vegetales, por ejemplo, aceite de cáñola o aceite de soja, y alimentos o productos horneados o cocinados, incluyendo salsas, escabeches, condimentos, aceites en aerosol, margarinas, mayonesa, aceites de horneado, aceites de cocinado, aceites de freidura, aceites para ensaladas, aderezos que se aplican con cuchara y que se pueden verter, y similares, en donde el aceite o alimento, producto horneado o cocinado se ha modificado utilizando una enzima según se proporciona aquí. En un aspecto, estos aceites vegetales, por ejemplo el aceite de cáñola, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de avellanas, aceite de cáñamo, aceite de linaza, aceite de limnanthes alba, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de taloil, aceite de tsubaki, variedades de aceites "naturales" que tienen composiciones de ácidos grasos alteradas por medio de Organismos Genéticamente Modificados (GMO) o "producción" tradicionales tales como aceites con alto contenido de ácido oleico, con bajo contenido de ácido linolénico, o poco saturados (aceite de cáñola con alto contenido de ácido oleico, aceite de soja con bajo contenido de ácido linolénico o aceites de girasol con alto contenido de ácido esteárico), grasas animales (sebo, manteca, grasa de la manteca, y grasa de pollo), aceites de pescado (aceite de eulacón, aceite de hígado de bacalao, aceite de reloj anaranjado, aceite de sardina, aceite de arenque, y aceite lacha), o mezclas de cualesquiera de lo anterior, y alimentos o productos horneados, fritos o cocinados, comprenden aceites con un contenido más bajo de ácidos grasos saturados,

incluyendo aceites con bajo contenido de ácido palmítico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido esteárico, ácido caprílico (ácido octanoico), etc., procesados utilizando una composición o método según se proporciona aquí.

5 En un aspecto, se proporcionan aquí polipéptidos, por ejemplo, enzimas y anticuerpos catalíticos, que tienen una actividad de fosfolipasa, por ejemplo, fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), incluyendo actividades enzimáticas termoestables y termotolerantes, y actividades selectivas a los ácidos grasos o específicas para los ácidos grasos, y actividades enzimáticas tolerantes a bajo o alto pH, y polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, incluyendo vectores, células hospedantes, plantas transgénicas y animales no humanos, y métodos para obtener y utilizar estos polinucleótidos y polipéptidos.

En otro aspecto, se proporcionan aquí ácidos nucleicos aislados, sintéticos o recombinantes

10 (a) que codifican un polipéptido que tiene una actividad de enzima fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, por ejemplo una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), y

15 (i) que tienen al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o 100% de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 5 y que codifican un polipéptido que tiene al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis, veintisiete, veintiocho, veintinueve o treinta o más, o todos, los cambios (mutaciones) de aminoácidos que consisten en aquellos descritos en la Tabla 12, Tabla 13, Tabla 14 y/o Tabla 15, o sustituciones o mutaciones de aminoácidos equivalentes, o cualquier combinación de los mismos,

20 y opcionalmente las identidades de secuencia se determinan mediante análisis con un algoritmo de comparación de secuencias o mediante una inspección visual,

y opcionalmente el algoritmo de comparación de secuencias es un algoritmo BLAST versión 2.2.2 donde una configuración del filtrado se establece a blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F, y todas las demás opciones se establecen a predeterminado;

25 (ii) que codifican un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos según se establece en la SEQ ID NO:6 y que tiene al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis, veintisiete, veintiocho, veintinueve o treinta o más, o todos, los cambios o sustituciones (mutaciones) de aminoácidos que consisten en aquellos descritos en la Tabla 12, Tabla 13, Tabla 14 y/o Tabla 15, o cambios o sustituciones (mutaciones) de aminoácidos equivalentes, o cualquier combinación de los mismos; o

30 (iii) hibridan bajo condiciones rigurosas a un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 5 y que codifica un polipéptido que tiene al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis, veintisiete, veintiocho, veintinueve, o treinta o más, o todos, los cambios (mutaciones) de aminoácidos que consisten en aquellos descritos en la Tabla 12, Tabla 13, Tabla 14 y/o Tabla 15, o cambios o sustituciones (mutaciones) de aminoácidos equivalentes, o cualquier combinación de los mismos,

35 en donde las condiciones rigurosas comprenden una etapa de lavado que comprende un lavado en 0,2X SSC a una temperatura de aproximadamente 65°C durante aproximadamente 15 minutos;

40 (iv) un ácido nucleico que comprende o que consiste en la secuencia SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10; o

45 (v) que tiene al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o 100% de identidad de secuencia a la SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO: 10;

(b) la secuencia de ácidos nucleicos de (a) que codifica polipéptido que tiene la actividad de enzima fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, por ejemplo una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) pero que carece de una secuencia señal nativa o una secuencia de aminoácidos de proproteína;

50 (c) la secuencia de ácidos nucleicos de (a) o (b) que codifica un polipéptido que tiene la actividad de enzima fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, por ejemplo una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) pero que carece de una secuencia de promotor nativa;

(d) el ácido nucleico de (c) que adicionalmente comprende una secuencia de promotor heteróloga u otra secuencia reguladora de transcripción;

(e) la secuencia de ácidos nucleicos de cualquiera de (a) a (d) que adicionalmente comprende un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos heteróloga, o que adicionalmente comprende una secuencia nucleotídica heteróloga;

5 (f) el ácido nucleico de (e), en donde el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos heteróloga comprende, o consiste en, una secuencia que codifica una secuencia señal heteróloga (líder), o una marca o un epítipo, o la secuencia nucleotídica heteróloga comprende una secuencia de promotor heterólogo;

10 (g) el ácido nucleico de (d), (e) o (f), en donde la secuencia nucleotídica heteróloga codifica una secuencia señal heteróloga (líder) que comprende o que consiste en una extensión N-terminal y/o C-terminal para tener como objetivo un retículo endoplásmico (ER) o una endomembrana, o para tener como objetivo un retículo endoplásmico (ER) vegetal o un sistema de endomembrana, o la secuencia heteróloga codifica un sitio de restricción;

(h) el ácido nucleico de (d), (e) o (f), en donde la secuencia de promotor heterólogo comprende o consiste en un promotor constitutivo o inducible, o un promotor específico del tipo de célula, o un promotor específico de la planta, o un promotor específico de las bacterias;

15 (i) el ácido nucleico de cualquiera de (a) a (h), en donde la actividad de fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, por ejemplo una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) es termoestable;

(j) el ácido nucleico de cualquiera de (a) a (h), en donde la actividad de fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, por ejemplo una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) es termotolerante;

20 (k) una secuencia de ácidos nucleicos completamente complementaria para la secuencia nucleotídica de cualquiera de (a) a (j).

En un aspecto, el ácido nucleico aislado, sintético o recombinante codifica un polipéptido o péptido que tiene una actividad de fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, por ejemplo una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), que es termoestable. Los polipéptidos y péptidos codificados por los ácidos nucleicos según se proporciona aquí, o cualquier polipéptido o péptido según se proporciona aquí, pueden retener actividad enzimática o de unión (por ejemplo unión al sustrato) bajo condiciones que comprenden un rango de temperatura de entre aproximadamente -100°C hasta aproximadamente -80°C, aproximadamente -80°C hasta aproximadamente -40°C, aproximadamente -40°C hasta aproximadamente -20°C, aproximadamente -20°C hasta aproximadamente 0°C, aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 5°C, aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 15°C, aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 25°C, aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 37°C, aproximadamente 37°C hasta aproximadamente 45°C, aproximadamente 45°C hasta aproximadamente 55°C, aproximadamente 55°C hasta aproximadamente 70°C, aproximadamente 70°C hasta aproximadamente 75°C, aproximadamente 75°C hasta aproximadamente 85°C, aproximadamente 85°C hasta aproximadamente 90°C, aproximadamente 90°C hasta aproximadamente 95°C, aproximadamente 95°C hasta aproximadamente 100°C, aproximadamente 100°C hasta aproximadamente 105°C, 5 aproximadamente 105°C hasta aproximadamente 110°C, aproximadamente 110°C hasta aproximadamente 120°C, o 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C o más. Se proporcionan aquí los polipéptidos termoestables que retienen una actividad de fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, por ejemplo una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), a una temperatura en los rangos descritos anteriormente, a aproximadamente pH 3,0, aproximadamente pH 3,5, aproximadamente pH 4,0, aproximadamente pH 4,5, aproximadamente pH 5,0, aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 8,0, aproximadamente pH 8,5, aproximadamente pH 9,0, aproximadamente pH 9,5, aproximadamente pH 10,0, aproximadamente pH 10,5, aproximadamente pH 11,0, aproximadamente pH 11,5, aproximadamente pH 12,0 o más.

45 En un aspecto, los polipéptidos según se proporcionan aquí pueden ser termotolerantes y pueden retener una actividad de fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, por ejemplo una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) después de la exposición a una temperatura en el rango de aproximadamente -100°C hasta aproximadamente -80°C, aproximadamente -80°C hasta aproximadamente -40°C, aproximadamente -40°C hasta aproximadamente -20°C, aproximadamente -20°C hasta aproximadamente 0°C, aproximadamente 0°C hasta aproximadamente 5°C, aproximadamente 5°C hasta aproximadamente 15°C, aproximadamente 15°C hasta aproximadamente 25°C, aproximadamente 25°C hasta aproximadamente 37°C, aproximadamente 37°C hasta aproximadamente 45°C, aproximadamente 45°C hasta aproximadamente 55°C, aproximadamente 55°C hasta aproximadamente 70°C, aproximadamente 70°C hasta aproximadamente 75°C, aproximadamente 75°C hasta aproximadamente 85°C, aproximadamente 85°C hasta aproximadamente 90°C, aproximadamente 90°C hasta aproximadamente 95°C, aproximadamente 95°C hasta aproximadamente 100°C, aproximadamente 100°C hasta aproximadamente 105°C, aproximadamente 105°C hasta aproximadamente 110°C, aproximadamente 110°C hasta aproximadamente 120°C, o 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C o más.

- En algunas realizaciones, los polipéptidos termotolerantes retienen una actividad de fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, por ejemplo una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), después de la exposición a una temperatura en los rangos descritos anteriormente, a aproximadamente pH 3,0, aproximadamente pH 3,5, aproximadamente pH 4,0, aproximadamente pH 4,5, aproximadamente pH 5,0, aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 8,0, aproximadamente pH 8,5, aproximadamente pH 9,0, aproximadamente pH 9,5, aproximadamente pH 10,0, aproximadamente pH 10,5, aproximadamente pH 11,0, aproximadamente pH 11,5, aproximadamente pH 12,0 o más.
- En otro aspecto, se proporcionan aquí sondas de ácido nucleico o cebadores de amplificación para aislar, obtener y/o identificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC). En una realización, una sonda de ácido nucleico, por ejemplo, una sonda para identificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), comprende una sonda que comprende o que consiste en al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o más, bases consecutivas de una secuencia según se proporciona aquí, o fragmentos o subsecuencias de las mismas, en donde la sonda identifica el ácido nucleico mediante unión o hibridación. La sonda puede comprender un oligonucleótido que comprende al menos aproximadamente 10 a 50, aproximadamente 20 a 60, aproximadamente 30 a 70, aproximadamente 40 a 80, o aproximadamente 60 a 100 bases consecutivas de una secuencia que comprende una secuencia según se proporciona aquí, o fragmentos o subsecuencias de las mismas. La sonda puede comprender un oligonucleótido que comprende al menos aproximadamente 10 a 50, aproximadamente 20 a 60, aproximadamente 30 a 70, aproximadamente 40 a 80, o aproximadamente 60 a 100 bases consecutivas de una secuencia de ácidos nucleicos según se proporciona aquí, o una subsecuencia de las mismas.
- En una realización, un par de secuencias de cebadores de amplificación para amplificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), comprende un par de cebadores que comprende o que consiste en un par de cebadores capaces de amplificar un ácido nucleico que comprende una secuencia según se proporciona aquí, o fragmentos o subsecuencias de la misma. Un miembro o cada miembro del par de secuencias de cebadores de amplificación puede comprender un oligonucleótido que comprende al menos aproximadamente 10 a 50 bases consecutivas de la secuencia.
- En una realización, los métodos para amplificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), comprenden la amplificación de un ácido nucleico molde con un par de secuencias de cebadores de amplificación capaces de amplificar una secuencia de ácidos nucleicos según se proporciona aquí, o fragmentos o subsecuencias de la misma.
- En una realización, los vectores, casetes de expresión, vectores de expresión, plásmidos, o vehículos de clonación comprenden un ácido nucleico según se proporciona aquí o una subsecuencia del mismo. En un aspecto, el vector, casete de expresión, vector de expresión, plásmido, o vehículo de clonación puede comprender o está contenido en un vector viral, un fago, un fagómido, un cósmido, un fósmido, un bacteriófago, un cromosoma artificial, un vector de adenovirus, un vector retroviral, o un vector viral adeno-asociado; o, un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un vector derivado del bacteriófago P1 (PAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), o un cromosoma artificial de mamífero (MAC).
- En una realización, los casetes de expresión comprenden un ácido nucleico según se proporciona aquí o una subsecuencia del mismo. En un aspecto, el casete de expresión puede comprender el ácido nucleico que se enlaza de manera operativa a un promotor. El promotor puede ser un promotor viral, bacteriano, mamífero o vegetal. En un aspecto, el promotor vegetal puede ser un promotor de patata, arroz, maíz, trigo, tabaco o cebada. El promotor puede ser un promotor constitutivo. El promotor constitutivo puede comprender CaMV35S. En otro aspecto, el promotor puede ser un promotor inducible. En un aspecto, el promotor puede ser un promotor específico al tejido o un promotor ambientalmente regulado o un promotor regulado conforme al desarrollo. De esta manera, el promotor puede ser, por ejemplo, un promotor específico a la semilla, un promotor específico a la hoja, un promotor específico a la raíz, un promotor específico al tallo o un promotor inducido por abscisión. En un aspecto, el casete de expresión adicionalmente puede comprender un vector de expresión de virus vegetal o vegetal.
- En una realización, una célula hospedante o una célula transformada comprenden un ácido nucleico según se proporciona aquí. En un aspecto, la célula hospedante o una célula transformada puede ser una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal. En un aspecto, la célula vegetal puede ser una célula de patata, trigo, arroz, maíz, tabaco o cebada. La célula transformada puede ser cualquiera de las células hospedantes familiares para aquellos experimentados en la técnica, incluyendo células procariotas, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células de mamífero, células de insecto, o células vegetales. Las células bacterianas ejemplares incluyen cualquier especie dentro del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y

Staphylococcus, incluyendo, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus Subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Las células fúngicas ejemplares incluyen cualquier especie de *Aspergillus*. Las células de levadura ejemplares incluyen cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Schwanniomyces*, incluyendo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de insecto ejemplares incluyen cualquier especie de *Spodoptera* o *Drosophila*, incluyendo *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Las células animales ejemplares incluyen CHO, COS, o melanoma Bowes o cualquier línea celular humana o de ratón.

En otra realización, los animales no humanos transgénicos comprenden un ácido nucleico según se proporciona aquí o un vector, casete de expresión, vector de expresión, plásmido, o vehículo de clonación según se proporciona aquí. El animal no humano transgénico puede ser un ratón, una rata, una cabra, un conejo, una oveja, un cerdo o una vaca.

En una realización, una semilla o planta transgénica comprende un ácido nucleico según se proporciona aquí o un vector, casete de expresión, vector de expresión, plásmido, o vehículo de clonación según se proporciona aquí. En una realización, la planta es una planta de maíz, una planta de sorgo, una planta de patata, una planta de tomate, una planta de trigo, una planta de semillas oleaginosas, una planta de colza, una planta de soja, una planta de arroz, una planta de cebada, una planta de pasto, una planta de semilla de algodón, una planta de palma, una planta de sésamo, una planta de cacahuete, una planta de girasol, o una planta de tabaco; la semilla transgénica. En una realización, la semilla es una semilla de maíz, una semilla de trigo, una semilla oleaginosa, una semilla de colza, una semilla de soja, una semilla de palma, una semilla de girasol, una semilla de sésamo, una semilla de arroz, una semilla de cebada, una semilla de cacahuete, una semilla de algodón, una semilla de palma, una semilla de cacahuete, una semilla de sésamo, una semilla de girasol o una semilla de planta de tabaco.

En un aspecto, se proporciona aquí un oligonucleótido antisentido o ARN inhibidor que comprende o que consiste en un ácido nucleico según se proporciona aquí.

En otro aspecto, se proporciona aquí un método para inhibir la traducción de un mensaje de la fosfolipasa (transcrito, ARNm) en una célula, que comprende administrar a la célula o expresar en la célula un oligonucleótido antisentido o ARN inhibidor que comprende o que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos proporcionada aquí.

En una realización, los polipéptidos aislados, sintéticos o recombinantes tienen una actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), o los polipéptidos capaces de generar una respuesta inmune específica para una fosfolipasa, por ejemplo la fosfolipasa C, por ejemplo la fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) (por ejemplo, un epítipo); y en aspectos alternativos los péptidos y polipéptidos según se proporcionan aquí, comprenden una secuencia:

(a) que comprende una secuencia de aminoácidos:

(i) que tiene al menos 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o 100% de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 6, y que tiene al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis, veintisiete, veintiocho, veintinueve o treinta o más, o todos, los cambios o sustituciones (mutaciones) de aminoácidos que consisten en aquellos descritos en la Tabla 12, Tabla 13, Tabla 14 y/o Tabla 15, o cambios o sustituciones (mutaciones) de aminoácidos equivalentes, o cualquier combinación de los mismos,

en donde opcionalmente las identidades de secuencia se determinan mediante análisis con un algoritmo de comparación de secuencias o mediante una inspección visual;

(ii) codificada por un ácido nucleico según se proporciona aquí;

(iii) que tiene al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o 100% de identidad de secuencia a la SEQ ID NO: 8;

(b) el polipéptido de (a) pero que carece de una secuencia señal nativa y/o una secuencia de proproteína;

(c) el polipéptido de (a) o (b) que adicionalmente comprende una secuencia de aminoácidos heteróloga o un radical heterólogo;

(d) el polipéptido de (c), en donde la secuencia de aminoácidos heteróloga o el radical heterólogo comprende, o consiste en una secuencia señal heteróloga (líder), una marca, una etiqueta detectable o un epítipo;

(e) el polipéptido de (d), en donde la secuencia señal heteróloga (líder) comprende o consiste en una extensión N-terminal y/o C-terminal para tener como objetivo un retículo endoplásmico (ER) o una

endomembrana, o para tener como objetivo un retículo endoplásmico (ER) vegetal o un sistema de endomembrana;

5 (f) el polipéptido de cualquiera de (a) a (e), en donde la fosfolipasa, por ejemplo la fosfolipasa C, por ejemplo la fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) cataliza una reacción que comprende: 4,5-bisfosfato de 1-fosfatidil-1D-mio-inositol (también denominado PIP₂, bisfosfato de fosfatidilinositol) + H₂O ↔ 1,4,5-trisfosfato de 1D-mio-inositol (también denominado IP₃, trifosfato de inositol) + diacilglicerol;

(g) el polipéptido de (a) a (f), en donde la actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) es termoestable;

10 (h) el polipéptido de (a) a (f), en donde la actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) es termotolerante;

15 (i) el polipéptido de cualquiera de (a) a (h), en donde: (i) el polipéptido es glicosilado, o el polipéptido comprende al menos un sitio de glicosilación, (ii) el polipéptido de (i) en donde la glicosilación es una glicosilación enlazada mediante N o una glicosilación mediante O; (iii) el polipéptido de (i) o (ii) en donde el polipéptido es glicosilado después de ser expresado en una célula de levadura; o (iv) el polipéptido de (iii) en donde la célula de levadura es una *P. pastoris* o una *S. pombe*;

(j) el polipéptido de cualquiera de (a) a (i), que adicionalmente comprende o que está contenido en una composición que comprende al menos una segunda enzima, o al menos una segunda enzima fosfolipasa; o

20 (k) el polipéptido de (j), en donde la al menos una segunda enzima fosfolipasa comprende un polipéptido que tiene una secuencia según se establece en la SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO:4, o al menos una de sus enzimas variantes según se describe en las Tablas 8 y 9.

En un aspecto, el polipéptido aislado, sintético o recombinante puede comprender el polipéptido según se proporciona aquí que carece de una secuencia señal (péptidos), por ejemplo, que carece de su secuencia señal homóloga, y en un aspecto, comprende una secuencia señal (péptidos) heteróloga. En un aspecto, el polipéptido aislado, sintético o recombinante puede comprender el polipéptido según se proporciona aquí que comprende una secuencia señal heteróloga, tal como una secuencia señal de fosfolipasa o no fosfolipasa (por ejemplo, no fosfolipasa, no fosfolipasa C o no fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC)) heteróloga. En un aspecto, las proteínas quiméricas comprenden un primer dominio que comprende una secuencia señal según se proporciona aquí y al menos un segundo dominio. La proteína puede ser una proteína de fusión. El segundo dominio puede comprender una enzima. La enzima puede ser una fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, por ejemplo una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) según se proporciona aquí, u otra enzima.

En un aspecto, la actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) comprende una actividad específica a aproximadamente 37°C en el rango desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína. En otro aspecto, la actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) comprende una actividad específica desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 750 unidades por miligramo de proteína. Alternativamente, la actividad de fosfolipasa comprende una actividad específica a 37°C en el rango desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 1200 unidades por miligramo de proteína. En un aspecto, la actividad de fosfolipasa comprende una actividad específica a 37°C en el rango desde aproximadamente 750 hasta aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína. En otro aspecto, la termotolerancia comprende la retención de al menos la mitad de la actividad específica de la fosfolipasa a 37°C después de ser calentada a una temperatura elevada. Alternativamente, la termotolerancia puede comprender la retención de la actividad específica a 37°C en el rango desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 1200 unidades por miligramo de proteína después de ser calentada a una temperatura elevada.

En una realización, los polipéptidos aislados, sintéticos o recombinantes según se proporcionan aquí comprenden al menos un sitio de glicosilación. En un aspecto, la glicosilación puede ser una glicosilación enlazada mediante N. En un aspecto, el polipéptido puede ser glicosilado después de ser expresado en una *P. pastoris* o una *S. pombe* o en plantas, tales como las plantas que producen aceite por ejemplo soja, cáñola, arroz, girasol, o variantes genéticamente modificadas (GMO) de estas plantas.

En un aspecto, el polipéptido puede retener una actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) bajo condiciones que comprenden aproximadamente pH 6,5, pH 6, pH 5,5, pH 5, pH 4,5 o pH 4,0, o más bajo. En otro aspecto, el polipéptido puede retener una actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) bajo condiciones que comprenden aproximadamente pH 7, pH 7,5, pH 8,0, pH 8,5, pH 9, pH 9,5, pH 10, pH 10,5, pH 11, pH 11,5, pH 12,0, o más.

En una realización, las preparaciones de proteína comprenden un polipéptido según se proporciona aquí, en donde la preparación de proteína comprende un líquido, un sólido o un gel.

En un aspecto, los heterodímeros según se proporcionan aquí comprenden un polipéptido y un segundo dominio. En un aspecto, el segundo dominio puede ser un polipéptido, y el heterodímero puede ser una proteína de fusión. En un aspecto, el segundo dominio puede ser un epítipo o una marca. En un aspecto, los homodímeros según se proporcionan aquí comprenden un polipéptido según se proporciona aquí.

5 En una realización, los polipéptidos inmovilizados según se proporcionan aquí tienen una actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), en donde el polipéptido comprende un polipéptido según se proporciona aquí, un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí, o un polipéptido que comprende un polipéptido según se proporciona aquí y un segundo dominio. En un aspecto, un polipéptido según se proporciona aquí se puede inmovilizar sobre una célula, una vesícula, un liposoma, una película, una membrana, un metal, una resina, un polímero, una cerámica, un vidrio, un microelectrodo, una partícula grafitica, una perla, un gel, una placa, un cristal, un comprimido, una píldora, una cápsula, un polvo, un aglomerado, una superficie, una estructura porosa, una matriz o un tubo capilar, o materiales tales como granos, cascarillas, corteza, piel, pelo, esmalte, hueso, concha, y materiales que se derivan de éstos. Los polinucleótidos, polipéptidos y enzimas según se proporcionan aquí se pueden formular en una forma sólida tal como un polvo, una preparación liofilizada, gránulos, un comprimido, una barra, un cristal, una cápsula, una píldora, un pelete, o en una forma líquida tal como una disolución acuosa, un aerosol, un gel, una pasta, una lechada, una emulsión acuosa/aceite, una crema, una cápsula, o una suspensión vesicular o micelar.

20 En un aspecto, se proporcionan aquí anticuerpos aislados, sintéticos o recombinantes que específicamente se unen a un polipéptido según se proporciona aquí. En otro aspecto, los anticuerpos aislados, sintéticos o recombinantes son anticuerpos monoclonales o policlonales, o son fragmentos de unión al antígeno de los mismos. En un aspecto, se proporciona aquí un hibridoma que comprende un anticuerpo proporcionado aquí.

En una realización, se proporciona aquí una matriz que comprende un polipéptido inmovilizado, un ácido nucleico inmovilizado, o un anticuerpo según se proporciona aquí, o una combinación de los mismos.

25 En una realización, los suplementos alimentarios para un animal comprenden un polipéptido según se proporciona aquí, por ejemplo, un polipéptido codificado mediante el ácido nucleico según se proporciona aquí. En un aspecto, el polipéptido en el suplemento alimentario puede ser glicosilado. En una realización, las matrices de suministro de enzimas comestibles comprenden un polipéptido según se proporciona aquí, por ejemplo, un polipéptido codificado mediante el ácido nucleico según se proporciona aquí. En un aspecto, la matriz de suministro comprende un pelete. En un aspecto, el polipéptido puede ser glicosilado. En un aspecto, la actividad de fosfolipasa es termotolerante. En otro aspecto, la actividad de fosfolipasa es termoestable.

35 En una realización, los métodos para aislar o identificar un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), comprenden las etapas de: (a) proporcionar un anticuerpo según se proporciona aquí; (b) proporcionar una muestra que comprende polipéptidos; y (c) poner en contacto la muestra de la etapa (b) con el anticuerpo de la etapa (a) bajo condiciones en donde el anticuerpo se puede unir específicamente al polipéptido, aislando o identificando por consiguiente un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC).

40 En una realización, los métodos para obtener un anticuerpo anti-fosfolipasa comprenden administrar a un animal no humano un ácido nucleico según se proporciona aquí o un polipéptido según se proporciona aquí o subsecuencias de los mismos en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmune humoral, obteniendo por consiguiente un anticuerpo anti-fosfolipasa. Se proporcionan aquí métodos para obtener un anticuerpo anti-fosfolipasa que comprenden administrar a un animal no humano un ácido nucleico según se proporciona aquí o un polipéptido según se proporciona aquí o subsecuencias de los mismos en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmune.

45 En una realización, los métodos para producir un polipéptido recombinante comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar un ácido nucleico según se proporciona aquí, en donde el ácido nucleico se enlaza opcionalmente a un promotor, en donde el ácido nucleico comprende un ácido nucleico según se proporciona aquí; y (b) expresar el ácido nucleico de la etapa (a) bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido, produciendo por consiguiente un polipéptido recombinante; o (B) el método de (A), que adicionalmente comprende transformar una célula hospedante con el ácido nucleico de la etapa (a) seguido de la expresión del ácido nucleico de la etapa (a), produciendo por consiguiente un polipéptido recombinante en una célula transformada.

55 En una realización, los métodos para identificar un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa comprenden las etapas de: (a) proporcionar un polipéptido según se proporciona aquí; (b) proporcionar un sustrato de fosfolipasa; y (c) poner en contacto el polipéptido con el sustrato de la etapa (b) y detectar una disminución en la cantidad de sustrato o un incremento en la cantidad de un producto de reacción, en donde una disminución en la cantidad del sustrato o un incremento en la cantidad del producto de reacción detecta un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa.

En otra realización, los métodos para identificar un sustrato de fosfolipasa comprenden las etapas de: (a) proporcionar un polipéptido según se proporciona aquí; (b) proporcionar un sustrato de ensayo; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con el sustrato de ensayo de la etapa (b) y detectar una disminución en la cantidad de sustrato o un incremento en la cantidad de producto de reacción, en donde una disminución en la cantidad del sustrato o un incremento en la cantidad de un producto de reacción identifica el sustrato de ensayo como un sustrato de fosfolipasa.

En otro aspecto, los métodos para determinar si un compuesto de ensayo específicamente se une a un polipéptido comprenden las etapas de: (a) expresar un ácido nucleico o un vector que comprende el ácido nucleico bajo condiciones permisivas para la traducción del ácido nucleico a un polipéptido, en donde el ácido nucleico comprende un ácido nucleico según se proporciona aquí; (b) proporcionar un compuesto de ensayo; (c) poner en contacto el polipéptido con el compuesto de ensayo; y (d) determinar si el compuesto de ensayo de la etapa (b) específicamente se une al polipéptido.

En otro aspecto, los métodos para determinar si un compuesto de ensayo específicamente se une a un polipéptido comprenden las etapas de: (a) proporcionar un polipéptido según se proporciona aquí; (b) proporcionar un compuesto de ensayo; (c) poner en contacto el polipéptido con el compuesto de ensayo; y (d) determinar si el compuesto de ensayo de la etapa (b) específicamente se une al polipéptido.

En una realización, los métodos para identificar un modulador de una actividad de fosfolipasa comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar un polipéptido según se proporciona aquí; (b) proporcionar un compuesto de ensayo; (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con el compuesto de ensayo de la etapa (b) y medir una actividad de la fosfolipasa, en donde un cambio en la actividad de fosfolipasa medida en la presencia del compuesto de ensayo comparada a la actividad en la ausencia del compuesto de ensayo proporciona una determinación de que el compuesto de ensayo modula la actividad de fosfolipasa; (B) el método de (A), en donde la actividad de fosfolipasa se mide proporcionando un sustrato de fosfolipasa y detectando una disminución en la cantidad del sustrato o un incremento en la cantidad de un producto de reacción, o, un incremento en la cantidad del sustrato o una disminución en la cantidad de un producto de reacción; (c) el método de (B), en donde una disminución en la cantidad del sustrato o un incremento en la cantidad del producto de reacción con el compuesto de ensayo según se compara con la cantidad de sustrato o producto de reacción sin el compuesto de ensayo identifica el compuesto de ensayo como un activador de la actividad de fosfolipasa; o, (d) el método de (B), en donde un incremento en la cantidad del sustrato o una disminución en la cantidad del producto de reacción con el compuesto de ensayo según se compara con la cantidad de sustrato o producto de reacción sin el compuesto de ensayo identifica el compuesto de ensayo como un inhibidor de la actividad de fosfolipasa.

En un aspecto, los métodos para aislar o recuperar un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad de fosfolipasa a partir de una muestra comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar una sonda de polinucleótido que comprende un ácido nucleico según se proporciona aquí; (b) aislar un ácido nucleico a partir de la muestra o tratar la muestra tal que el ácido nucleico en la muestra sea accesible para la hibridación a una sonda de polinucleótido de la etapa (a); (c) combinar el ácido nucleico aislado o la muestra tratada de la etapa (b) con la sonda de polinucleótido de la etapa (a); y (d) aislar un ácido nucleico que específicamente se hibrida con la sonda de polinucleótido de la etapa (a), aislando o recuperando por consiguiente un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad de fosfolipasa a partir de una muestra; (B) el método de (A), en donde la muestra es o comprende una muestra ambiental; (C) el método de (B), en donde la muestra ambiental es o comprende una muestra de agua, una muestra de líquido, una muestra de tierra, una muestra de aire, o una muestra biológica; o (D) el método de (C), en donde la muestra biológica se deriva a partir de una célula bacteriana, una célula protozoaria, una célula de insecto, una célula de levadura, una célula vegetal, una célula fúngica o una célula de mamífero.

En una realización, los métodos para aislar o recuperar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa a partir de una muestra comprenden las etapas de: (a) proporcionar un par de secuencias de cebadores de amplificación para amplificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, en donde el par de cebadores es capaz de amplificar un ácido nucleico según se proporciona aquí; (b) aislar un ácido nucleico a partir de la muestra o tratar la muestra tal que el ácido nucleico en la muestra sea accesible para la hibridación al par de cebadores de amplificación; y, (c) combinar el ácido nucleico de la etapa (b) con el par de cebadores de amplificación de la etapa (a) y amplificar el ácido nucleico de la muestra, aislando o recuperando por consiguiente un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa a partir de una muestra. En una realización, la muestra es una muestra ambiental, por ejemplo, una muestra de agua, una muestra de líquido, una muestra de tierra, una muestra de aire, o una muestra biológica, por ejemplo una célula bacteriana, una célula protozoaria, una célula de insecto, una célula de levadura, una célula vegetal, una célula fúngica o una célula de mamífero. Uno o cada miembro del par de secuencias de cebadores de amplificación puede comprender un oligonucleótido que comprende al menos aproximadamente 10 a 50 o más bases consecutivas de una secuencia según se proporciona aquí.

En una realización, los métodos para incrementar la termotolerancia o la termoestabilidad de un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa comprenden la glicosilación de un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa, en donde el polipéptido comprende al menos treinta aminoácidos contiguos de un polipéptido según se proporciona aquí; o un polipéptido codificado mediante una secuencia de ácidos nucleicos según se proporciona aquí,

incrementando por consiguiente la termotolerancia o la termoestabilidad del polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa. En un aspecto, la actividad específica de la fosfolipasa puede ser termoestable o termotolerante a una temperatura en el rango desde mayor que aproximadamente 37°C hasta aproximadamente 95°C.

5 En una realización, los métodos para sobreexpresar un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa, por ejemplo fosfolipasa C, por ejemplo fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) recombinante en una célula, comprenden expresar un vector que comprende un ácido nucleico según se proporciona aquí o una secuencia de ácidos nucleicos según se proporciona aquí, en donde las identidades de secuencia se determinan mediante análisis con un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual, en donde la sobreexpresión se efectúa mediante el uso de un promotor de alta actividad, un vector dicistrónico o mediante amplificación génica del vector.

10 En una realización, los métodos para generar una variante de un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad de fosfolipasa comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar un ácido nucleico molde que comprende un ácido nucleico según se proporciona aquí; y (b) modificar, eliminar o añadir uno o más nucleótidos en la secuencia molde, o una combinación de éstas acciones, para generar una variante del ácido nucleico molde; (B) el método de (A), que adicionalmente comprende expresar el ácido nucleico variante para generar un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa variante; (C) el método de (A) o (B), en donde las modificaciones, adiciones o eliminaciones se introducen mediante un método que comprende PCR propensa a error, barajado, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis por PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis por inserción de casete, mutagénesis de conjunto recursivo, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica del sitio, reensamblaje génico, Mutagénesis de Saturación del Sitio Génico (GSSM), reensamblaje por ligamiento sintético (SLR), y una combinación de los mismos; (D) el método de cualquiera de (A) a (C), en donde las modificaciones, adiciones o eliminaciones se introducen mediante un método que comprende recombinación, recombinación de secuencias recursivas, mutagénesis de ADN modificado con fosfotioato, mutagénesis con molde que contiene uracilo, mutagénesis de cadena doble con huecos, mutagénesis de reparación de emparejamientos erróneos puntuales, mutagénesis de cepa hospedante deficiente en reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis por eliminación, mutagénesis por restricción-selección, mutagénesis por restricción-purificación, síntesis artificial de genes, mutagénesis de conjunto, creación de multímeros de ácidos nucleicos quiméricos, y una combinación de los mismos; (E) el método de cualquiera de (A) a (D), en donde el método se repite iterativamente hasta que se produce una fosfolipasa (variante) que tiene una actividad alterada o diferente (variante), o una estabilidad alterada o diferente (variante) de aquella de un polipéptido codificado mediante el ácido nucleico molde, o hasta que se produce una estructura secundaria alterada o diferente (variante) de aquella de un polipéptido codificado mediante el ácido nucleico molde, o hasta que se produce una modificación post-traducciona alterada o diferente (variante) de aquella de un polipéptido codificado mediante el ácido nucleico molde; (F) el método de (E), en donde el polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa variante es termotolerante, y retiene cierta actividad después de ser expuesto a una temperatura elevada; (G) el método de (E), en donde el polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa variante tiene glicosilación incrementada según se compara con la fosfolipasa codificada mediante un ácido nucleico molde; (H) el método de (E), en donde el polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa variante tiene una actividad de fosfolipasa bajo una alta temperatura, en donde la fosfolipasa codificada mediante el ácido nucleico molde no es activa bajo la alta temperatura; (I) el método de cualquiera de (A) a (H), en donde el método se repite iterativamente hasta que se produce una secuencia de codificación de la fosfolipasa que tiene un uso de codón alterado de aquel del ácido nucleico molde; o (J) el método de cualquiera de (A) a (H), en donde el método se repite iterativamente hasta que se produce un gen de fosfolipasa que tiene un nivel superior o inferior de expresión del mensaje o estabilidad de aquel del ácido nucleico molde.

45 En un aspecto, los métodos para modificar codones en un ácido nucleico que codifica un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa, los métodos comprenden las etapas de: (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad de fosfolipasa que comprende un ácido nucleico según se proporciona aquí; y, (b) identificar un codón en el ácido nucleico de la etapa (a) y reemplazarlo por un codón diferente que codifica el mismo aminoácido que el codón reemplazado, modificando por consiguiente los codones en un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa.

50 En una realización, los métodos para producir una biblioteca de ácidos nucleicos que codifican una pluralidad de sitios de unión al sustrato o sitios activos de la fosfolipasa modificados, en donde los sitios de unión al sustrato o los sitios activos modificados se derivan a partir de un primer ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un primer sitio activo o un primer sitio de unión al sustrato, el método comprende las etapas de: (A) (a) proporcionar un primer ácido nucleico que codifica un primer sitio activo o primer sitio de unión al sustrato, en donde la primera secuencia de ácidos nucleicos comprende un ácido nucleico según se proporciona aquí, y el ácido nucleico codifica un sitio activo de la fosfolipasa o un sitio de unión al sustrato de fosfolipasa; (b) proporcionar un conjunto de oligonucleótidos mutagénicos que codifican las variantes de aminoácidos presentes naturalmente en una pluralidad de codones que se tienen como objetivo en el primer ácido nucleico; y, (c) utilizar el conjunto de oligonucleótidos mutagénicos para generar un conjunto de ácidos nucleicos variantes que codifican el sitio activo o que codifican el sitio de unión al sustrato, que codifican un rango de variaciones de aminoácidos en cada codón de aminoácidos que fue mutagenizado, produciendo por consiguiente una biblioteca de ácidos nucleicos que codifican una pluralidad de sitios activos de la fosfolipasa o sitios de unión al sustrato modificados; (B) el método de (A), que comprende mutagenizar el primer ácido nucleico de la etapa (a) mediante un método que comprende un sistema de evolución

dirigida optimizado, Mutagénesis de Saturación del Sitio Génico (GSSM), o un reensamblaje por ligamiento sintético (SLR); (C) el método de (A) o (B), que comprende mutagenizar el primer ácido nucleico de la etapa (a) o las variantes mediante un método que comprende PCR propensa a error, barajado, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis por PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis por inserción de casete, mutagénesis de conjunto recursivo, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica del sitio, reensamblaje génico, Mutagénesis de Saturación del Sitio Génico (GSSM), reensamblaje por ligamiento sintético (SLR), y una combinación de los mismos; o (D) el método de (A) o (B), que comprende mutagenizar el primer ácido nucleico de la etapa (a) o las variantes mediante un método que comprende recombinación, recombinación de secuencias recursivas, mutagénesis de ADN modificado con fosfotioato, mutagénesis con molde que contiene uracilo, mutagénesis de cadena doble con huecos, mutagénesis de reparación de emparejamientos erróneos puntuales, mutagénesis de cepa hospedante deficiente en reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis por eliminación, mutagénesis por restricción-selección, mutagénesis por restricción-purificación, síntesis artificial de genes, mutagénesis de conjunto, creación de multímeros de ácidos nucleicos quiméricos, y una combinación de los mismos.

En un aspecto, los métodos para obtener una molécula pequeña comprenden las etapas de: (a) proporcionar una pluralidad de enzimas biosintéticas capaces de sintetizar o modificar una molécula pequeña, en donde una de las enzimas comprende una enzima fosfolipasa codificada mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí; (b) proporcionar un sustrato para al menos una de las enzimas de la etapa (a); y (c) hacer reaccionar el sustrato de la etapa (b) con las enzimas bajo condiciones que facilitan una pluralidad de reacciones biocatalíticas para generar una molécula pequeña mediante una serie de reacciones biocatalíticas.

En otro aspecto, los métodos para modificar una molécula pequeña comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar una enzima fosfolipasa, en donde la enzima comprende un polipéptido según se proporciona aquí, o un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí; (b) proporcionar una molécula pequeña; y (c) hacer reaccionar la enzima de la etapa (a) con la molécula pequeña de la etapa (b) bajo condiciones que facilitan una reacción enzimática catalizada por la enzima fosfolipasa, modificando por consiguiente una molécula pequeña mediante una reacción enzimática de la fosfolipasa; (B) el método de (A), que comprende una pluralidad de sustratos de moléculas pequeñas para la enzima de la etapa (a), generando por consiguiente una biblioteca de moléculas pequeñas modificadas producidas mediante al menos una reacción enzimática catalizada por la enzima fosfolipasa; (C) el método de (A) o (B), que adicionalmente comprende una pluralidad de enzimas adicionales bajo condiciones que facilitan una pluralidad de reacciones biocatalíticas mediante las enzimas para formar una biblioteca de moléculas pequeñas modificadas producidas mediante la pluralidad de reacciones enzimáticas; (D) el método de (C), que adicionalmente comprende la etapa de examinar la biblioteca para determinar si una molécula pequeña modificada particular que exhibe una actividad deseada está presente dentro de la biblioteca; o (E) el método de (D), en donde la etapa de examinar la biblioteca adicionalmente comprende las etapas de eliminar sistemáticamente todas menos una de las reacciones biocatalíticas utilizadas para producir una porción de la pluralidad de las moléculas pequeñas modificadas dentro de la biblioteca ensayando la porción de la molécula pequeña modificada para la presencia o ausencia de la molécula pequeña modificada particular con una actividad deseada, e identificando al menos una reacción biocatalítica específica que produce la molécula pequeña modificada particular de actividad deseada.

En otro aspecto, los métodos para determinar un fragmento funcional de una enzima fosfolipasa comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar una enzima fosfolipasa, en donde la enzima comprende un polipéptido según se proporciona aquí, o un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí; y (b) eliminar una pluralidad de residuos de aminoácidos a partir de la secuencia de la etapa (a) y ensayar la subsecuencia restante para una actividad de fosfolipasa, determinando por consiguiente un fragmento funcional de una enzima fosfolipasa; o, (B) el método de (A), en donde la actividad de fosfolipasa se mide proporcionando un sustrato de fosfolipasa y detectando una disminución en la cantidad del sustrato o un incremento en la cantidad de un producto de reacción.

En un aspecto, los métodos para la ingeniería celular completa de nuevos fenotipos o fenotipos modificados utilizando análisis de flujo metabólico en tiempo real, los métodos comprenden las etapas de: (a) obtener una célula modificada modificando la composición genética de una célula, en donde la composición genética se modifica mediante la adición a la célula de un ácido nucleico según se proporciona aquí; (b) cultivar la célula modificada para generar una pluralidad de células modificadas; (c) medir al menos un parámetro metabólico de la célula monitorizando el cultivo celular de la etapa (b) en tiempo real; y (d) analizar los datos de la etapa (c) para determinar si el parámetro medido difiere de una medición comparable en una célula no modificada bajo condiciones similares, identificando por consiguiente un fenotipo diseñado en la célula utilizando análisis de flujo metabólico en tiempo real; (B) el método de (A), en donde la composición genética de la célula se modifica mediante un método que comprende la eliminación de una secuencia o la modificación de una secuencia en la célula, o, la desactivación de la expresión de un gen; (C) el método de (A) o (B), que adicionalmente comprende seleccionar una célula que comprende un fenotipo recién diseñado; o (D) el método de (C), que adicionalmente comprende cultivar la célula seleccionada, generando por consiguiente una nueva cepa celular que comprende un fenotipo recién diseñado.

En una realización, los métodos para obtener una planta transgénica comprenden las siguientes etapas: (a) introducir una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula vegetal, en donde la secuencia nucleica

- heteróloga comprende una secuencia de ácidos nucleicos según se proporciona aquí, produciendo por consiguiente una célula vegetal transformada; y (b) producir una planta transgénica a partir de la célula transformada. En un aspecto, la etapa (a) adicionalmente puede comprender introducir la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga mediante electroporación o microinyección de protoplastos de la célula vegetal. En otro aspecto, la etapa (a)
- 5 adicionalmente puede comprender introducir la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga directamente al tejido de la planta mediante bombardeo de partículas con ADN. Alternativamente, la etapa (a) adicionalmente puede comprender introducir la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en el ADN de la célula vegetal utilizando un hospedante *Agrobacterium tumefaciens*. En un aspecto, la célula vegetal puede ser una célula de patata, maíz, arroz, trigo, tabaco, o cebada.
- 10 En una realización, los métodos para expresar una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga en una célula vegetal comprenden las siguientes etapas: (a) transformar la célula vegetal con una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga enlazada de manera operativa a un promotor, en donde la secuencia nucleica heteróloga comprende un ácido nucleico según se proporciona aquí; (b) cultivar la planta bajo condiciones en donde la secuencia de ácidos nucleicos heteróloga se expresa en la célula vegetal.
- 15 En un aspecto, se proporcionan aquí composiciones detergentes que comprenden el polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa según se proporciona aquí, o un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí. En un aspecto, la fosfolipasa es una fosfolipasa activa no superficial o una fosfolipasa activa superficial. En otro aspecto, la fosfolipasa se formula en una composición líquida no acuosa, un sólido moldeado, un polvo liofilizado, una forma granular, una forma en partículas, un comprimido
- 20 prensado, un pelete, una forma de gel, una pasta, un aerosol, o una forma de lechada.
- En un aspecto, los métodos para lavar un objeto comprenden las etapas de: (a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa según se proporciona aquí, o un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí; (b) proporcionar un objeto; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) y el objeto de la etapa (b) bajo condiciones en donde la composición puede lavar el objeto.
- 25 En una realización, se proporcionan aquí composiciones que comprenden un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa según se proporciona aquí, o un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí.
- 30 En un aspecto, los métodos para mejorar, tratar o prevenir la toxicidad mediada por lipopolisacáridos (LPS) comprenden administrar a un paciente una composición farmacéutica que comprende un polipéptido según se proporciona aquí, o un polipéptido codificado mediante una secuencia de ácidos nucleicos según se proporciona aquí.
- En otro aspecto, se proporcionan aquí fármacos, precursores farmacéuticos y composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido según se proporciona aquí o un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí. En otro aspecto, se proporcionan aquí métodos para fabricar un fármaco, un precursor farmacéutico o una composición farmacéutica que comprenden la adición de un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí a un fármaco, un precursor farmacéutico o una composición farmacéutica. En un aspecto, la composición farmacéutica se utiliza para prevenir, tratar o mejorar la toxicidad mediada por lipopolisacáridos (LPS), o para desintoxicar una endotoxina, o desacilar una cadena de ácidos grasos 2' o 3' de un lípido A.
- 35 En una realización, los métodos para desintoxicar una endotoxina comprenden poner en contacto la endotoxina con un polipéptido según se proporciona aquí o un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí.
- 40 En otra realización, los métodos para obtener una secuencia codificante de fosfolipasa variante que tiene expresión incrementada en una célula hospedante comprenden modificar un ácido nucleico según se proporciona aquí, de tal forma que uno, varios o todos los motivos codificantes del sitio de glicosilación enlazado mediante N se modifican a un motivo no glicosilado.
- 45 En una realización, se proporcionan aquí composiciones que comprenden una mezcla de enzimas de fosfolipasa que comprenden: (a) (i) un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa según se proporciona aquí o un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí, y (ii) al menos una segunda enzima; (b) la composición de (a), en donde la al menos una enzima es una enzima fosfolipasa; o (c) la composición de (b), en donde la al menos una segunda enzima fosfolipasa comprende un polipéptido según se establece en la SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 4, o al menos una de las enzimas PLC variantes según se describe en las Tablas 8 y 9.
- 50 En un aspecto, los métodos para obtener un biocombustible, por ejemplo un biodiésel, comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa según se proporciona aquí, o una enzima fosfolipasa codificada mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí, o una composición que comprende un polipéptido según se proporciona aquí; (b) proporcionar una composición que comprende un lípido o un éster de alquilo; (c) poner en contacto el polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa de (a) con la composición de (b); (B)
- 55

el método de (A), en donde la composición que comprende un lípido o un éster de alquilo es, o comprende, un aceite y/o una grasa; o (C) el método de (A) o (B), en donde la composición que comprende un lípido o un éster de alquilo es, o comprende, un alga, un aceite vegetal, un aceite vegetal puro, un aceite vegetal virgen, un aceite vegetal de desecho, una grasa animal, una grasa, un sebo, una manteca, o una grasa amarilla. En otro aspecto, se proporcionan aquí combustibles, por ejemplo biocombustibles, por ejemplo biodiésel, obtenido mediante los métodos que comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa según se proporciona aquí, o una enzima fosfolipasa codificada mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí, o una composición que comprende un polipéptido según se proporciona aquí; b) proporcionar una composición que comprende un lípido o un éster de alquilo; (c) poner en contacto el polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa de (a) con la composición de (b); (B) el método de (A), en donde la composición que comprende un lípido o un éster de alquilo es, o comprende, un aceite y/o una grasa; o (C) el método de (A) o (B), en donde la composición que comprende un lípido o un éster de alquilo es, o comprende, un alga, un aceite vegetal, un aceite vegetal puro, un aceite vegetal virgen, un aceite vegetal de desecho, una grasa animal, una grasa, un sebo, una manteca, o una grasa amarilla.

En otro aspecto, un soluble seco de destilería (DDS), un grano seco de destilería (DDG), un soluble de destilería condensado (CDS), un grano húmedo de destilería (DWG), o un grano seco de destilería con solubles (DDGS), comprende un polipéptido según se proporciona aquí, o un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí, o una composición según se proporciona aquí.

En otra realización, se proporciona aquí una biomasa que comprende (a) un polipéptido según se proporciona aquí, o un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí, o una composición según se proporciona aquí; (b) la biomasa de (a), en donde la biomasa es, o comprende, una biomasa animal, de algas y/o de plantas, o una biomasa lignocelulósica o que comprende lípidos, o un material de desecho.

En otra realización, se proporciona aquí un producto derivado del petróleo que comprende: (a) un polipéptido según se proporciona aquí, o un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí, o una composición según se proporciona aquí; (b) obtenido mediante un método que comprende el uso de un polipéptido según se proporciona aquí, o un polipéptido codificado mediante un ácido nucleico según se proporciona aquí, o una composición según se proporciona aquí; o (c) el producto derivado del petróleo de (a) o (b) que comprende un aceite, un biodiésel o una gasolina, o un bioetanol, biobutanol, biopropanol o un biometanol; o una mezcla de bioetanol, biobutanol, biopropanol, biometanol y/o biodiésel y gasolina.

En una realización, se proporciona aquí un método para la hidratación de Fosfolípidos No Hidratables (NHPs) dentro de una matriz de lípido permitiéndoles migrar a una interfaz aceite-agua. Los NHPs posteriormente se hacen reaccionar y/o se eliminan de los lípidos. En una realización, el método comprende a) mezclar un ácido acuoso con un aceite comestible para obtener una mezcla ácida que tiene pH de menos de aproximadamente 4; y b) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla reaccionada que tiene pH de aproximadamente 6 - 9. En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende la fase acuosa en un tamaño de gota promedio entre aproximadamente 15 μm hasta aproximadamente 45 μm . En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota entre aproximadamente 15 μm hasta aproximadamente 45 μm de tamaño, en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60, 70, 80, 90, 93, 95, 96, 97, 98, o 99% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota entre aproximadamente 20 μm hasta aproximadamente 45 μm de tamaño. En ciertas realizaciones, el método adicionalmente comprende el desgomado de la mezcla reaccionada con agua o una enzima para obtener un aceite desgomado. En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) se lleva a cabo con un mezclador de cizallamiento elevado con una velocidad periférica de al menos aproximadamente 1400 cm/s, 1600 cm/s, 1800 cm/s, 2000 cm/s, 2100 cm/s, 2300 cm/s, 2500 cm/s, 3000 cm/s, o 3500 cm/s.

Cualquier ácido estimado adecuado por uno de habilidad en la técnica se puede utilizar en los métodos proporcionados aquí. En ciertas realizaciones, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, y una mezcla de los mismos.

Cualquier ácido estimado adecuado por uno de habilidad en la técnica se puede utilizar en los métodos proporcionados aquí. En ciertas realizaciones, la base se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, silicato de sodio, carbonato de sodio, carbonato de calcio, y una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, el método para la hidratación de fosfolípidos no hidratables en un aceite comestible adicionalmente comprende una etapa de desgomado enzimático o con agua para obtener un aceite desgomado. En una realización, se proporciona aquí un método en donde la hidratación de los NHPs es seguida por el tratamiento enzimático y la eliminación de varios fosfolípidos y lecitinas. Tales métodos se pueden practicar sobre ya sea aceites desgomados con agua o brutos.

En ciertas realizaciones, un método de desgomado del aceite proporcionado aquí comprende a) mezclar un ácido acuoso con un aceite comestible para obtener una mezcla ácida que tiene pH de aproximadamente 1 a 4, b) mezclar

5 una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla reaccionada que tiene pH de aproximadamente 6-9, y c) desgomar la mezcla reaccionada con agua o una enzima para obtener un aceite desgomado. En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende una fase acuosa en un tamaño de gota promedio entre aproximadamente 15 μm hasta aproximadamente 45 μm . En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen en un tamaño de gota entre aproximadamente 15 μm hasta aproximadamente 45 μm de tamaño, en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa.

10 En una realización, se proporciona aquí un método para eliminar NHPs, fosfolípidos hidratables, y lecitinas (conocidos colectivamente como "gomas") a partir de los aceites vegetales para producir un producto de grasa o aceite desgomado que se puede utilizar para la producción de alimentos y/o aplicaciones no alimentarias. En ciertas realizaciones, los métodos de desgomado proporcionados aquí utilizan agua, diversos ácidos y/o diversas bases, o una combinación de los mismos.

15 En otro aspecto, se proporciona aquí un método para mejorar la velocidad de reacción de una fosfolipasa utilizada en un método de desgomado enzimático, tal que la reacción de la enzima tiene una duración de menos de aproximadamente una hora.

En todavía otro aspecto, se proporciona aquí un método para el desgomado de una composición de aceite en el cual se pueden tratar fosfolípidos tanto hidratables como no hidratables en un solo procedimiento, en donde una reacción de la enzima se completa en menos de aproximadamente una hora.

20 En una realización, se proporciona aquí un método para hidrolizar, descomponer o alterar una composición que comprende un fosfolípido, que comprende:

(A) (a) proporcionar un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa; (b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) bajo condiciones en donde la fosfolipasa hidroliza, descompone o altera la composición que comprende un fosfolípido;

25 (B) el método de (A), en donde la composición comprende una membrana o bicapa de lípidos que comprende un fosfolípido; o

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

30 En una realización, se proporciona aquí un método para licuar o eliminar una composición que comprende un fosfolípido, que comprende:

(a) proporcionar un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa;

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

(c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) bajo condiciones en donde la fosfolipasa elimina o licúa la composición que comprende un fosfolípido.

35 En una realización, se proporciona aquí un método para la purificación de un fitosterol o un triterpeno, que comprende:

AI) (A1a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa;

(A1b) proporcionar una composición que comprende un fitosterol o un triterpeno; y

40 (A1c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) bajo condiciones en donde el polipéptido puede catalizar la hidrólisis de un fosfolípido en la composición;

(BI) el método de (AI), en donde el fitosterol o un triterpeno comprenden un esteroles vegetal;

(CI) el método de (BI), en donde el esteroles vegetal se deriva a partir de un aceite vegetal;

45 (DI) el método de (CI), en donde el aceite vegetal comprende un aceite de coco, aceite de cáñola, aceite de manteca de cacao, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de linaza, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de cacahuate, aceite derivado a partir de un salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja, o un aceite de girasol;

(EI) el método de cualquiera de (AI) a (DI), que adicionalmente comprende el uso de disolventes no polares para extraer cuantitativamente los fitosteroles libres y los ésteres fitoesterilicos de ácidos grasos; o

(F1) el método de (E1), en donde el fitosterol o un triterpeno comprende un β -sitosterol, un campesterol, un estigmasterol, un estigmastanol, un β -sitostanol, un sitostanol, un desmosterol, un calinasterol, un poriferasterol, un clionasterol o un brasicasterol.

En una realización, se proporciona aquí un método para el refinado de un aceite o una grasa, que comprende:

- 5 (A1) (A1a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa;
 (A1b) proporcionar una composición que comprende un aceite o una grasa que comprende un fosfolípido; y
 (A1c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (A1a) con la composición de la etapa (A1b) bajo condiciones en donde el polipéptido puede catalizar la hidrólisis de un fosfolípido en la composición;
 (B1) el método de (A1), en donde el polipéptido está en una disolución de agua que se añade a la composición;
- 10 (C1) el método de (B1), en donde el nivel de agua está entre aproximadamente 0,5 a 5%;
 (D1) el método de cualquiera de (A1) a (C1), en donde el tiempo del procedimiento es menos de aproximadamente 2 horas;
 (E1) el método de cualquiera de (A1) a (C1), en donde el tiempo del procedimiento es menos de aproximadamente 60 minutos;
- 15 (F1) el método de cualquiera de (A1) a (C1), en donde el tiempo del procedimiento es menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 15 minutos, o menos de aproximadamente 5 minutos;
 (G1) el método de cualquiera de (A1) a (F1), en donde las condiciones de la hidrólisis comprenden una temperatura de entre aproximadamente 25°C a 70°C;
- 20 (H1) el método de cualquiera de (A1) a (G1), en donde las condiciones de la hidrólisis comprenden el uso de agentes cáusticos;
 (I1) el método de cualquiera de (A1) a (H1), en donde las condiciones de la hidrólisis comprenden un pH de entre aproximadamente pH 3 y pH 10;
- 25 (J1) el método de cualquiera de (A1) a (I1), en donde las condiciones de la hidrólisis comprenden la adición de emulsionantes y/o el meclamiento después del contacto de la etapa (A1) (A1c);
 (K1) el método de cualquiera de (A1) a (J1), que comprende la adición de un desemulsificante y/o calentamiento o enfriamiento para promover la separación de una fase acuosa;
- 30 (L1) el método de cualquiera de (A1) a (K1), que comprende el desgomado antes de la etapa de contacto para recoger la lecitina mediante centrifugación y posteriormente añadir una PLC, una PLC y/o una PLA para eliminar fosfolípidos no hidratables;
 (M1) el método de cualquiera de (A1) a (L1), que comprende el desgomado con agua del aceite bruto a menos de 10 ppm de fósforo para los aceites comestibles y el refinado físico subsiguiente a menos de aproximadamente 50 ppm de fósforo para los aceites de biodiésel; o
- 35 (N1) el método de cualquiera de (A1) a (M1), que comprende la adición de ácido para promover la hidratación de fosfolípidos no hidratables.

En una realización, se proporciona aquí un método para el desgomado de un aceite o una grasa, que comprende:

- (a1) proporcionar una composición que comprende un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa;
 (b1) proporcionar una composición que comprende un aceite o grasa que contiene un fosfolípido; y
 (c1) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a1) y la composición de la etapa (b1) bajo condiciones en donde el polipéptido puede catalizar la hidrólisis de un fosfolípido en la composición.
- 40

En una realización, se proporciona aquí un método para el refinado físico de una composición que contiene un fosfolípido, que comprende:

- (A-1) (A-1a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa;
 (A-1b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido; y

- (A-1c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (A-1a) con la composición de la etapa (A-1b) antes, durante o después del refinado físico;
- 5 (B-1) el método de (A-1), en donde el polipéptido se añade antes del refinado físico y la composición que comprende el fosfolípido comprende una planta, y el polipéptido se expresa transgénicamente en la planta, el polipéptido se añade durante la trituración de una semilla u otra parte de la planta, o, el polipéptido se añade después de la trituración o antes del refinado;
- (C-1) el método de (A-1), en donde el polipéptido se añade durante el refinado físico;
- 10 (D-1) el método de (A-1), en donde el polipéptido se añade después del refinado físico: en un mezclador intensivo o mezclador de retención antes de la separación; después de una etapa de calentamiento; en una centrifugadora; en una pasta de neutralización; en un agua de lavado; o, durante una etapa de blanqueamiento o una etapa de desodorización; o
- (E-1) el método de cualquiera de (A-1) a (D-1), que adicionalmente comprende añadir una enzima fosfolipasa A (PLA), una enzima fosfolipasa B (PLB), una enzima fosfolipasa C (PLC), una enzima fosfolipasa D (PLD), o una enzima fosfatasa, o cualquier combinación de las mismas.
- 15 En una realización, se proporciona aquí un método para el refinado cáustico de una composición que contiene un fosfolípido, que comprende:
- (A1)
- (A1a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa;
- (A1b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido; y
- 20 (A1c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (A1a) con la composición de la etapa (A1b) antes, durante o después del refinado cáustico;
- (B1) el método de (A1), en donde el polipéptido se añade antes de la adición del ácido o el agente cáustico;
- (C1) el método de cualquiera de (A1) a (B1), en donde el polipéptido se añade durante el refinado cáustico y se añaden niveles variables de ácido y agente cáustico dependiendo de los niveles de fósforo y los niveles de ácidos grasos libres; o
- 25 (D1) el método de cualquiera de (A1) a (B1), en donde el polipéptido se añade después del refinado cáustico: en un mezclador intensivo o mezclador de retención antes de la separación; después de una etapa de calentamiento; en una centrifugadora; en una pasta de neutralización; en un agua de lavado; o, durante las etapas de desodorización o de blanqueamiento;
- 30 (E1) el método de cualquiera de (A1) a (D1), en donde las condiciones del refinado cáustico se generan mediante la adición de una disolución concentrada de agente cáustico, o en donde las condiciones del refinado cáustico comprenden el uso de una disolución concentrada de agente cáustico más concentrada que el estándar industrial de 11%, o en donde las condiciones del refinado cáustico comprenden el uso de una disolución concentrada de agente cáustico que está entre aproximadamente 12% y 50% concentrada;
- 35 (F1) el método de cualquiera de (A1) a (E1), en donde la composición que comprende el fosfolípido comprende una planta;
- (G1) el método de cualquiera de (F1), en donde el polipéptido se expresa transgénicamente en la planta;
- (H1) el método de cualquiera de (A1) a (G1), en donde el polipéptido se añade durante la trituración de una semilla u otra parte de la planta, o, el polipéptido se añade después de la trituración o antes del refinado; o
- 40 (I1) el método de cualquiera de (A1) a (H1), que comprende un procedimiento según se establece en la Figura 10; o el procedimiento según se establece en la Figura 10, en donde se añade suficiente ácido para promover la reducción del contenido de metales de calcio y magnesio.
- En una realización, se proporciona aquí un método para desacilar una cadena de ácidos grasos 2' o 3' de un lípido A, que comprende poner en contacto el lípido A con un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa.
- 45 En una realización, se proporciona aquí un procedimiento para reducir la masa de las gomas e incrementar la ganancia de aceite neutro (triglicéridos) a través del atrapamiento de aceite reducido, que comprende:
- (A1)
- (A1a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido que exhibe actividad de fosfolipasa;

(A1b) proporcionar una composición que comprende un aceite o grasa que contiene un fosfolípido; y

(A1c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (A1a) y la composición de la etapa (A1b) bajo condiciones en donde el polipéptido puede catalizar la hidrólisis de un fosfolípido en la composición durante un tiempo suficiente para reducir la masa de las gomas e incrementar los aceites neutros;

5 (B1) la preparación de proteína de (A1), en donde la preparación de proteína comprende una formulación que comprende una composición líquida no acuosa, un sólido moldeado, un polvo, un polvo liofilizado, una forma granular, una forma particulada, un comprimido prensado, un pelete, una píldora, una forma de gel, un hidrogel, una pasta, un aerosol, un pulverizador, una loción, una formulación de lechada, una emulsión acuosa/aceite, una crema, una cápsula, una vesícula, o una suspensión micelar; o,

10 (C1) el método de (A1) o (B1), que comprende el uso de meclamiento por cizallamiento elevado de la composición, seguido del meclamiento sin cizallamiento o con bajo cizallamiento con el al menos un polipéptido de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa para permitir el contacto adecuado del sustrato de fosfolípido con la fosfolipasa.

En una realización, se proporciona aquí un aceite o una grasa producida mediante los métodos proporcionados aquí.

15 Las enzimas para el uso en los métodos proporcionados aquí, incluyen enzimas que tienen actividad de fosfolipasa. La actividad de fosfolipasa comprende, por ejemplo, una actividad de fosfolipasa C (PLC), una actividad de fosfolipasa A (PLA), incluyendo una actividad de fosfolipasa A1 o fosfolipasa A2, una actividad de fosfolipasa B (PLB), incluyendo una actividad de fosfolipasa B1 o fosfolipasa B2, una actividad de fosfolipasa D (PLD), incluyendo una actividad de fosfolipasa D1 o fosfolipasa D2. En una realización, las enzimas para el uso aquí comprenden polipéptidos que tienen una actividad de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) o de una enzima equivalente, y/u otra actividad de fosfolipasa, incluyendo una actividad de fosfolipasa A, B, C, D, patatina, fosfatasas del ácido fosfatídico (PAP) y/o lípido acil-hidrolasa (LAH) o de una enzima equivalente.

20 En ciertas realizaciones, la enzima para el uso en los métodos proporcionados aquí se selecciona a partir de una fosfolipasa A, una fosfolipasa C, una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol, o una combinación de las mismas. En ciertas realizaciones, la enzima para el uso en los métodos proporcionados aquí se selecciona a partir de una fosfolipasa C, una fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol, o una combinación de las mismas. En ciertas realizaciones, la enzima para el uso en los métodos proporcionados aquí es la enzima fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol según se describe aquí anteriormente. En ciertas realizaciones, la enzima para el uso en los métodos proporcionados aquí se selecciona a partir de fosfolipasa C, y una enzima que comprende la SEQ ID NO:8. En ciertas realizaciones, la enzima para el uso en los métodos proporcionados aquí es una enzima que comprende la SEQ ID NO:8.

25 En otra realización, se proporciona aquí un método para obtener un fosfolípido a partir de un aceite comestible. En cierta realización, los fosfolípidos obtenidos mediante los métodos proporcionados aquí incluyen una variedad de fosfolípidos, incluyendo, pero no limitados a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilserina (LPS), lisofosfatidilinositol (LPI), ácido lisofosfatídico (LPA), colina (C), etanolamina (E), serina (S), e inositol (I).

En otra realización, se proporciona aquí un método para obtener colina (C), etanolamina (E), serina (S), o inositol (I) a partir de un aceite comestible.

40 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se establecen en los dibujos que se acompañan y en la descripción posterior. Otras características, objetos, y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la descripción y de los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patente, secuencias del GenBank, y depósitos de ATCC aquí citados se incorporan expresamente por este medio como referencia para todos los fines.

45 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos son ilustrativos de las realizaciones de la invención y no pretenden limitar el alcance de la invención según se abarca por las reivindicaciones.

La Figura 1 ilustra esquemáticamente un procedimiento ejemplar de refinado del aceite vegetal que utiliza las fosfolipasas de la invención.

50 La Figura 2 ilustra esquemáticamente un procedimiento de desgomado ejemplar de la invención para aceites físicamente refinados, según se describe en detalle debajo.

La Figura 3 ilustra esquemáticamente la hidrólisis de fosfátidos con una fosfolipasa C de la invención, según se describe en detalle debajo.

- La Figura 4 ilustra esquemáticamente un procedimiento de refinado cáustico ejemplar de la invención, e ilustra una realización alternativa que comprende la aplicación de una fosfolipasa C de la invención como un “Adyuvante de Refinado Cáustico” (Refinado Cáustico de Meclamiento Extenso), según se describe en detalle debajo.
- 5 La Figura 5 ilustra esquemáticamente la aplicación de una fosfolipasa C de la invención como un adyuvante de desgomado, según se describe en detalle debajo.
- La Figura 6 ilustra esquemáticamente un procedimiento de refinado cáustico ejemplar de la invención, e ilustra una realización alternativa que comprende la aplicación de una fosfolipasa C de la invención como un “Adyuvante de Refinado Cáustico” (Refinado Cáustico de Meclamiento Extenso), según se describe en detalle debajo.
- 10 La Figura 7 ilustra otra variación de los métodos de la invención donde se utilizan dos etapas de centrifugación en el procedimiento, según se describe en detalle debajo.
- La Figura 8 ilustra otra variación de los métodos de la invención donde se utilizan tres etapas de centrifugación en el procedimiento, según se describe en detalle debajo.
- 15 La Figura 9 ilustra otra variación ejemplar de este procedimiento que utiliza tratamiento con ácido y que tiene una etapa de centrifugación antes de una etapa de desgomado, según se describe en detalle debajo.
- La Figura 10 ilustra la fracción en peso de las especies individuales de fosfolípido (PL), ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina (PC) con relación al PL total restante después del tratamiento con las fosfolipasas mutantes de la invención.
- 20 La Figura 11 ilustra los mutantes aceleradores de la “Mutagénesis de Saturación del Sitio Génico” o “GSSM” seleccionados para la inclusión en la Biblioteca de GeneReassembly, que incluye las fosfolipasas ejemplares de la invención.
- La Figura 12 ilustra un procedimiento del alcohol ejemplar que puede incorporar el uso de enzimas de esta invención.
- 25 La Figura 13 proporciona la composición del fosfolípido de las gomas húmedas recuperadas en los ejemplos de control.
- La Figura 14 proporciona comparaciones de los fosfolípidos para los ejemplos de control frente a los ejemplos que utilizan los métodos proporcionados aquí donde el pH en la etapa b) se ajusta a pH 7,0.
- 30 La Figura 15 compara el aceite neutro perdido con la fase de goma en las reacciones de pH neutro de control frente a las reacciones de pH ajustado a un pH de 7,0, lado a lado.
- La Figura 16 compara el aceite neutro perdido con la fase de goma de varias condiciones de pH donde se utiliza una fosfolipasa A1.
- La Figura 17 representa la distribución de gota para la fase acuosa obtenida de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 17A.
- 35 La Figura 18 representa la distribución de gota para la fase acuosa obtenida de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 17B.
- La Figura 19 representa la distribución de gota para la fase acuosa obtenida de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 17C.
- 40 La Figura 20 representa la distribución de gota para la fase acuosa obtenida de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 17D.
- La Figura 21 representa la distribución de gota comparativa para la fase acuosa obtenida de acuerdo con los procedimientos de los Ejemplos 17A, 17B, 17C y 17D.

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

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

- 45 La presente invención proporciona polipéptidos que tienen una actividad de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) o de una enzima equivalente, y/u otra actividad de fosfolipasa, incluyendo una actividad de fosfolipasa A, B, C, D, patatina, fosfatasas del ácido fosfatídico (PAP) y/o lípido acil-hidrolasa (LAH) o de una enzima equivalente, polinucleótidos que los codifican, anticuerpos que se unen específicamente a éstos, y métodos para obtenerlos y utilizarlos.

En una realización, la actividad de enzima fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) de los polipéptidos de esta invención comprende: $4,5\text{-bisfosfato de } 1\text{-fosfatidil-1D-mio-inositol (también denominado PIP}_2\text{, bisfosfato de fosfatidilinositol) + H}_2\text{O} \leftrightarrow 1,4,5\text{-trisfosfato de } 1\text{D-mio-inositol (también denominado IP}_3\text{, trifosfato de inositol) + diacilglicerol.}$

- 5 En realizaciones alternativas, las enzimas de la invención pueden escindir eficientemente el enlace de éster de glicerolfosfato en los aceites, tales como los aceites vegetales, por ejemplo, los fosfolípidos de las semillas oleaginosas, para generar una base fosforilada extraíble con agua y un diglicérido.

10 En realizaciones alternativas, las fosfolipasas de la invención pueden tener una actividad de lípido acil-hidrolasa (LAH); o pueden escindir los enlaces de éster de glicerolfosfato en la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfático, y/o esfingomiélna, o una combinación de estas actividades. Por ejemplo, en un aspecto, una fosfolipasa de la invención es específica para uno o más sustratos específicos, por ejemplo, una enzima de la invención puede tener una especificidad de acción para PE y PC; PE y PI; PE y PS; PS y PC; PS y PI; PI y PC; PS, PI y PC; PE, PI y PC; PC, PE y PS; PE, PS y PI; o, PE, PS, PI y PC.

15 En realizaciones alternativas, una fosfolipasa de la invención (por ejemplo, una actividad de enzima fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) o equivalente) se puede utilizar para el desgomado enzimático de aceites, por ejemplo aceites brutos, debido a que el radical fosfato es soluble en agua y fácil de eliminar. El producto de diglicérido permanecerá en el aceite y por consiguiente reducirá las pérdidas. Las PLCs de la invención se pueden utilizar además de o en lugar de las PLA1s y PLA2s en el desgomado de aceite comercial, tal como en el procedimiento ENZYMAX®, donde los fosfolípidos se hidrolizan mediante PLA1 y PLA2.

20 En realizaciones alternativas, las fosfolipasas de la invención son activas en una alta temperatura y/o en una baja temperatura, o, sobre un amplio rango de temperatura, por ejemplo, pueden ser activas en las temperaturas que oscilan entre 20°C a 90°C, entre 30°C a 80°C, o entre 40°C a 70°C. La invención también proporciona fosfolipasas de la invención que tienen actividad a pHs alcalinos o a pHs ácidos, por ejemplo, baja acidez del agua. En aspectos alternativos, las fosfolipasas de la invención pueden tener actividad a pHs ácidos tan bajos como pH 6,5, pH 6,0, pH 5,5, pH 5,0, pH 4,5, pH 4,0, pH 3,5, pH 3,0, pH 2,5, pH 2,0 o más ácidos (es decir, < pH 2,0). En aspectos alternativos, las fosfolipasas de la invención pueden tener actividad en pHs alcalinos tan altos como pH 7,5, pH 8,0, pH 8,5, pH 9,0, pH 9,5, pH 10,0, o más alcalinos (es decir, > pH 10,0). En un aspecto, las fosfolipasas de la invención son activas en el rango de temperatura de entre aproximadamente 40°C hasta aproximadamente 70°C, 75°C, u 80°C, o más, bajo condiciones de baja actividad de agua (bajo contenido de agua).

30 La invención también proporciona métodos para obtener PLCs y/o modificar la actividad de las fosfolipasas ejemplares de la invención para generar enzimas con propiedades deseables alternativas, por ejemplo, actividad de enzima fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) que tiene sustratos alternativos, o actividades bajo diversas condiciones ambientales, por ejemplo, de pHs, temperaturas variables, y similares. Por ejemplo, las fosfolipasas generadas mediante los métodos de la invención pueden tener especificidades de sustrato, especificidades de unión al sustrato, patrones de escisión del sustrato, estabilidad térmica, perfil de pH/actividad, perfil de pH/estabilidad (tal como estabilidad incrementada en bajos valores de pH, por ejemplo pH<6 o pH<5, o en altos valores de pH, por ejemplo pH>9), estabilidad frente a la oxidación, dependencia de Ca²⁺, actividad específica y similares, alterados. La invención permite alterar cualquier propiedad de interés. Por ejemplo, la alteración puede dar como resultado una variante que, según se compara con una fosfolipasa precursora, tiene un perfil de actividad de temperatura y pH alterado.

35 En realizaciones alternativas, las fosfolipasas de la invención se utilizan en varias etapas de procesamiento del aceite, tales como en la extracción del aceite, por ejemplo, en la eliminación de las “gomas de fosfolípidos” en un procedimiento denominado “desgomado del aceite”, según se describe aquí. La invención proporciona composiciones (por ejemplo, que comprenden enzimas de la invención) y procedimientos para el tratamiento de aceites, por ejemplo aceites brutos, y para la producción de aceites, por ejemplo aceites vegetales, a partir de varias fuentes, tal como aceite a partir de salvado de arroz, soja, colza, cacahuete, sésamo, girasol, y maíz. Las enzimas de fosfolipasa de la invención se pueden utilizar en lugar de la PLA, por ejemplo, la fosfolipasa A2, en cualquier etapa de procesamiento del aceite vegetal.

50 En ciertas realizaciones, las enzimas adecuadas para el uso en los métodos proporcionados aquí incluyen, una o más enzimas de fosfolipasa A (PLA), enzimas de fosfolipasa C (PLC), enzimas de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), o una combinación de las mismas. Las enzimas de PLA incluyen fosfolipasa A1 (PLA1) y/o fosfolipasa A2 (PLA2).

55 Como se utiliza aquí, “aceite bruto” (también denominado un aceite no desgomado) se refiere a un aceite extraído o prensado o una mezcla de los mismos de, por ejemplo fuentes vegetales, incluyendo pero no limitado a aceite de acai, aceite de almendras, aceite de babasü, aceite de semilla de grosella negra, aceite de semilla de borraja, aceite de cáñamo, aceite de anacardo, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de crambe, aceite de semilla de lino, aceite de semilla de uva, aceite de avellanas, aceite de cáñamo, aceite de jatropha, aceite de jojoba, aceite de linaza, aceite de nuez de macadamia, aceite de hueso de mango, aceite de limnanthes alba, aceite de mostaza, aceite de pata de buey, aceite de oliva, aceite de palma,

aceite de palmiste, oleína de palma, aceite de cacahuete, aceite de pecana, aceite de piñón, aceite de pistacho, aceite de adormidera, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de sésamo, manteca de karité, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, taloil, aceite de tsubaki, aceite de nuez, variedades de aceites “naturales” que tienen composiciones de ácidos grasos alteradas por medio de Organismos Genéticamente Modificados (GMO) o “producción” tradicional tales como aceites con alto contenido de ácido oleico, con bajo contenido de ácido linolénico, o poco saturados (aceite de cánola con alto contenido de ácido oleico, aceite de soja con bajo contenido de ácido linolénico, o aceites de girasol con alto contenido de ácido esteárico). Aceites ejemplares adicionales, adecuados para el uso en los métodos proporcionados aquí se describen en otra parte. En cierta realización, el contenido de fosfátidos totales en un aceite bruto puede variar desde 0,5-3% peso/peso correspondiente a un contenido de fósforo en el rango de 200-1200 ppm o 250-1200 ppm.

Como se utiliza aquí, “aceite desgomado” se refiere a un aceite obtenido después de la eliminación de NHPs, fosfolípidos hidratables, y lecitinas (conocidos colectivamente como “gomas”) a partir del aceite para producir un producto de grasa o aceite desgomado que se puede utilizar para la producción de alimentos y/o aplicaciones no alimentarias. Varios procedimientos de desgomado son conocidos en la técnica y se describen anteriormente. En ciertas realizaciones, el aceite desgomado tiene el contenido de fosfolípidos de menos de aproximadamente 200 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 150 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 100 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 50 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 40 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 30 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 20 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 15 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 10 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 7 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 5 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 3 ppm de fósforo, o menos de aproximadamente 1 ppm de fósforo.

Como se utiliza aquí, la expresión “fosfolípidos no hidratables” o “NHPs” se refiere al ácido fosfatídico y las sales de ácido fosfatídico, por ejemplo, sales de calcio, magnesio y hierro del ácido fosfatídico; y sales de calcio, magnesio y hierro de la etanolamina.

Como se utiliza aquí, “aceite desgomado con agua” se refiere a un aceite obtenido después del procedimiento de desgomado con agua. En ciertas realizaciones, el aceite desgomado con agua se obtiene mezclando 1-3% peso/peso de agua caliente con aceite bruto caliente (60-90°C) durante 30-60 minutos. En ciertas realizaciones, la etapa de desgomado con agua elimina los fosfátidos y las gomias mucilaginosas que se vuelven insolubles en el aceite cuando se hidratan. Las gomias y los fosfátidos hidratados se pueden separar del aceite mediante sedimentación, filtración o centrifugación.

Generación y Manipulación de los Ácidos Nucleicos

La invención proporciona ácidos nucleicos aislados, sintéticos y recombinantes (por ejemplo, la SEQ ID NO: 5 ejemplar y ácidos nucleicos que codifican la SEQ ID NO: 6 que comprenden (y que tienen) uno o más cambios (por ejemplo, mutaciones) de residuos de aminoácidos según se establece en las Tablas 12 a 15, incluyendo casetes de expresión tales como vectores de expresión, que codifican los polipéptidos y las fosfolipasas de la invención. La invención también incluye métodos para descubrir nuevas secuencias de fosfolipasa utilizando los ácidos nucleicos de la invención. También se proporcionan métodos para modificar los ácidos nucleicos de la invención mediante, por ejemplo, reensamblaje por ligamiento sintético, sistema de evolución dirigida optimizado y/o mutagénesis de saturación.

Los ácidos nucleicos de la invención se pueden obtener, aislar y/o manipular mediante, por ejemplo, clonación y expresión de bibliotecas de ADNc, amplificación de mensaje o ADN genómico mediante PCR, y similares. En la práctica de los métodos de la invención, los genes homólogos se pueden modificar manipulando un ácido nucleico molde, según se describe aquí. La invención se puede practicar en conjunción con cualquier método o protocolo o dispositivo conocido en la técnica, que se describen adecuadamente en la bibliografía científica y de patente.

En realizaciones alternativas, las secuencias de genes de la invención, o los genes utilizados para practicar la invención, comprenden el segmento de ADN involucrado en la producción de una cadena de polipéptidos, incluyendo, entre otros, las regiones que anteceden y subsiguientes a la región de codificación, tales como promotores y potenciadores, líder y seguidor, así como también, donde sea aplicable, secuencias interventoras (intrones) entre los segmentos de codificación individual (exones).

En realizaciones alternativas, los ácidos nucleicos o las secuencias de ácidos nucleicos de la invención, o las utilizadas para practicar la invención, pueden comprender un oligonucleótido, nucleótido, polinucleótido, o un fragmento de cualquiera de estos, ADN o ARN (por ejemplo, ARNm, ARNr, ARNt, ARNi) de origen genómico o sintético que puede ser de una sola hebra o una doble hebra y puede representar una hebra sentido o antisentido, ácido nucleico peptídico (PNA), o cualquier material similar a ADN o similar a ARN, de origen natural o sintético, incluyendo, por ejemplo, ARNi, ribonucleoproteínas (por ejemplo, ARNis de doble hebra, por ejemplo, RNPis). El término abarca ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. En realizaciones alternativas, los ácidos nucleicos o las secuencias de ácidos nucleicos de la invención, o las utilizadas para practicar la invención, también abarcan estructuras similares a los ácidos nucleicos con

estructuras principales sintéticas, véase, por ejemplo, Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36:8692-8698; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:153-156.

Técnicas Generales

- 5 Los ácidos nucleicos utilizados para practicar esta invención, ya sea ARN, ARNi, ácido nucleico antisentido, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o híbridos de los mismos, se pueden aislar a partir de una variedad de fuentes, genéticamente diseñadas, amplificadas, y/o expresadas/generadas de manera recombinante. Los polipéptidos recombinantes generados a partir de estos ácidos nucleicos se pueden aislar o clonar y ensayar individualmente para una actividad deseada. Se puede utilizar cualquier sistema de expresión recombinante, incluyendo los sistemas de expresión de células bacterianas, mamíferas, de levadura, de insecto o vegetal.
- 10 Alternativamente, estos ácidos nucleicos se pueden sintetizar *in vitro* mediante técnicas de síntesis química bien conocidas, como se describe en, por ejemplo, Adams (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105:661; Belousov (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3440-3444; Frenkel (1995) *Free Radic. Biol. Med.* 19:373-380; Blommers (1994) *Biochemistry* 33:7886-7896; Narang (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90; Brown (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109; Beaucage (1981) *Tetra. Lett.* 22:1859;; Patente U.S. n° 4.458.066.
- 15 Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, subclonación, sondas de etiquetado (por ejemplo, etiquetado de cebador aleatorio utilizando una polimerasa de Klenow, traducción de mella, amplificación), secuenciación, hibridación y similares se describen adecuadamente en la bibliografía científica y de patente, véanse, por ejemplo, Sambrook, ed., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ND ED.)*, Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York (1997); *LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES*, Part I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

- 25 Otra manera útil de obtener y manipular ácidos nucleicos utilizados para practicar los métodos de la invención es la clonación a partir de muestras genómicas, y, si se desea, la selección y la re-clonación de insertos aislados o amplificados a partir de, por ejemplo, clones genómicos o clones de ADNc. Las fuentes del ácido nucleico utilizadas en los métodos de la invención incluyen bibliotecas genómicas o de ADNc contenidas en, por ejemplo, los cromosomas artificiales de mamíferos (MACs), véanse, por ejemplo, Patentes U.S. 5.721.118; 6.025.155; cromosomas artificiales humanos, véase, por ejemplo, Rosenfeld (1997) *Nat. Genet.* 15:3 33 - 3 35; cromosomas artificiales de levadura (YAC); cromosomas artificiales bacterianos (BAC); cromosomas artificiales P1, véase, por ejemplo, Woon (1998) *Genomics* 50:306-316; vectores derivados de P1 (PACs), véase, por ejemplo, Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124; cósmidos, virus recombinantes, fagos o plásmidos.
- 30

En un aspecto, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención se ensambla en la fase apropiada con una secuencia líder capaz de dirigir la secreción del polipéptido traducido o el fragmento del mismo.

- 35 La invención proporciona proteínas de fusión y ácidos nucleicos que las codifican. Un polipéptido de la invención se puede fusionar a un polipéptido o péptido heterólogo, tal como los péptidos de identificación N-terminal que imparten características deseadas, tales como estabilidad incrementada o purificación simplificada. Los péptidos y polipéptidos de la invención también se pueden sintetizar y expresar como proteínas de fusión con uno o más dominios adicionales enlazados a las mismas para, por ejemplo, producir un péptido más inmunogénico, para aislar más fácilmente un péptido sintetizado de manera recombinante, para identificar y aislar anticuerpos y células B que expresan anticuerpos, y similares. Los dominios que facilitan la detección y purificación incluyen, por ejemplo, péptidos de quelación de metales tales como trectos de polihistidina y módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación sobre metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio utilizado en el sistema de purificación mediante extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA). Se puede utilizar la inclusión de una secuencia conectora escindible tal como el Factor Xa o la enterocinasa (Invitrogen, San Diego CA) entre un dominio de purificación y el polipéptido o péptido que comprende el motivo para facilitar la purificación. Por ejemplo, un vector de expresión puede incluir una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un epítipo enlazada a seis residuos de histidina seguido de una tiorredoxina y un sitio de escisión de enterocinasa (véanse por ejemplo, Williams (1995) *Biochemistry* 34:1787- 17 97; Dobieli (1998) *Protein Expr. Purif.* 12: 404-414). Los residuos de histidina facilitan la detección y la purificación mientras que el sitio de escisión de enterocinasa proporciona un medio para purificar el epítipo del resto de la proteína de fusión. La tecnología concerniente a los vectores que codifican las proteínas de fusión y la aplicación de las proteínas de fusión se describen adecuadamente en la bibliografía científica y de patente, véase por ejemplo, Kroll (1993) *DNA Cell. Biol.* 12:441-53.
- 50

Secuencias de control de transcripción y traducción

- 55 La invención proporciona secuencias de ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN) de la invención enlazadas de manera operativa a la(s) secuencia(s) de control de expresión (por ejemplo, de transcripción o de traducción), por ejemplo, promotores o potenciadores, para "dirigir o modular la síntesis/expresión del ARN. La secuencia de control de expresión puede estar en un vector de expresión. Los promotores bacterianos ejemplares incluyen lac1, lacZ, T3,

T7, gpt, lambda PR, PL y trp. Los promotores eucarióticos ejemplares incluyen el promotor inmediato temprano del CMV, el promotor de timidina cinasa del HSV, el promotor de SV40 temprano y tardío, LTRs de los retrovirus, y metalotioneína I de ratón.

5 Los promotores adecuados para expresar un polipéptido en las bacterias incluyen los promotores lac o trp de *E. coli*, el promotor lac1, el promotor lacZ, el promotor T3, el promotor T7, el promotor gpt, el promotor lambda PR, el promotor lambda PL, los promotores de operones que codifican enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato cinasa (PGK), y el promotor de fosfatasa ácida. Los promotores eucarióticos incluyen el promotor inmediato temprano del CMV, el promotor de timidina cinasa del HSV, los promotores de choque térmico, el promotor de SV40 temprano y tardío, LTRs de retrovirus, y el promotor de metalotioneína I de ratón. También se pueden utilizar otros
10 promotores conocidos para controlar la expresión de los genes en las células procariotas o eucariotas o sus virus.

Casetes de expresión, vectores y vehículos de clonación

15 La invención proporciona vectores de expresión y vehículos de clonación que comprenden ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, secuencias que codifican las fosfolipasas de la invención. Los vectores de expresión y los vehículos de clonación de la invención pueden comprender partículas virales, baculovirus, fagos, plásmidos, fagómidos, cósmidos, fósmodos, cromosomas artificiales bacterianos, ADN viral (por ejemplo, virus de la vacuna, adenovirus, virus de viruela aviar, pseudorrabia, y derivados de SV40), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levadura, cromosomas artificiales de levadura, y cualquier otro vector específico para hospedantes específicos de interés (tales como *Bacillus*, *Aspergillus* y levadura). Los vectores de la invención pueden incluir secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. Un gran número de vectores adecuados son
20 conocidos por aquellos de habilidad en la técnica, y están comercialmente disponibles. Los vectores ejemplares incluyen: bacterianos: vectores pQE (Qiagen, San Diego, CA), plásmidos pBluescript (Stratagene, San Diego, CA), vectores pNH, (vectores lambda-ZAP (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Farmacia)/Eucarióticos: pXTI, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Farmacia). Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro plásmido u otro vector en tanto que sea replicable y viable en el hospedante. Se pueden utilizar vectores de bajo
25 número de copias o de alto número de copias con la presente invención.

30 En realizaciones alternativas, la expresión "casete de expresión" comprende una secuencia nucleotídica que es capaz de afectar la expresión de un gen estructural (es decir, una secuencia de codificación de proteínas, tal como una fosfolipasa de la invención) en un hospedante compatible con tales secuencias. Los casetes de expresión pueden incluir al menos un promotor enlazado de manera operativa con la secuencia de codificación del polipéptido; y, opcionalmente, con otras secuencias, por ejemplo, las señales de terminación de la transcripción. También se pueden utilizar factores adicionales, necesarios o útiles en efectuar la expresión, por ejemplo, potenciadores. En realizaciones alternativas, "enlazado de manera operativa" se refiere al enlace de un promotor en dirección 5' de una secuencia de ADN tal que el promotor media la transcripción de la secuencia de ADN. En realizaciones alternativas, los casetes de expresión incluyen plásmidos, vectores de expresión, virus recombinantes, cualquier forma de vector
35 de "ADN desnudo" recombinante, y similares.

40 En realizaciones alternativas, los vectores de esta invención comprenden un ácido nucleico que puede infectar, transfectar, transducir transitoria o permanentemente una célula. En realizaciones alternativas, un vector puede ser un ácido nucleico desnudo, o un ácido nucleico en complejo con proteína o lípido. El vector opcionalmente comprende ácidos nucleicos y/o proteínas virales o bacterianos, y/o membranas (por ejemplo, una membrana celular, una envoltura de lípido viral, etc.). Los vectores de esta invención incluyen, pero no se limitan a replicones (por ejemplo, replicones de ARN, bacteriófagos) a los cuales se pueden unir y replicarse fragmentos de ADN. De esta manera, los vectores incluyen, pero no se limitan a ARN, ADN o ARN lineal o circular de autorreplicación autónoma (por ejemplo, plásmidos, virus, y similares, véase por ejemplo, la Patente U.S. nº 5.217.879), e incluyen tanto los plásmidos de expresión como los plásmidos que no son de expresión. Donde un cultivo celular o
45 microorganismo recombinante se describe como que hospeda un "vector de expresión", esto incluye tanto el ADN circular y lineal extracromosómico como el ADN que se ha incorporado en el (los) cromosoma(s) hospedante(s). Donde un vector se mantiene mediante una célula hospedante, el vector puede ya sea replicarse de manera estable mediante las células durante la mitosis como una estructura autónoma, o se incorpora dentro del genoma del hospedante.

50 En realizaciones alternativas, la invención proporciona plásmidos, que se pueden designar mediante una letra minúscula "p" precedida y/o seguida por letras mayúsculas y/o números. En realizaciones alternativas, un plásmido "de partida" está comercialmente disponible, públicamente disponible en una base no restringida, o se puede construir a partir de plásmidos disponibles de acuerdo con los procedimientos publicados. En realizaciones alternativas, los plásmidos equivalentes a aquellos aquí descritos son conocidos en la técnica y serán manifiestos para experto normal.
55

60 En realizaciones alternativas, un vector de expresión puede comprender un promotor, un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender un origen de replicación, cualquier sitio de unión al ribosoma necesario, un sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de ajuste, secuencias de terminación de la transcripción, y secuencias no transcritas flanqueantes 5'. En algunos

aspectos, las secuencias de ADN derivadas de los sitios de ajuste y poliadenilación del SV40 se pueden utilizar para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

En un aspecto, los vectores de expresión contienen uno o más genes marcadores seleccionables para permitir la selección de las células hospedantes que contienen el vector. Tales marcadores seleccionables incluyen genes que codifican la dihidrofolato reductasa o genes que confieren resistencia a la neomicina para el cultivo de células eucariotas, genes que confieren resistencia a la tetraciclina o ampicilina en *E. coli*, y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*. Las regiones promotoras se pueden seleccionar a partir de cualquier gen deseado utilizando vectores de cloranfenicol transferasa (CAT) u otros vectores con marcadores seleccionables.

Los vectores para expresar el polipéptido o el fragmento del mismo en células eucariotas también pueden contener potenciadores para incrementar los niveles de expresión. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en *cis*, usualmente desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 300 pb de longitud que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación pb 100 a 270, el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus.

Una secuencia de ADN se puede insertar en un vector mediante una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se liga a la posición deseada en el vector después de la digestión del inserto y el vector con endonucleasas de restricción apropiadas. Alternativamente, los extremos romos tanto en el inserto como en el vector se pueden ligar. Una variedad de técnicas de clonación son conocidas en la técnica, por ejemplo, según se describe en Ausubel y Sambrook. Se estima que tales procedimientos y otros están dentro del alcance de aquellos expertos en la técnica.

El vector puede estar en la forma de un plásmido, una partícula viral, o un fago. Otros vectores incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, derivados de SV40; plásmidos bacterianos, ADN del fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN del fago, ADN viral tal como virus de la vacuna, adenovirus, virus de viruela aviar, y pseudorrabia. Una variedad de vectores de expresión y clonación para el uso con los hospedantes procarionóticos y eucarióticos se describen por, por ejemplo, Sambrook.

Los vectores bacterianos particulares que se pueden utilizar incluyen los plásmidos comercialmente disponibles que comprenden elementos genéticos del vector de clonación bien conocido pBR322 (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pD10, psiX174 pBluescript II KS, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 y pCM7. Los vectores eucarióticos particulares incluyen pSV2CAT, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, and pSVL (Pharmacia). Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro vector en tanto sea replicable y viable en la célula hospedante.

Células hospedantes y células transformadas

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

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

Donde sea apropiado, las células hospedantes diseñadas se pueden cultivar en un medio de nutrientes convencional modificado según sea apropiado para activar los promotores, seleccionar los transformantes o amplificar los genes de la invención. Después de la transformación de una cepa hospedante adecuada y el

crecimiento de la cepa hospedante a una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se puede inducir por medios apropiados (por ejemplo, inducción química o por cambio de temperatura) y las células se pueden cultivar durante un período adicional para permitirles producir el polipéptido o el fragmento del mismo, deseado.

- 5 Las células se pueden cosechar mediante centrifugación, se pueden alterar por medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante se retiene para purificación adicional. Las células microbianas empleadas para la expresión de proteínas se pueden alterar mediante cualquier método conveniente, incluyendo ciclos de congelamiento-deshielo, sonicación, alteración mecánica, o el uso de agentes de lisis celular. Tales métodos son bien conocidos para aquellos expertos en la técnica. El polipéptido o el fragmento del mismo, expresado, se puede recuperar y purificar a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos que incluyen precipitación con etanol o sulfato de amonio, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxilapatita, y cromatografía en lectina. Las etapas de replegamiento de proteínas se pueden utilizar, según sea necesario, en la terminación de la configuración del polipéptido. Si se desea, se puede emplear cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas de purificación final.
- 10
- 15 También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Ejemplos de los sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono u otras líneas celulares capaces de expresar proteínas a partir de un vector compatible, tales como las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK.

- 20 Los constructos en las células hospedantes se pueden utilizar en una manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Dependiendo del hospedante empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos producidos mediante las células hospedantes que contienen el vector pueden ser glicosilados o no glicosilados. Los polipéptidos de la invención pueden o no, incluir también un residuo de aminoácidos de metionina inicial.

- 25 Los sistemas de traducción libres de células también se pueden emplear para producir un polipéptido de la invención. Los sistemas de traducción libres de células pueden utilizar ARNm's transcritos de un constructo de ADN que comprende un promotor enlazado de manera operativa a un ácido nucleico que codifican el polipéptido o el fragmento del mismo. En algunos aspectos, el constructo de ADN puede ser linealizado antes de conducir una reacción de transcripción *in vitro*. El ARNm transcrito se incuba entonces con un extracto de traducción libre de células apropiado, tal como un extracto de reticulocitos de conejo, para producir el polipéptido o el fragmento del mismo, deseado.
- 30

Los vectores de expresión pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de células hospedantes transformadas tal como la resistencia a dihidrofolato reductasa o neomicina para el cultivo de células eucariotas, o tal como la resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*.

- 35 Una enzima PI-PLC ejemplar (que tiene una secuencia según se establece en la SEQ ID NO:6 que comprende (y que tiene) uno o más cambios (por ejemplo, mutaciones) de residuos de aminoácidos como se establece en las Tablas 12 a 15) se ha sobre-expresado en forma activa en una variedad de sistemas hospedantes incluyendo bacterias gramnegativas, tales como *E. coli*, bacterias grampositivas, tales como cualquier *Bacillus sp.* (por ejemplo, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*), células hospedantes de levadura (incluyendo, por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces sp.*, tal como *S. cerevisiae* y *S. pombe*) y *Lactococcus lactis*, o células de mamífero, fúngicas, vegetal o de insecto. La enzima activa se expresa a partir de una variedad de constructos en cada sistema hospedante. Estos constructos de expresión de ácido nucleico pueden comprender nucleótidos que codifican el marco de lectura abierto de longitud completa (compuesto de la secuencia señal, la pro-secuencia, y secuencia de codificación de la proteína madura) o pueden comprender un subconjunto de estos elementos genéticos ya sea solos o en combinación con elementos genéticos heterólogos que sirven como la secuencia señal y/o la pro-secuencia para el marco de lectura abierto maduro. Cada uno de estos sistemas puede servir como un hospedante de producción comercial para la expresión de PLC para el uso en los procedimientos de desgomado del aceite enzimáticos anteriormente descritos.
- 40
- 45

Amplificación de los Ácidos Nucleicos

- 50 En la práctica de la invención, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención, o los ácidos nucleicos modificados, se pueden reproducir mediante, por ejemplo, amplificación. La invención proporciona pares de secuencias de cebadores de amplificación para amplificar los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos con una actividad de fosfolipasa. En un aspecto, los pares de cebadores son capaces de amplificar las secuencias de ácidos nucleicos de la invención. Un experto en la técnica puede diseñar pares de secuencias de cebadores de amplificación para cualquier parte de o la longitud completa de estas secuencias.
- 55

La invención proporciona un par de secuencias de cebadores de amplificación para amplificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, en donde el par de cebadores es capaz de amplificar un ácido nucleico que comprende una secuencia de la invención, o fragmentos o subsecuencias del mismo. Uno o

cada miembro del par de secuencias de cebadores de amplificación puede comprender un oligonucleótido que comprende al menos aproximadamente 10 a 50 bases consecutivas de la secuencia, o aproximadamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 bases consecutivas de la secuencia.

5 La invención proporciona pares de cebadores de amplificación, en donde el par de cebadores comprende un primer miembro que tiene una secuencia según se establece por aproximadamente los primeros (el 5') 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 residuos de un ácido nucleico de la invención, y un segundo miembro que tiene una secuencia según se establece por aproximadamente los primeros (el 5') 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 residuos de la hebra complementaria del primer miembro. La invención proporciona fosfolipasas generadas mediante amplificación, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de cebadores de amplificación de la invención. La invención proporciona métodos para obtener una fosfolipasa mediante amplificación, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando un par de cebadores de amplificación de la invención. En un aspecto, el par de cebadores de amplificación amplifica un ácido nucleico de una biblioteca, por ejemplo, una biblioteca de genes, tal como una biblioteca ambiental.

15 Las reacciones de amplificación también se pueden utilizar para cuantificar la cantidad de ácido nucleico en una muestra (tal como la cantidad de mensaje en una muestra de célula), etiquetar el ácido nucleico (por ejemplo, para aplicarlo a una matriz o una mancha), detectar el ácido nucleico, o cuantificar la cantidad de un ácido nucleico específico en una muestra. En un aspecto de la invención, se amplifica el mensaje aislado de una célula o una biblioteca de ADNc. El experto puede seleccionar y diseñar cebadores de amplificación de oligonucleótidos adecuados. Los métodos de amplificación también son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa PCR (véanse, por ejemplo, PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) y PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y., reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véanse, por ejemplo, Wu (1989) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117); amplificación de la transcripción (véase, por ejemplo, Kwok (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173); y, replicación de secuencia autosostenida (véase, por ejemplo, Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874); amplificación por Q Beta replicasa (véase, por ejemplo, Smith (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491), ensayo de amplificación por Q Beta replicasa automatizado (véase, por ejemplo, Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271), y otras técnicas mediadas por la ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véanse también Berger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; Patentes U.S. n^{os} 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564.

30 Determinación del grado de identidad de secuencia

La invención proporciona ácidos nucleicos aislados y recombinantes que comprenden secuencias que tienen al menos aproximadamente 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más de identidad de secuencia, o identidad de secuencia total (100%) con un ácido nucleico ejemplar de la invención (por ejemplo, SEQ ID NO:5 y que codifica una o más mutaciones según se establece en las Tablas 12 a 15, según se describe en el Ejemplo 3, o un fragmento enzimáticamente activo de la misma, y ácidos nucleicos que codifican la SEQ ID NO:6 y que codifican una o más mutaciones según se establece en las Tablas 12 a 15, según se describe en el Ejemplo 3, o un fragmento enzimáticamente activo de los mismos) sobre una región de al menos aproximadamente 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550 o más, residuos. La invención proporciona polipéptidos que comprenden secuencias que tienen al menos aproximadamente 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, más de identidad de secuencia, o identidad de secuencia total (100%) con un polipéptido ejemplar de la invención. El grado de identidad de secuencia (homología) se puede determinar utilizando cualquier programa de computadora y parámetros asociados, incluyendo, aquellos aquí descritos, tales como BLAST 2.2.2 o la versión 3.0t78 de FASTA, con los parámetros predeterminados. En realizaciones alternativas, la identidad de secuencia puede estar sobre una región de al menos aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 residuos consecutivos, o la longitud completa del polipéptido o ácido nucleico. El grado de identidad de secuencia (homología) se puede determinar utilizando cualquier programa de computadora y parámetros asociados, incluyendo aquellos aquí descritos, tales como BLAST 2.2.2 o la versión 3.0t78 de FASTA, con los parámetros predeterminados.

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

60 Varios programas de comparación de secuencias aquí identificados se utilizan en este aspecto de la invención. Las identidades (homologías) de las secuencias de ácidos nucleicos y/o proteínas se pueden evaluar utilizando cualquiera de la variedad de algoritmos de comparación de secuencias y programas conocidos en la técnica. Tales

algoritmos y programas incluyen, pero no se limitan a, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, y CLUSTALW (Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(8):2444-2448, 1988; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Thompson et al., Nucleic Acids Res. 22(2):4673-4680, 1994; Higgins et al., Methods Enzymol. 266:383-402, 1996; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., Nature Genetics 3:266-272, 1993).

5 La homología o identidad se puede medir utilizando software de análisis de secuencias (por ejemplo, el Paquete de Software de Análisis de Secuencias del Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Tal software empata las secuencias similares asignando grados de homología a varias eliminaciones, sustituciones y otras modificaciones. Los términos “homología” e “identidad” en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son la misma o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son los mismos cuando se comparan y alinean para la correspondencia máxima sobre una ventana de comparación o región designada según se mide utilizando cualquier número de algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineación manual e inspección visual. Para la comparación de secuencias, una secuencia puede actuar como una secuencia de referencia a la cual se comparan las secuencias de ensayo. Al utilizar un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se ingresan en una computadora, se designan las coordenadas de la subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de comparación de secuencias. Se pueden utilizar los parámetros predeterminados del programa, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula posteriormente el porcentaje de identidad de secuencia para las secuencias de ensayo con relación a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, como se utiliza aquí, incluye la referencia a un segmento de cualquiera del número de residuos contiguos. Por ejemplo, en aspectos alternativos de la invención, los residuos contiguos que varían dentro del rango de aproximadamente desde 20 hasta la longitud completa de una secuencia ejemplar de la invención se comparan con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean óptimamente. Si la secuencia de referencia tiene la identidad de secuencia requerida con una secuencia ejemplar de la invención, por ejemplo, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más identidad de secuencia con una secuencia de la invención, esa secuencia está dentro del alcance de la invención. En realizaciones alternativas, las subsecuencias que varían dentro del rango desde aproximadamente 20 hasta 600, aproximadamente 50 hasta 200, y aproximadamente 100 hasta 150 se comparan con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias se alinean óptimamente. Los métodos de alineación de la secuencia para la comparación son bien conocidos en la técnica. La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede conducir, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482, 1981, mediante el algoritmo de alineación por homología de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443, 1970, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, 1988, mediante implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineación manual e inspección visual. Otros algoritmos para determinar la homología o identidad incluyen, por ejemplo, además de un programa BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básico del Centro Nacional para la Información Biológica), ALIGN, AMAS (Análisis de Múltiples Secuencias Alineadas), AMPS (Alineación de Múltiples Secuencias de Proteínas), ASSET (Herramienta de Evaluación Estadística de Segmentos Alineado), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Nodo de Análisis Comparativo de Secuencias Biológicas), BLIMPS (Buscador Mejorado de Bloques), FASTA, Intervals & Points, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, algoritmo de Smith-Waterman, DARWIN, algoritmo Las Vegas, FNAT (Herramienta de Alineación Forzada de Nucleótidos), Framealign, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Paquete de Análisis de Secuencias de Fristensky), GAP (Programa de Alineación Global), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Comparación Sensitiva de Secuencias), LALIGN (Alineación de Secuencia Local), LCP (Programa de Contenido Local), MACAW (Construcción de Alineación Múltiple y Mesa de Trabajo de Análisis), MAP (Programa de Alineación Múltiple), MBLKP, MBLKN, PIMA (Alineación Multi-secuencia Inducida por Patrones), SAGA (Alineación de Secuencias mediante Algoritmo Genético) y WHAT-IF. Tales programas de alineación también se pueden utilizar para seleccionar bases de datos de genomas para identificar las secuencias de polinucleótido que tienen secuencias sustancialmente idénticas. Una serie de bases de datos de genomas están disponibles, por ejemplo, una porción sustancial del genoma humano está disponible como parte del Proyecto de Secuenciación del Human Genome Sequencing Project (Gibbs, 1995). Varios genomas se han secuenciado, por ejemplo, *M. genitalium* (Fraser et al., 1995), *M. jannaschii* (Bult et al., 1996), *H. influenzae* (Fleischmann et al., 1995), *E. coli* (Blattner et al., 1997), y levadura (*S. cerevisiae*) (Mewes et al., 1997), y *D. melanogaster* (Adams et al., 2000). También se ha realizado un progreso significativo en la secuenciación de los genomas de organismo modelo, tales como ratón, *C. elegans*, y *Arabidopsis sp.* Las bases de datos que contienen información genómica anotada con alguna información funcional se mantienen por diferentes organizaciones, y son accesibles vía Internet.

Los algoritmos BLAST, BLAST 2.0 y BLAST 2.2.2 también se utilizan para practicar la invención. Éstos se describen, por ejemplo, en Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. El software para realizar el análisis BLAST está públicamente disponible a través del National Center for Biotechnology

Information. Este algoritmo involucra primero identificar pares de secuencias de alta puntuación (HSPs) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, la cual ya sea empata o satisface alguna puntuación T umbral de valor positivo cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere como el umbral de la puntuación de la palabra vecina (Altschul (1990) más arriba). Estos aciertos de palabra vecina inicial actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSPs más largos que los contengan. Los aciertos de palabra se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como la puntuación de la alineación acumulada se pueda incrementar. Las puntuaciones acumuladas se calculan utilizando, para las secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0). Para las secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulada. La extensión de los aciertos de palabra en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye por la cantidad X desde su valor máximo logrado; la puntuación acumulada llega a cero o por debajo, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos de puntuación negativa; o se alcanza el extremo de cualquier secuencia. Los parámetros W , T , y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza como defectos (configuraciones predeterminadas) una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$ y una comparación de ambas hebras. Para las secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza como defectos una longitud de palabra de 3, y expectativas (E) de 10, y la matriz de puntuación de BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915), alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$, y una comparación de ambas hebras. El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873). Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos ocurriría fortuitamente. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, más preferiblemente menor que aproximadamente 0,01, y sumamente preferiblemente menor que aproximadamente 0,001. En un aspecto, las homologías de las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos se evalúan utilizando la Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica ("BLAST"). Por ejemplo, cinco programas específicos BLAST se pueden utilizar para realizar la siguiente tarea: (1) BLASTP y BLAST3 comparan una secuencia de aminoácidos de consulta contra una base de datos de secuencias de proteínas; (2) BLASTN compara una secuencia nucleotídica de consulta contra una base de datos de secuencia nucleotídica; (3) BLASTX compara los productos de traducción conceptuales de seis marcos de una secuencia nucleotídica de consulta (ambas hebras) contra una base de datos de secuencias de proteínas; (4) TBLASTN compara una secuencia de proteínas de consulta contra una base de datos de secuencias de nucleótidos traducida en los seis marcos de lectura (ambas hebras); y (5) TBLASTX compara las traducciones de los seis marcos de una secuencia nucleotídica de consulta contra las traducciones de seis marcos de una base de datos de secuencias de nucleótidos. Los programas BLAST identifican secuencias homólogas mediante la identificación de segmentos similares, que se refieren aquí como "pares de segmentos de alta puntuación", entre una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de consulta y una secuencia de ensayo que se obtiene preferiblemente de una base de datos de secuencias de proteínas o de ácidos nucleicos. Los pares de segmentos de alta puntuación se identifican preferiblemente (es decir, se alinean) por medio de una matriz de puntuación, muchos de los cuales se conocen en la técnica. Preferiblemente, la matriz de puntuación utilizada es la matriz BLOSUM62 (Gonnet et al., Science 256:1443-1445, 1992; Henikoff and Henikoff, Proteins 17:49-61, 1993). Menos preferiblemente, también se pueden utilizar las matrices PAM o PAM250 (véase, por ejemplo, Schwartz and Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation).

En un aspecto de la invención, para determinar si un ácido nucleico tiene la identidad de secuencia requerida para estar dentro del alcance de la invención, se utiliza el programa NCBI BLAST 2.2.2. Opciones de defecto para blastp. Existen aproximadamente 38 opciones de configuración en el programa BLAST 2.2.2. En este aspecto ejemplar de la invención, se utilizan todos los valores predeterminados excepto por la configuración del filtrado predeterminada (es decir, todos los parámetros se establecen a predeterminado excepto el filtrado que se establece a APAGADO); en su lugar se utiliza una configuración "-F F", que desactiva el filtrado. El uso del filtrado predeterminado a menudo da como resultado violaciones de Karlin-Altschul debido a la corta longitud de la secuencia.

Los valores predeterminados utilizados en este aspecto ejemplar de la invención, según se describe anteriormente, incluyen:

- 55 "Filtro para baja complejidad: ENCENDIDO
 - > Tamaño de palabra: 3
 - > Matriz: Blosum62
 - > Costes de hueco: Existencia: 11
 - > Extensión: 1"

Otras configuraciones predeterminadas son: filtro para baja complejidad APAGADO, tamaño de palabra de 3 para proteína, matriz BLOSUM62, penalización de existencia de hueco de -11 y una penalización de extensión de hueco de -1.

- 5 Una configuración ejemplar del programa NCBI BLAST 2.2.2 se establece en el Ejemplo 1, debajo. Nótese que la opción "-W" se asienta predeterminadamente a 0. Esto significa que, si no se establece, el tamaño de palabra se asienta a 3 para las proteínas y a 11 para los nucleótidos.

Hibridación de los ácidos nucleicos

- 10 La invención proporciona ácidos nucleicos aislados, sintéticos o recombinantes que se hibridan bajo condiciones rigurosas a una secuencia ejemplar de la invención, por ejemplo, una secuencia según se establece en la SEQ ID NO:5 y que tiene una o más mutaciones según se establece en las Tablas 12 a 15, según se describe en el Ejemplo 3, debajo, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia según se establece en la SEQ ID NO: 6 y que codifica una o más mutaciones según se establece en las Tablas 12 a 15, o un fragmento enzimáticamente activo del mismo.

- 15 Las condiciones rigurosas pueden ser condiciones altamente rigurosas, condiciones medianamente rigurosas, condiciones rigurosas bajas, incluyendo las condiciones de severidad alta y reducida aquí descritas. En realizaciones alternativas, los ácidos nucleicos de la invención según se define por su habilidad para hibridar bajo condiciones rigurosas pueden ser entre aproximadamente cinco residuos y la longitud completa de la molécula, por ejemplo, un ácido nucleico ejemplar de la invención. Por ejemplo, pueden ser al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o más residuos de longitud. También se incluyen 20 ácidos nucleicos más cortos que la longitud completa. Estos ácidos nucleicos son útiles como, por ejemplo, sondas de hibridación, sondas de etiquetado, sondas de oligonucleótidos de PCR, ARNi (de una o dos hebras), antisentido o secuencias que codifican los péptidos (epítopos) de unión a anticuerpo, motivos, sitios activos, dominios de unión, dominios reguladores, y similares.

- 25 En un aspecto, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su habilidad para hibridarse bajo alta severidad que comprende condiciones de aproximadamente formamida al 50% en aproximadamente 37°C a 42°C. En un aspecto, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su habilidad para hibridarse bajo severidad reducida que comprende condiciones en aproximadamente formamida al 35% a 25% en aproximadamente 30°C a 35°C. Alternativamente, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su habilidad para hibridarse bajo alta severidad que comprende condiciones a 42°C en formamida al 50%, 5X SSPE, SDS al 0,3%, y un ácido nucleico que bloquea 30 secuencias repetitivas, tal como cot-1 o ADN de esperma de salmón (por ejemplo, 200 ug/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado). En un aspecto, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su habilidad para hibridarse bajo condiciones de severidad reducida que comprenden formamida al 35% a una temperatura reducida de 35°C.

- 35 Después de la hibridación, el filtro se puede lavar con 6X SSC, SDS al 0,5% a 50°C. Se considera que estas condiciones son condiciones "moderadas" por encima de formamida al 25% y condiciones "bajas" por debajo de formamida al 25%. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación "moderadas" es cuando la hibridación anterior se conduce en formamida al 30%. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación de "baja severidad" es cuando la hibridación anterior se conduce en formamida al 10%.

- 40 El rango de temperatura correspondiente a un nivel particular de severidad se puede estrechar adicionalmente calculando la relación de purina a pirimidina del ácido nucleico de interés y ajustando la temperatura en consecuencia. Los ácidos nucleicos de la invención también se definen por su habilidad para hibridarse bajo condiciones de severidad altas, medias, y bajas según se establece en Ausubel y Sambrook. Se pueden utilizar variaciones en los rangos y condiciones anteriores para practicar la invención y son bien conocidos en la técnica. Las condiciones de hibridación se discuten adicionalmente, debajo.

- 45 Sondas de oligonucleótidos y métodos para utilizarlas

- La invención también proporciona sondas de ácidos nucleicos para identificar y/o aislar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa. En un aspecto, la sonda comprende o consiste en un ácido nucleico de la invención, por ejemplo, un ácido nucleico que tiene una secuencia según se establece en la SEQ ID NO: 5 y que tiene uno o más cambios (mutaciones) de base según se establece en las Tablas 12 a 15, según se describe en el Ejemplo 3, debajo, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una 50 secuencia según se establece en la SEQ ID NO:6 y que codifica uno o más cambios (mutaciones) de residuos de aminoácidos según se establece en las Tablas 12 a 15, o un fragmento enzimáticamente activo de los mismos.

- Alternativamente, una sonda de la invención puede ser al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, o 150, o más, o 55 aproximadamente 10 a 50, aproximadamente 20 a 60, aproximadamente 30 a 70, bases consecutivas de una secuencia de ácidos nucleicos de la invención.

Las sondas identifican un ácido nucleico mediante unión o hibridación. En realizaciones alternativas, la hibridación comprende el proceso mediante el cual una hebra de ácido nucleico se une con una hebra complementaria a través del apareamiento de bases. Las reacciones de hibridación pueden ser sensitivas y selectivas de modo que una secuencia particular de interés se puede identificar incluso en muestras en las cuales está presente en bajas concentraciones. Las condiciones apropiadamente rigurosas se pueden definir mediante, por ejemplo, las concentraciones de sal o formamida en las disoluciones de prehibridación e hibridación, o mediante la temperatura de hibridación, y son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la severidad se puede incrementar reduciendo la concentración de sal, incrementando la concentración de formamida, o elevando la temperatura de hibridación, alterando el tiempo de hibridación, según se describe en detalle, debajo. En aspectos alternativos, los ácidos nucleicos de la invención se definen por su habilidad para hibridarse bajo varias condiciones de severidad (por ejemplo, alta, media, y baja), según se establece aquí.

Las sondas se pueden utilizar en matrices de la invención, véase la descripción debajo, incluyendo, por ejemplo, matrices capilares. Las sondas de la invención también se pueden utilizar para aislar y/o identificar otros polipéptidos o ácidos nucleicos que codifican la fosfolipasa que tienen una actividad de fosfolipasa.

Las sondas de la invención se pueden utilizar para determinar si una muestra biológica, tal como una muestra de tierra, contiene un organismo que tiene una secuencia de ácidos nucleicos de la invención. En tales procedimientos, se obtiene una muestra biológica que alberga potencialmente el organismo a partir del cual se aisló el ácido nucleico, y se obtienen los ácidos nucleicos a partir de la muestra. Los ácidos nucleicos se contactan con la sonda bajo condiciones que permiten que la sonda específicamente se hibride a cualquier secuencia complementaria presente en la muestra. Donde sea necesario, las condiciones que permiten que la sonda específicamente se hibride a las secuencias complementarias se pueden determinar poniendo la sonda en contacto con secuencias complementarias de muestras conocidas por contener la secuencia complementaria, así como también con secuencias de control que no contienen la secuencia complementaria. Las condiciones de hibridación, tales como la concentración de sal del amortiguador de hibridación, la concentración de formamida del amortiguador de hibridación, o la temperatura de hibridación, se pueden variar para identificar las condiciones que permiten que la sonda específicamente se hibride a los ácidos nucleicos complementarios (véase la descripción sobre las condiciones de hibridación específicas).

Si la muestra contiene el organismo a partir del cual se aisló el ácido nucleico, se detecta entonces la hibridación específica de la sonda. La hibridación se puede detectar etiquetando la sonda con un agente detectable tal como un isótopo radiactivo, un tinte fluorescente o una enzima capaz de catalizar la formación de un producto detectable. Muchos métodos para utilizar las sondas etiquetadas para detectar la presencia de ácidos nucleicos complementarios en una muestra son familiares para aquellos expertos en la técnica. Estos incluyen transferencias Southern, transferencias Northern, procedimientos de hibridación de colonias, y transferencias de punto. Los protocolos para cada uno de estos procedimientos se proporcionan en Ausubel y Sambrook.

Alternativamente, más de una sonda (al menos una de las cuales es capaz de específicamente hibridarse a cualquiera de las secuencias complementarias que están presentes en la muestra de ácido nucleico) se puede utilizar en una reacción de amplificación para determinar si la muestra contiene un organismo que contiene una secuencia de ácidos nucleicos de la invención (por ejemplo, un organismo a partir del cual se aisló el ácido nucleico). En un aspecto, las sondas comprenden oligonucleótidos. En un aspecto, la reacción de amplificación puede comprender una reacción de PCR. Los protocolos de PCR se describen en Ausubel y Sambrook (véase la descripción sobre las reacciones de amplificación). En tales procedimientos, los ácidos nucleicos en la muestra se contactan con las sondas, se realiza la reacción de amplificación, y se detecta cualquier producto de amplificación resultante. El producto de amplificación se puede detectar realizando electroforesis en gel sobre los productos de reacción y tiñendo el gel con un intercalador tal como bromuro de etidio. Alternativamente, una o más de las sondas se pueden etiquetar con un isótopo radiactivo, y la presencia de un producto de amplificación radiactivo se puede detectar mediante autorradiografía después de la electroforesis en gel.

Las sondas derivadas a partir de secuencias cerca de los extremos 3' o 5' de una secuencia de ácidos nucleicos de la invención también se pueden utilizar en los procedimientos de desplazamiento sobre el cromosoma para identificar los clones que contienen por ejemplo, secuencias genómicas adicionales. Tales métodos permiten el aislamiento de genes que codifican proteínas adicionales de interés del organismo hospedante.

En un aspecto, las secuencias de ácidos nucleicos de la invención se utilizan como sondas para identificar y aislar ácidos nucleicos relacionados. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos relacionados así identificados pueden ser ADNc's o ADN's genómicos de organismos aparte de aquel a partir del cual se aisló primero el ácido nucleico de la invención. En tales procedimientos, una muestra de ácido nucleico se contacta con la sonda bajo condiciones que permiten que la sonda específicamente se hibride a las secuencias relacionadas. La hibridación de la sonda a ácidos nucleicos del organismo relacionado se detecta entonces utilizando cualquiera de los métodos anteriormente descritos.

En reacciones de hibridación del ácido nucleico, las condiciones utilizadas para lograr un nivel particular de severidad variarán, dependiendo de la naturaleza del ácido nucleico que se hibrida. Por ejemplo, la longitud, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia nucleotídica (por ejemplo, el contenido de GC frente a

AT), y el tipo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN frente a ADN) de las regiones de hibridación de los ácidos nucleicos se pueden considerar en la selección de las condiciones de hibridación. En realizaciones alternativas, un ácido nucleico se inmoviliza, por ejemplo, en un filtro. La hibridación se puede llevar a cabo bajo condiciones de baja severidad, severidad moderada o alta severidad. Como un ejemplo de la hibridación del ácido nucleico, una membrana de polímero que contiene ácidos nucleicos desnaturalizados inmovilizados se pre-hibrida primero durante 30 minutos a 45°C en una disolución que consiste en NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0, Na₂EDTA 5,0 mM, SDS al 0,5%, 10X reactivo de Denhardt, y 0,5 mg/ml de ácido polirribonucleico. Aproximadamente 2×10^7 cpm (actividad específica 4 a 9×10^8 cpm/ug) de sonda de oligonucleótidos etiquetada en un extremo con ³²P se pueden añadir a la disolución. En realizaciones alternativas, después de aproximadamente 12 a 16 horas de incubación, la membrana se lava durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) en 1X SET (NaCl 150 mM, hidrocloreuro de Tris 20 mM, pH 7,8, Na₂EDTA 1 mM) que contiene SDS al 0,5%, seguido de un lavado de 30 minutos en 1X SET reciente a T_m - 10°C para la sonda de oligonucleótidos. La membrana se puede exponer a una película auto-radiográfica para la detección de señales de hibridación.

Variando la severidad de las condiciones de hibridación utilizadas para identificar ácidos nucleicos, tales como ADNc's o ADN's genómicos, que se hibridan a la sonda detectable, se pueden identificar y aislar los ácidos nucleicos que tienen diferentes niveles de homología con la sonda. La severidad se puede variar conduciendo la hibridación a diversas temperaturas debajo de las temperaturas de fusión de las sondas. La temperatura de fusión, T_m, es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) en la cual el 50% de la secuencia objetivo se hibrida a una sonda perfectamente complementaria. Las condiciones muy rigurosas se seleccionan para ser iguales a o aproximadamente 5°C menores que la T_m para una sonda particular. La temperatura de fusión de la sonda se puede calcular utilizando las siguientes fórmulas ejemplares. Para sondas entre 14 y 70 nucleótidos de longitud la temperatura de fusión (T_m) se calcula utilizando la fórmula: $T_m = 81,5 + 16,6 (\log [Na^+]) + 0,41 (\text{fracción G+C}) - (600/N)$, donde N es la longitud de la sonda. Si la hibridación se lleva a cabo en una disolución que contiene formamida, la temperatura de fusión se puede calcular utilizando la ecuación: $T_m = 81,5 + 16,6 (\log [Na^+]) + 0,41 (\text{fracción G+C}) - (\text{formamida al } 0,63\%) - (600/N)$, donde N es la longitud de la sonda. La pre-hibridación se puede llevar a cabo en 6X SSC, 5X reactivo de Denhardt, SDS al 0,5%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado fragmentado, o 6X SSC, 5X reactivo de Denhardt, SDS al 0,5%, 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado fragmentado, formamida al 50%. Las fórmulas para SSC y reactivo de Denhardt y otras disoluciones se listan, por ejemplo, en Sambrook.

La hibridación se conduce añadiendo la sonda detectable a las disoluciones de prehibridación listadas anteriormente. Donde la sonda comprende ADN de doble hebra, se desnaturaliza antes de la adición a la disolución de hibridación. El filtro se contacta con la disolución de hibridación durante un período de tiempo suficiente para permitir que la sonda se hibride a ADNc's o ADN's genómicos que contienen secuencias complementarias a los mismos u homólogas a los mismos. Para sondas por encima de 200 nucleótidos de longitud, la hibridación se puede llevar a cabo a 15-25°C bajo la T_m. Para sondas más cortas, tales como las sondas de oligonucleótidos, la hibridación se puede conducir a 5-10°C debajo de la T_m. En un aspecto, las hibridaciones en 6X SSC se conducen a aproximadamente 68°C. En un aspecto, las hibridaciones en disoluciones que contienen formamida al 50% se conducen a aproximadamente 42°C. Se consideraría que todas las hibridaciones anteriores están bajo condiciones de alta severidad.

Después de la hibridación, el filtro se lava para eliminar cualquier sonda detectable no específicamente unida. La severidad utilizada para lavar los filtros también se puede variar dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se hibridan, la longitud de los ácidos nucleicos que se hibridan, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia nucleotídica (por ejemplo, el contenido de GC frente a AT), y el tipo de ácido nucleico (por ejemplo, ARN frente a ADN). Ejemplos de los lavados de condición de severidad progresivamente superior que se pueden utilizar para practicar esta invención son: 2X SSC, SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante 15 minutos (baja severidad); 0,1X SSC, SDS al 0,5% a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1 hora (severidad moderada); 0,1X SSC, SDS al 0,5% durante 15 a 30 minutos a entre la temperatura de hibridación y 68°C (alta severidad); y NaCl 0,15M durante 15 minutos en 72°C (severidad muy alta). Un lavado final de baja severidad se puede conducir en 0,1X SSC a temperatura ambiente. Los ejemplos anteriores son meramente ilustrativos de un conjunto de condiciones que se pueden utilizar para practicar la invención, por ejemplo, para lavar filtros o matrices. Alguien de habilidad en la técnica sabría que existen numerosas recetas para lavados de diferentes severidades, todas las cuales se pueden utilizar para practicar la invención.

Los ácidos nucleicos que se han hibridado a la sonda se pueden identificar mediante autorradiografía u otras técnicas convencionales. El procedimiento anteriormente mencionado se puede modificar para identificar ácidos nucleicos que tienen niveles decrecientes de homología con la secuencia de la sonda. Por ejemplo, para obtener ácidos nucleicos de homología decreciente con la sonda detectable, se pueden utilizar condiciones menos rigurosas. Por ejemplo, la temperatura de hibridación se puede disminuir en incrementos de 5°C desde 68°C hasta 42°C en un amortiguador de hibridación que tiene una concentración de Na⁺ de aproximadamente 1M. Después de la hibridación, el filtro se puede lavar con 2X SSC, SDS al 0,5% a la temperatura de hibridación. Se considera que estas condiciones son condiciones "moderadas" por encima de 50°C y condiciones "bajas" por debajo de 50°C. Un ejemplo de condiciones de hibridación "moderadas" es cuando la hibridación anteriormente mencionada se conduce

a 55°C. Un ejemplo de condiciones de hibridación de “baja severidad” es cuando la hibridación anteriormente mencionada se conduce a 45°C.

5 En realizaciones alternativas, la hibridación se lleva a cabo en amortiguadores, tales como 6X SSC, que contienen formamida a una temperatura de 42°C. En este caso, la concentración de formamida en el amortiguador de hibridación se puede reducir en incrementos de 5% desde 50% hasta 0% para identificar clones que tienen niveles decrecientes de homología con la sonda. Después de la hibridación, el filtro se puede lavar con 6X SSC, SDS al 0,5% a 50°C. En realizaciones alternativas, las condiciones “moderadas” son por encima de formamida al 25% y las condiciones “bajas” son por debajo de formamida al 25%. En realizaciones alternativas, las condiciones de hibridación “moderadas” son cuando la hibridación anteriormente mencionada se conduce en formamida al 30%. En realizaciones alternativas, las condiciones de hibridación de “baja severidad” son cuando la hibridación anteriormente mencionada se conduce en formamida al 10%.

15 Estas sondas y métodos de la invención se pueden utilizar para aislar ácidos nucleicos que tienen una secuencia con al menos aproximadamente 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55%, o al menos 50% de homología con una secuencia de ácidos nucleicos de la invención que comprende al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, o 500 bases consecutivas de la misma, y las secuencias complementarias para la misma. La homología se puede medir utilizando un algoritmo de alineación, según se describe aquí. Por ejemplo, los polinucleótidos homólogos pueden tener una secuencia de codificación que es una variante alélica existente de manera natural de una de las secuencias de codificación aquí descritas. Tales variantes alélicas pueden tener una sustitución, eliminación o adición de uno o más nucleótidos cuando se compara con los ácidos nucleicos de la invención.

20 Adicionalmente, las sondas y métodos de la invención se pueden utilizar para aislar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que tienen al menos aproximadamente 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55%, o al menos 50% de identidad de secuencia (homología) con un polipéptido de la invención que comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, o 150 aminoácidos consecutivos de los mismos según se determina utilizando un algoritmo de alineación de secuencias (por ejemplo, tal como el algoritmo FASTA versión 3.0t78 con los parámetros predeterminados, o un programa BLAST 2.2.2 con las configuraciones ejemplares según se establece aquí).

Inhibición de la Expresión de Fosfolipasas

30 La invención adicionalmente proporciona ácidos nucleicos complementarios a (por ejemplo, secuencias antisentido para) los ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican la fosfolipasa. Las secuencias antisentido son capaces de inhibir el transporte, ajuste o transcripción de los genes que codifican la fosfolipasa. La inhibición se puede llevar a cabo a través seleccionar como objetivo el ADN genómico o ARN mensajero (ARNm, un transcrito). La transcripción o función de ácido nucleico seleccionado como diana se puede inhibir, por ejemplo, mediante hibridación y/o escisión. Un conjunto particularmente útil de inhibidores provistos por la presente invención incluye oligonucleótidos que son capaces de ya sea unirse al mensaje o al gen de fosfolipasa, en cualquier caso previniendo o inhibiendo la producción o la función de enzima fosfolipasa. La asociación puede ser a través de hibridación específica de la secuencia. Otra clase útil de inhibidores incluye oligonucleótidos que causan inactivación o escisión del mensaje de fosfolipasa. El oligonucleótido puede tener actividad de enzima que causa tal escisión, tales como las ribozimas. El oligonucleótido puede ser químicamente modificado o conjugado a una enzima o composición capaz de escindir el ácido nucleico complementario. Se puede identificar un conjunto de muchos diferentes de tales oligonucleótidos para aquellos con la actividad deseada.

45 La inhibición de la expresión de fosfolipasa puede tener una variedad de aplicaciones industriales. Por ejemplo, la inhibición de la expresión de fosfolipasa puede desacelerar o prevenir la putrefacción. La putrefacción puede ocurrir cuando los lípidos o polipéptidos, por ejemplo, los polipéptidos o lípidos estructurales, se degradan enzimáticamente. Esto puede conducir al deterioro, o descomposición de frutas y verduras. En un aspecto, el uso de las composiciones de la invención que inhiben la expresión y/o la actividad de fosfolipasa, por ejemplo, anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, ribozimas y ARNi, se usa para desacelerar o prevenir la putrefacción. De esta manera, en un aspecto, la invención proporciona métodos y composiciones que comprenden aplicar sobre una planta o un producto vegetal (por ejemplo, una fruta, semilla, raíz, hoja, etc.), anticuerpos, oligonucleótidos antisentido, ribozimas y ARNi de la invención para desacelerar o prevenir la putrefacción. Estas composiciones también se pueden expresar por la planta (por ejemplo, una planta transgénica) u otro organismo (por ejemplo, una bacteria u otro microorganismo transformado con un gen de fosfolipasa de la invención).

55 Las composiciones de la invención para la inhibición de la expresión de fosfolipasa (por ejemplo, antisentido, ARNi, ribozimas, anticuerpos) se pueden utilizar como composiciones farmacéuticas.

Oligonucleótidos Antisentido

La invención proporciona oligonucleótidos antisentido capaces de unirse al mensaje de fosfolipasa que pueden inhibir la actividad de fosfolipasa seleccionando como diana el ARNm. Las estrategias para diseñar oligonucleótidos

antisentido se describen adecuadamente en la bibliografía científica y de patente, y el experto puede diseñar tales oligonucleótidos de fosfolipasa utilizando los reactivos novedosos de la invención. Por ejemplo, los protocolos de cartografiado de ARN/desplazamiento sobre el gen para seleccionar oligonucleótidos antisentido efectivos son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183, que describe un ensayo de cartografiado de ARN, que se basa en técnicas moleculares estándar para proporcionar un método fácil y confiable para una selección potente de secuencias antisentido. Véase también Smith (2000) *Eur. J. PKarm. Sci.* 11:191-198.

Los ácidos nucleicos existentes de manera natural se utilizan como oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido pueden ser de cualquier longitud; por ejemplo, en aspectos alternativos, los oligonucleótidos antisentido son de entre aproximadamente 5 a 100, aproximadamente 10 a 80, aproximadamente 15 a 60, aproximadamente 18 a 40. La longitud óptima se puede determinar mediante selección de rutina. Los oligonucleótidos antisentido pueden estar presentes en cualquier concentración. La concentración óptima se puede determinar mediante selección de rutina. Se conoce una amplia variedad de análogos de ácidos nucleicos y nucleótidos sintéticos, no existentes de manera natural que se pueden ocupar de este problema potencial. Por ejemplo, se pueden utilizar ácidos nucleicos peptídicos (PNAs) que contienen estructuras principales no iónicas, tales como unidades de N-(2-aminoetil)glicina. También se pueden utilizar los oligonucleótidos antisentido que tienen enlaces de fosforotioato, como se describe en los documentos WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol Appl. Pharmacol.* 144:189-197; *Antisense Therapeutics*, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996).

Los oligonucleótidos antisentido que tienen análogos de estructura principal de ADN sintético provistos por la invención también pueden incluir ácidos nucleicos de fosforo-ditioato, metilfosfonato, fosforamidato, fosfotriéster de alquilo, sulfamato, 3'-tioacetil, metil(metilimino), 3'-N-carbamato, y morfolinocarbamato, como se describe anteriormente.

La metodología de química combinatoria se puede utilizar para crear vastos números de oligonucleótidos que se pueden seleccionar rápidamente para oligonucleótidos específicos que tienen afinidades de unión apropiadas y especificidades hacia cualquier diana, tal como las secuencias de fosfolipasa sentido y antisentido de la invención (véase, por ejemplo, Gold (1995) *J. of Biol. Chem.* 270:13581-13584).

Ribozimas inhibidoras

La invención proporciona ribozimas capaces de unirse al mensaje de fosfolipasa que pueden inhibir la actividad de enzima fosfolipasa seleccionando como diana el ARNm. Las estrategias para diseñar ribozimas y seleccionar la secuencia antisentido específica de fosfolipasa para la selección de la diana se describen adecuadamente en la bibliografía científica y de patente, y el experto puede diseñar tales ribozimas utilizando los reactivos novedosos de la invención. Los ribozimas actúan uniéndose a un ARN diana a través de la porción de unión al ARN diana de una ribozima que se mantiene en proximidad cercana a una porción enzimática del ARN que escinde el ARN diana. De esta manera, la ribozima reconoce y se une a un ARN diana a través del apareamiento de bases complementarias, y una vez unido al sitio correcto, actúa enzimáticamente para escindir y desactivar el ARN diana. La escisión de un ARN diana de tal manera destruirá su habilidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada si la escisión ocurre en la secuencia de codificación. Después de que una ribozima se ha unido y escindido su diana de ARN, típicamente se libera de ese ARN y de esta manera puede unirse y escindir nuevas dianas repetidamente.

En algunas circunstancias, la naturaleza enzimática de una ribozima puede ser ventajosa sobre otras tecnologías, tal como la tecnología antisentido (donde una molécula de ácido nucleico simplemente se une a un ácido nucleico diana para bloquear su transcripción, traducción o asociación con otra molécula) ya que la concentración efectiva de ribozima necesaria para efectuar un tratamiento terapéutico puede ser menor que aquella de un oligonucleótido antisentido. Esta ventaja potencial refleja la habilidad de la ribozima para actuar enzimáticamente. De esta manera, una sola molécula de ribozima es capaz de escindir muchas moléculas de ARN diana. Además, una ribozima es típicamente un inhibidor altamente específico, con la especificidad de inhibición dependiendo no sólo del mecanismo de unión por apareamiento de bases, sino también del mecanismo mediante el cual la molécula inhibe la expresión del ARN al cual se une. Es decir, la inhibición se debe a la escisión del ARN diana y de esta manera la especificidad se define como la relación de la tasa de escisión del ARN seleccionado como diana a la tasa de escisión del ARN no seleccionado como diana. Este mecanismo de escisión es dependiente de factores adicionales a aquellos involucrados en el apareamiento de bases. De esta manera, la especificidad de acción de una ribozima puede ser mayor que aquella del oligonucleótido antisentido que se une al mismo sitio de ARN.

La molécula de ARN de ribozima enzimática se puede formar en un motivo de cabeza de martillo, pero también se puede formar en el motivo de una horquilla, virus de hepatitis delta, intrón del grupo I o ARN similar a ARNasaP (en asociación con una secuencia guía de ARN). Ejemplos de tales motivos de cabeza de martillo se describen por Rossi (1992) *Aids Research and Human Retroviruses* 8:183; motivos de horquilla por Hampel (1989) *Biochemistry* 28:4929, y Hampel (1990) *Nuc. Acids Res.* 18:299; el motivo del virus de hepatitis delta por Perrotta (1992) *Biochemistry* 31:16; el motivo de ARNasaP por Guerrier-Takada (1983) *Cell* 35:849; y el intrón del grupo I por Cech Patente U.S. n° 4.987.071. La cita de estos motivos específicos no pretende ser limitante; aquellos expertos en la técnica reconocerán que una molécula de ARN enzimático de esta invención tiene un sitio de unión al sustrato específico complementario para una o más de las regiones de ARN de gen diana, y tiene una secuencia nucleotídica dentro o rodeando ese sitio de unión al sustrato que imparte una actividad de escisión de ARN a la molécula.

Interferencia de ARN (ARNi)

En un aspecto, la invención proporciona una molécula inhibidora de ARN, una molécula denominada "ARNi", que comprende una secuencia de fosfolipasa de la invención. La molécula de ARNi comprende una molécula de ARN de doble hebra (ARNds). El ARNi puede inhibir la expresión de un gen de fosfolipasa. En un aspecto, el ARNi es de aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más nucleótidos dobles de longitud. Mientras que la invención no se limita por algún mecanismo de acción particular, el ARNi puede entrar en una célula y causar la degradación de un ARN de una sola hebra (ARNss) de secuencias similares o idénticas, incluyendo ARNm's endógenos. Cuando una célula se expone a ARN de doble hebra (ARNds), el ARNm del gen homólogo se degrada selectivamente mediante un procedimiento denominado interferencia de ARN (ARNi). Un mecanismo básico posible detrás del ARNi es la ruptura de un ARN de doble hebra (ARNds) que empata una secuencia de genes específica en pequeños pedazos denominados ARN interferente corto, que disparan la degradación del ARNm que empata su secuencia. En un aspecto, los ARNis de la invención se utilizan en terapia de silenciamiento de genes, véase, por ejemplo, Shuey (2002) Drug Discov. Today 7:1040-1046. En un aspecto, la invención proporciona métodos para degradar selectivamente el ARN utilizando los ARNi's de la invención. El procedimiento se puede practicar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En un aspecto, las moléculas de ARNi de la invención se pueden utilizar para generar una mutación de pérdida de función en una célula, un órgano o un animal. Los métodos para obtener y utilizar las moléculas de ARNi para degradar selectivamente el ARN son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, las Patentes U.S. n^{os} 6.506. 559; 6.511.824; 6.515.109; 6.489.127.

Modificación de Ácidos Nucleicos

La invención proporciona métodos para generar variantes de los ácidos nucleicos de la invención, por ejemplo, aquellos que codifican una enzima fosfolipasa. En la realización alternativa, la invención proporciona métodos para modificar una enzima de la invención, por ejemplo, mediante mutación de su secuencia de codificación mediante métodos aleatorios o estocásticos, o, "evolución dirigida", o "no estocástica", tales como Gene Site Saturation Mutagenesis™ (GSSM), para alterar el pH de las enzimas, el rango de actividad o el rango de actividad óptima, e1 rango de temperatura de actividad o el rango de actividad óptima, la especificidad, la actividad (cinética); el uso de la enzima de glicosilación, fosforilación o metales (por ejemplo, Ca, Mg, Zn, Fe, Na), por ejemplo, para impactar la estabilidad del pH/temperatura. La invención proporciona métodos para modificar una enzima de la invención, por ejemplo, mediante mutación de su secuencia de codificación, por ejemplo, mediante GSSM, para incrementar su resistencia a la actividad de la proteasa. La invención proporciona métodos para modificar una enzima de la invención, por ejemplo, mediante mutación de su secuencia de codificación, por ejemplo, mediante GSSM, para modificar el uso de la enzima de agentes de quelación de metales específicos para Ca, Mg, Na que no quelarían Zn. La invención proporciona métodos para modificar una enzima de la invención, por ejemplo, mediante mutación de su secuencia de codificación, por ejemplo, mediante GSSM, que tendría una combinación deseada de actividades, por ejemplo, PLCs específicas de PI, PA y PC/PE.

En una realización, la "Mutagénesis de Saturación del Sitio Génico" (GSSM) o "GSSM" comprende un método que utiliza cebadores de oligonucleótido degenerados para introducir mutaciones puntuales en un polinucleótido, según se describe en detalle, debajo. En una realización, el "sistema de evolución dirigida optimizada" o "evolución dirigida optimizada" comprende un método para re-ensamblar fragmentos de secuencias de ácidos nucleicos relacionados, por ejemplo, genes relacionados, y se explica con detalle, debajo. En una realización, el "reensamblaje por ligación sintética" o "SLR" comprende un método para ligar fragmentos de oligonucleótidos en una manera no estocástica, y se explica con detalle, debajo.

En realizaciones alternativas, la invención proporciona "variantes" de ácidos nucleicos y polipéptidos ejemplares de la invención, incluyendo por ejemplo, la SEQ ID NO: 8, codificados por ejemplo, mediante SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 o SEQ ID NO:9. En realizaciones alternativas las variantes de polinucleótidos o polipéptidos de la invención son ácidos nucleicos o polipéptidos que se han modificado en uno o más pares de bases, codones, intrones, exones, o residuos de aminoácidos (respectivamente) que todavía retienen la actividad biológica de una fosfolipasa. Las variantes se pueden producir por cualquier número de medios, incluyendo métodos tales como, por ejemplo, PCR propensa a error, barajado, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis por PCR sexual, mutagénesis *in vivo*, mutagénesis por inserción de casete, mutagénesis de conjunto recursivo, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica del sitio, reensamblaje génico, GSSM, y cualquier combinación de los mismos. Las técnicas para producir fosfolipasas variantes que tienen actividad a un pH o temperatura, por ejemplo, que es diferente de una fosfolipasa de tipo salvaje, se incluyen aquí.

Estos métodos se pueden repetir o utilizar en varias combinaciones para generar enzimas de fosfolipasa que tienen una actividad alterada o diferente o una estabilidad alterada o diferente de aquella de una fosfolipasa codificada por el ácido nucleico molde. Estos métodos también se pueden repetir o utilizar en varias combinaciones, por ejemplo, para generar variaciones en la expresión del gen/mensaje, traducción del mensaje o estabilidad del mensaje. En otro aspecto, la composición genética de una célula se altera mediante, por ejemplo, modificación de un gen homólogo *ex vivo*, seguido de su reinserción en la célula.

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

- Los métodos para la mutación aleatoria de genes son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, la Patente U.S. nº 5.830.696. Por ejemplo, los mutágenos se pueden utilizar para mutar aleatoriamente un gen. Los mutágenos incluyen, por ejemplo, irradiación gamma o de luz ultravioleta, o un mutágeno químico, por ejemplo, mitomicina, ácido nitroso, psoralenos fotoactivados, solos o en combinación, para inducir rupturas de ADN susceptibles para reparar mediante recombinación. Otros mutágenos químicos incluyen, por ejemplo, bisulfito de sodio, ácido nitroso, hidroxilamina, hidrazina, o ácido fórmico. Otros mutágenos son análogos de precursores de nucleótidos, por ejemplo, nitrosoguanidina, 5-bromouracilo, 2-aminopurina, o acridina. Estos agentes se pueden añadir a una reacción de PCR en lugar del precursor del nucleótido mutando por consiguiente la secuencia. También se pueden utilizar agentes intercalantes tales como proflavina, acriflavina, quinacrina, y similares.
- Se puede usar cualquier técnica en biología molecular, por ejemplo mutagénesis por PCR al azar, véase, por ejemplo, Rice (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5467-5471; o mutagénesis de múltiples casetes combinatoria, por ejemplo véase Cramer (1995) *Biotechniques* 18:194-196. Como alternativa, los ácidos nucleicos, por ejemplo genes, se pueden reensamblar tras la fragmentación al azar, o "estocástica", véanse, por ejemplo, las patentes U.S. nºs 6.291.242; 6.287.862; 6.287.861; 5.955.358; 5.830.721; 5.824.514; 5.811.238; 5.605.793. En aspectos alternativos, se introducen modificaciones, adiciones o supresiones mediante PCR propensa a error, transposición de fragmentos, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis de PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis de inserción de casete, mutagénesis de conjunto recursiva, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica del sitio, reensamblaje génico, mutagénesis saturada de sitio génico (GSSM), reensamblaje de ligación sintética (SLR), recombinación, recombinación de secuencia recursiva, mutagénesis de ADN modificado con fosfoato, mutagénesis de molde que contiene uracilo, mutagénesis de dúplex con saltos, mutagénesis de reparación de desemparejamientos de punto, mutagénesis de cepa hospedante deficiente en la reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis de supresión, mutagénesis de restricción-selección, mutagénesis de restricción-purificación, síntesis de genes artificiales, mutagénesis de conjunto, creación de multímeros de ácidos nucleicos quiméricos, y/o una combinación de estos y otros métodos.
- Las siguientes publicaciones describen una variedad de procedimientos y/o métodos de recombinación recursivos que se pueden incorporar en los métodos de la invención: Stemmer (1999) "Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties" *Tumor Targeting* 4:1-4; Ness (1999) *Nature Biotechnology* 17:893-896; Chang (1999) "Evolution of a cytokine using DNA family shuffling" *Nature Biotechnology* 17:793-797; Minshull (1999) "Protein evolution by molecular breeding" *Current Opinion in Chemical Biology* 3:284-290; Christians (1999) "Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling" *Nature Biotechnology* 17:259-264; Cramer (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution" *Nature* 391:288-291; Cramer (1997) "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling", *Nature Biotechnology* 15:436-438; Zhang (1997) "Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Patten et al. (1997) "Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines" *Current Opinion in Biotechnology* 8:724-733; Cramer et al. (1996) "Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling" *Nature Medicine* 2:100-103; Cramer et al. (1996) "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling" *Nature Biotechnology* 14:315-319; Gates et al. (1996) "Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor 'headpiece dimer'" *Journal of Molecular Biology* 255:373-386; Stemmer (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" *En: The Encyclopedia of Molecular Biology*. VCH Publishers, Nueva York. p. 447-457; Cramer y Stemmer (1995) "Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes" *BioTechniques* 18:194-195; Stemmer et al. (1995) "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides" *Gene*, 164:49-53; Stemmer (1995) "The Evolution of Molecular Computation" *Science* 270: 1510; Stemmer (1995) "Searching Sequence Space" *Bio/Technology* 13:549-553; Stemmer (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" *Nature* 370:389-391; y Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.
- Los métodos mutacionales para generar diversidad incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio (Ling et al. (1997) "Approaches to DNA mutagenesis: an overview" *Anal Biochem.* 254(2): 157-178; Dale et al. (1996) "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method" *Methods Mol. Biol.* 57:369-374; Smith (1985) "In vitro mutagenesis" *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein y Shortle (1985) "Strategies and applications of in vitro mutagenesis" *Science* 229:1193-1201; Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" *Biochem. J.* 237:1-7; y Kunkel (1987) "The efficiency of oligonucleotide-directed mutagenesis" in *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. y Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlín)); mutagénesis que usa moldes que contienen uracilo (Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Methods in Enzymol.* 154, 367-382; y Bass et al. (1988) "Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities" *Science* 242:240-245); mutagénesis dirigida por oligonucleótidos (Methods in Enzymol. 100: 468-500 (1983); *Methods in Enzymol.* 154: 329-350 (1987); Zoller y Smith (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment" *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500; Zoller y Smith (1983) "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 100:468-500; y Zoller y Smith (1987) "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template" *Methods in*

Enzymol. 154:329-350); mutagénesis de DNA modificado con fosforotioato (Taylor et al. (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" Nucl. Acids Res. 13: 8749-8764; Taylor et al. (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" Nucl. Acids Res. 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" Nucl. Acids Res. 14: 9679-9698; Sayers et al. (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" Nucl. Acids Res. 16:791-802; y Sayers et al. (1988) "Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide" Nucl. Acids Res. 16: 803-814); mutagénesis que usa ADN dúplex con saltos (Kramer et al. (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" Nucl. Acids Res. 12: 9441-9456; Kramer y Fritz (1987) Methods in Enzymol. "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA" 154:350-367; Kramer et al. (1988) "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations" Nucl. Acids Res. 16: 7207; y Fritz et al. (1988) "Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro" Nucl. Acids Res. 16: 6987-6999).

Los protocolos adicionales usados en los métodos de la invención incluyen reparación de desemparejamientos de punto (Kramer (1984) "Point Mismatch Repair" Cell 38:879-887), mutagénesis que usa cepas hospedantes deficientes en la reparación (Carter et al. (1985) "Improved oligonucleotide site-directed mutagenesis using M13 vectors" Nucl. Acids Res. 13: 4431-4443; y Carter (1987) "Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors" Methods in Enzymol. 154: 382-403), mutagénesis de supresión (Eghtedarzadeh (1986) "Use of oligonucleotides to generate large deletions" Nucl. Acids Res. 14: 5115), mutagénesis de restricción-selección y restricción-selección y restricción-purificación (Wells et al. (1986) "Importance of hydrogen-bond formation in stabilizing the transition state of subtilisin" Phil. Trans. R Soc. Lond. A 317: 415-423), mutagénesis mediante síntesis génica total (Nambiar et al. (1984) "Total synthesis and cloning of a gene coding for the ribonuclease S protein" Science 223: 1299-1301; Sakamar y Khorana (1988) "Total synthesis and expression of a gene for the a-subunit of bovine rod outer segment guanine nucleotide-binding protein (transducin)" Nucl. Acids Res. 14: 6361-6372; Wells et al. (1985) "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites" Gene 34:315-323; y Grundstrom et al. (1985) "Oligonucleotide-directed mutagenesis by microscale 'shot-gun' gene synthesis" Nucl. Acids Res. 13: 3305-3316), reparación de ruptura bicatenaria (Mandecki (1986); Arnold (1993) "Protein engineering for unusual environments" Current Opinion in Biotechnology 4:450-455. "Oligonucleotide-directed double-strand break repair in plasmids of Escherichia coli: a method for site-specific mutagenesis" Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:7177-7181). En Methods in Enzymology Volumen 154, que también describe controles útiles para resolver problemas con diversos métodos de mutagénesis, se pueden encontrar detalles adicionales sobre muchos de los métodos anteriores.

Véanse también las patentes U.S. nº 5.605.793 de Stemmer (25 de febrero de 1997), "Methods for In Vitro Recombination"; Patente U.S. nº 5.811.238 de Stemmer et al. (22 de septiembre de 1998) "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination"; Patente U.S. nº 5.830.721 de Stemmer et al. (3 de noviembre de 1998), "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; Patente U.S. nº 5.834.252 de Stemmer, et al. (10 de noviembre de 1998) "End-Complementary Polymerase Reaction"; Patente U.S. nº 5.837.458 de Minshull, et al. (17 de noviembre de 1998), "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering"; documento WO 95/22625, Stemmer y Cramer, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; documento WO 96/33207 por Stemmer y Lipschutz "End Complementary Polymerase Chain Reaction"; documento WO 97/20078 por Stemmer y Cramer "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination"; documento WO 97/35966 por Minshull y Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering"; documento WO 99/41402 por Punnonen et al. "Targeting of Genetic Vaccine Vectors"; documento WO 99/41383 por Punnonen et al. "Antigen Library Immunization"; documento WO 99/41369 por Punnonen et al. "Genetic Vaccine Vector Engineering"; documento WO 99/41368 por Punnonen et al. "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines"; documento EP 752008 por Stemmer y Cramer, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly"; documento EP 0932670 por Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination"; documento WO 99/23107 por Stemmer et al., "Modification of Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling"; documento WO 99/21979 por Apt et al., "Human Papillomavirus Vectors"; documento WO 98/31837 por del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination"; documento WO 98/27230 por Patten y Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering"; documento WO 98/27230 por Stemmer et al., "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection", documento WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries", documento WO 00/09679, "Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences", documento WO 98/42832 por Arnold et al., "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers", documento WO 99/29902 por Arnold et al., "Method for Creating Polynucleotide and Polypeptide Sequences", documento WO 98/41653 por Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library", documento WO 98/41622 por Borchert et al., "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling", y documento WO 98/42727 por Pati y Zarling, "Sequence Alterations using Homologous Recombination".

Ciertas solicitudes U.S. proporcionan detalles adicionales con respecto a diversos métodos que generan diversidad, incluyendo "SHUFFLING OF CODON ALTERED GENES" por Patten et al. presentado el 28 de septiembre de 1999, (U.S. Ser. No. 09/407.800); "EVOLUTION OF WHOLE CELLS AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION" por del Cardayre et al., presentado el 15 de julio de 1998 (U.S. Ser. No. 09/166.188), y 15 de julio de 1999 (U.S. Ser. No. 09/354.922); "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" por Cramer et al., presentado el 28 de septiembre de 1999 (U.S. Ser. No. 09/408.392), y "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" por Cramer et al., presentado el 18 de enero de 2000 (PCT/US00/01203); "USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING" por Welch et al., presentado el 28 de septiembre de 1999 (U.S. Ser. No. 09/408.393); "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" por Selifonov et al., presentado el 18 de enero de 2000, (PCT/US00/01202) y, por ejemplo "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" por Selifonov et al., presentado el 18 de julio de 2000 (U.S. Ser. No. 09/618.579); "METHODS OF POPULATING DATA STRUCTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS" por Selifonov y Stemmer, presentado el 18 de enero de 2000 (PCT/US00/01138); y "SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION" por Affholter, presentado el 6 de septiembre de 2000 (U.S. Ser. No. 09/656.549).

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

25 Mutagénesis de saturación, o GSSM

En un aspecto de la invención, la modificación génica no estocástica, un "proceso de evolución dirigida", se usa para generar fosfolipasas con propiedades nuevas o alteradas. Las variaciones de este método se han denominado "mutagénesis de sitio génico", "mutagénesis de saturación de sitio", "mutagénesis de saturación de sitio génico" o simplemente "GSSM". Se puede usar en combinación con otros procesos de mutagenización. Véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n^{os} 6.171.820; 6.238.884. En un aspecto, GSSM comprende proporcionar un polinucleótido molde y una pluralidad de oligonucleótidos, en el que cada oligonucleótido comprende una secuencia homóloga al polinucleótido molde, seleccionando de ese modo como diana una secuencia específica del polinucleótido molde, y una secuencia que es una variante del gen homólogo; generar polinucleótidos de progenie que comprenden variaciones de secuencia no estocásticas replicando el polinucleótido molde con los oligonucleótidos, generando de ese modo polinucleótidos que comprenden variaciones de secuencias génicas homólogas.

En un aspecto, los cebadores de los codones que contienen una secuencia degenerada N,N,G/T se usan para introducir mutaciones de punto en un polinucleótido, para generar un conjunto de polipéptidos progenie en los que un intervalo completo de sustituciones de un solo aminoácido se representa en cada posición de aminoácido, por ejemplo un residuo de aminoácido en un sitio activo enzimático o un sitio de unión a ligando seleccionado para ser modificado. Estos oligonucleótidos pueden comprender una primera secuencia homóloga contigua, una secuencia degenerada N,N,G/T, y, opcionalmente, una segunda secuencia homóloga. Los productos traduccionales de progenie aguas abajo procedentes del uso de tales oligonucleótidos incluyen todos los posibles cambios de aminoácidos en cada sitio de aminoácido a lo largo del polipéptido, debido a que la degeneración de la secuencia N,N,G/T incluye codones para los 20 aminoácidos. En un aspecto, uno de tales oligonucleótidos degenerados (compuesto de, por ejemplo, un casete degenerado N,N,G/T) se usa para someter a cada codón original en un molde polinucleotídico progenitor a un intervalo completo de sustituciones de codones. En otro aspecto, se usan al menos dos casetes degenerados – ya sea en el mismo oligonucleótido o no, para someter al menos dos codones originales en un molde polinucleotídico progenitor a un intervalo completo de sustituciones de codones. Por ejemplo, más de una secuencia N,N,G/T puede estar contenida en un oligonucleótido para introducir mutaciones de aminoácidos en más de un sitio. Esta pluralidad de secuencias N,N,G/T puede estar directamente contigua, o separada en una o más secuencias nucleotídicas adicionales. En otro aspecto, los oligonucleótidos aprovechables para introducir adiciones y supresiones se pueden usar solos o en combinación con los codones que contienen una secuencia N,N,G/T, para introducir cualquier combinación o permutación de adiciones, supresiones y/o sustituciones de aminoácidos.

En un aspecto, la mutagénesis simultánea de dos o más posiciones de aminoácidos contiguas se realiza usando un oligonucleótido que contiene tripletes N,N,G/T contiguos, es decir, una secuencia degenerada (N,N,G/T)_n. En otro aspecto, se usan casetes degenerados que tienen una degeneración menor que la secuencia N,N,G/T. Por ejemplo, puede ser deseable en algunos casos usar (por ejemplo, en un oligonucleótido) una secuencia triplete degenerada compuesta solamente de un N, en el que dicho N puede estar en la primera, segunda o tercera posición del triplete. Cualquier otra base, incluyendo cualesquiera combinaciones y permutaciones de las mismas, se puede usar en las dos posiciones restantes del triplete. Como alternativa, puede ser deseable en algunos casos usar (por ejemplo, en un oligo) una secuencia triplete N,N,N degenerada.

En un aspecto, el uso de tripletes degenerados (por ejemplo, tripletes N,N,G/T) permite la generación sistemática y fácil de un intervalo completo de aminoácidos naturales posibles (para un total de 20 aminoácidos) en todas y cada una de las posiciones de aminoácidos en un polipéptido (en aspectos alternativos, los métodos también incluyen la generación de menos de todas las sustituciones posibles por residuo de aminoácido, o codón, posición). Por ejemplo, para un polipéptido de 100 aminoácidos, se pueden generar 2000 especies diferentes (es decir, 20 aminoácidos posibles por posición X 100 posiciones de aminoácidos). Mediante el uso de un oligonucleótido o conjunto de oligonucleótidos que contienen un triplete N,N,G/T degenerado, 32 secuencias individuales pueden codificar los 20 aminoácidos naturales posibles. De este modo, en una vasija de reacción en la que una secuencia polinucleotídica progenitora se somete a mutagénesis de saturación usando al menos uno de tales oligonucleótidos, se generan 32 polinucleótidos progenie distintos que codifican 20 polipéptidos distintos. Por el contrario, el uso de un oligonucleótido no degenerado en mutagénesis dirigida al sitio conduce a sólo un producto polipeptídico progenie por vasija de reacción. Los oligonucleótidos no degenerados se pueden usar opcionalmente en combinación con cebadores degenerados descritos; por ejemplo, los oligonucleótidos no degenerados se pueden usar para generar mutaciones de punto específicas en un polinucleótido de trabajo. Esto proporciona un medio para generar mutaciones de punto silenciosas específicas, mutaciones de punto que conducen a cambios de aminoácidos correspondientes, y mutaciones de punto que provocan la generación de codones de parada y la expresión correspondiente de fragmentos polipeptídicos.

En un aspecto, cada vasija de reacción de mutagénesis de saturación contiene polinucleótidos que codifican al menos 20 moléculas polipeptídicas progenie (por ejemplo, fosfolipasa) de manera que los 20 aminoácidos naturales están representados en la una posición de aminoácido específica correspondiente a la posición de codón mutagenizada en el polinucleótido progenitor (otros aspectos usan menos de 20 combinaciones naturales). Los polipéptidos progenie degenerados de 32 veces generados a partir de cada vasija de reacción de mutagénesis de saturación se pueden someter a amplificación clonal (por ejemplo, clonados en un hospedante adecuado, por ejemplo hospedante de *E. coli*, usando, por ejemplo, un vector de expresión) y se pueden someter a cribado de expresión. Cuando un polipéptido progenie individual se identifica mediante cribado para presentar un cambio favorable en la propiedad (cuando se compara con el polipéptido progenitor, tal como actividad de fosfolipasa incrementada en condiciones alcalinas o ácidas), se puede secuenciar para identificar la sustitución de aminoácido correspondientemente favorable contenida en él.

En un aspecto, al mutagenizar todas y cada una de las posiciones de aminoácidos en un polipéptido progenitor usando mutagénesis de saturación como se describe aquí, se pueden identificar cambios de aminoácidos favorables en más de una posición de aminoácido. Se pueden generar una o más nuevas moléculas progenie que contienen una combinación de todas o partes de estas sustituciones de aminoácidos favorables. Si se identifican 2 cambios de aminoácidos favorables específicos en cada una de 3 posiciones de aminoácidos en un polipéptido, las permutaciones incluyen 3 posibilidades en cada posición (ningún cambio del aminoácido original, y cada uno de dos cambios favorables) y 3 posiciones. De este modo, hay $3 \times 3 \times 3$ ó 27 posibilidades totales, incluyendo 7 que se examinaron previamente – 6 mutaciones de un solo punto (es decir, 2 en cada una de tres posiciones) y ningún cambio en ninguna posición.

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

Reensamblaje de ligación sintética (SLR)

La invención proporciona un sistema de modificación génica no estocástico denominado “reensamblaje de ligación sintética”, o simplemente “SLR”, un “proceso de evolución dirigida”, para generar fosfolipasas con propiedades nuevas o alteradas. SLR es un método de ligar fragmentos oligonucleotídicos juntos de forma no estocástica. Este método difiere del barajado oligonucleotídico estocástico por cuanto los bloques de construcción de ácido nucleico no se barajan, concatenan o quimerizan aleatoriamente, sino más bien se ensamblan de forma no estocástica. Véase, por ejemplo, la Solicitud de Patente U.S. Serie nº (USSN) 09/332.835 titulada “Synthetic Ligation Reassembly in Directed Evolution” y presentada el 14 de junio de 1999 (“USSN 09/332.835”). En un aspecto, SLR comprende las siguientes etapas: (a) proporcionar un polinucleótido molde, en el que el polinucleótido molde comprende una secuencia que codifica un gen homólogo; (b) proporcionar una pluralidad de polinucleótidos de bloques constructores, en el que los polinucleótidos de bloques constructores se diseñan para el reensamblaje cruzado con el polinucleótido molde a una secuencia predeterminada, y un polinucleótido de bloque constructor comprende una secuencia que es una variante del gen homólogo y una secuencia homóloga al polinucleótido molde que flanquea la secuencia variante; (c) combinar un polinucleótido de bloque constructor con un polinucleótido molde de manera que el polinucleótido de bloque constructor se reensambla de forma cruzada con el polinucleótido molde para generar polinucleótidos que comprenden variaciones de secuencias génicas homólogas.

SLR no depende de la presencia de niveles elevados de homología entre los polinucleótidos a reordenar. De este modo, este método se puede usar para generar no estocásticamente bibliotecas (o conjuntos) de moléculas progenie que comprenden aproximadamente 10^{100} quimeras diferentes. SLR se puede usar para generar bibliotecas

compuestas de aproximadamente 10^{1000} quimeras progenie diferentes. De este modo, los aspectos de la presente invención incluyen métodos no estocásticos para producir un conjunto de moléculas de ácidos nucleicos quiméricas finalizadas que tienen un orden de ensamblaje global que se escoge mediante diseño. Este método incluye las etapas de generar mediante diseño una pluralidad de bloques de construcción de ácidos nucleicos específicos que tienen extremos ligables compatibles mutuamente utilizables, y de ensamblar estos bloques constructores de ácidos nucleicos, de manera que se logre un orden de ensamblaje global diseñado.

Los extremos ligables mutuamente compatibles de los bloques constructores de ácidos nucleicos a ensamblar se consideran "utilizables" para este tipo de ensamblaje ordenado si permiten que los bloques constructores se acoplen en órdenes predeterminados. De este modo, el orden de ensamblaje global en el que se pueden acoplar los bloques constructores de ácidos nucleicos se especifica mediante el diseño de los extremos ligables. Si se usa más de una etapa de ensamblaje, entonces el orden de ensamblaje global en el que se pueden acoplar los bloques constructores de ácidos nucleicos también se especifica mediante el orden secuencial de la etapa o etapas de ensamblaje. En un aspecto, los trozos constructores hibridados se tratan con una enzima, tal como una ligasa (por ejemplo, T4 ADN ligasa), para lograr un enlace covalente de los trozos constructores.

En un aspecto, el diseño de los bloques constructores oligonucleotídicos se obtiene analizando un conjunto de moldes de secuencias de ácidos nucleicos progenitoras que sirven como base para producir un conjunto progenie de polinucleótidos quiméricos finalizados. Estos moldes oligonucleotídicos progenitores sirven así como una fuente de información de secuencia que ayuda en el diseño de los bloques constructores de ácidos nucleicos que se van a mutagenizar, por ejemplo quimerizar o barajar.

En un aspecto de este método, las secuencias de una pluralidad de moldes de ácidos nucleicos progenitoras se alinean a fin de seleccionar uno o más puntos de demarcación. Los puntos de demarcación se pueden localizar en un área de homología, y comprenden uno o más nucleótidos. Estos puntos de demarcación son compartidos preferiblemente por al menos dos de los moldes progenitores. Los puntos de demarcación se pueden usar de ese modo para delinear los límites de los bloques constructores oligonucleotídicos a generar a fin de reordenar los polinucleótidos progenitores. Los puntos de demarcación identificados y seleccionados en las moléculas progenitoras sirven como puntos de quimerización potenciales en el ensamblaje de las moléculas progenie quiméricas finales. Un punto de demarcación puede ser un área de homología (compuesta de al menos una base nucleotídica homóloga) compartida por al menos dos secuencias polinucleotídicas progenitoras. Como alternativa, un punto de demarcación puede ser un área de homología que es compartida por al menos la mitad de las secuencias polinucleotídicas progenitoras, o puede ser un área de homología que es compartida por al menos dos tercios de las secuencias polinucleotídicas progenitoras. Incluso más preferiblemente, un punto de demarcación usable es un área de homología que es compartida por al menos tres cuartos de las secuencias polinucleotídicas progenitoras, o puede ser compartida por casi todas las secuencias polinucleotídicas progenitoras. En un aspecto, un punto de demarcación es un área de homología que es compartida por todas las secuencias polinucleotídicas progenitoras.

En un aspecto, un proceso de reensamblaje de ligación se lleva a cabo exhaustivamente a fin de generar una biblioteca exhaustiva de polinucleótidos quiméricos progenie. En otras palabras, todas las posibles combinaciones ordenadas de los bloques constructores de ácidos nucleicos se representan en el conjunto de moléculas de ácidos nucleicos quiméricas finalizadas. Al mismo tiempo, en otra realización, el orden de ensamblaje (es decir, el orden de ensamblaje de cada bloque constructor en la secuencia 5' a 3' de cada ácido nucleico quimérico finalizado) en cada combinación es por diseño (o no estocástico) como se describe anteriormente. Debido a la naturaleza no estocástica de esta invención, se reduce enormemente la posibilidad de productos secundarios indeseados.

En otro aspecto, el método de reensamblaje de ligación se lleva a cabo sistemáticamente. Por ejemplo, el método se lleva a cabo a fin de generar una biblioteca sistemáticamente compartimentalizada de moléculas progenie, con compartimientos que se pueden ligar sistemáticamente, por ejemplo uno a uno. En otras palabras, esta invención proporciona que, mediante el uso selectivo y juicioso de bloques constructores de ácidos nucleicos específicos, acoplado con el uso selectivo y juicioso de reacciones de ensamblaje secuencialmente por etapas, se puede lograr un diseño en el que se obtienen conjuntos específicos de productos progenie en cada una de las varias vasijas de reacción. Esto permite que se lleve a cabo un procedimiento de examen y cribado sistemático. De este modo, estos métodos permiten que se examine sistemáticamente en grupos más pequeños un número potencialmente muy grande de moléculas progenie. Debido a su capacidad para llevar a cabo quimerizaciones de una manera que es muy flexible aunque igualmente exhaustiva y sistemática, particularmente cuando hay un bajo nivel de homología entre las moléculas progenitoras, estos métodos proporcionan la generación de una biblioteca (o conjunto) compuesta de un gran número de moléculas progenie. Debido a la naturaleza no estocástica del reensamblaje de ligación de la actual invención, las moléculas progenie generadas comprenden preferiblemente una biblioteca de moléculas de ácidos nucleicos quiméricas finalizadas que tienen un orden de ensamblaje global que se escoge por diseño. La mutagénesis de saturación y los métodos de evolución dirigida optimizada también se pueden usar para generar diferentes especies moleculares progenie. Se aprecia que la invención proporciona libertad de elección y control con respecto a la selección de los puntos de demarcación, el tamaño y número de los bloques constructores de ácidos nucleicos, y el tamaño y diseño de los acoplamientos. Además, se aprecia que el requisito de homología intermolecular está muy relajado para la operabilidad de esta invención. De hecho, los puntos de demarcación se pueden escoger incluso en áreas de poca o ninguna homología intermolecular. Por ejemplo, debido al bamboleo de

los codones, es decir, la degeneración de los codones, se pueden introducir sustituciones nucleotídicas en los bloques constructores de ácidos nucleicos sin alterar el aminoácido codificado originalmente en el molde progenitor correspondiente. Como alternativa, un codón se puede alterar de manera que se altere la codificación de un aminoácido original. Esta invención proporciona que tales sustituciones se puedan introducir en el bloque constructor de ácido nucleico a fin de incrementar la incidencia de puntos de demarcación homólogos intramolecularmente, y de este modo permite que se logre un número creciente de acoplamientos entre los bloques constructores, lo que a su vez permite que se genere un mayor número de moléculas quiméricas proge-

En otro aspecto, la naturaleza sintética de la etapa en la que se generan los bloques constructores permite el diseño e introducción de nucleótidos (por ejemplo, uno o más nucleótidos, que pueden ser, por ejemplo, codones o intrones, o secuencias reguladoras) que más tarde se pueden eliminar en un proceso *in vitro* (por ejemplo mediante mutagénesis) con un proceso *in vivo* (por ejemplo utilizando la capacidad de ajuste génico de un organismo hospedante). Se aprecia que en muchos casos la introducción de estos nucleótidos también puede ser deseable por muchas otras razones, además del beneficio potencial de crear un punto de demarcación utilizable.

En un aspecto, un bloque constructor de ácido nucleico se usa para introducir un intrón. De este modo, los intrones funcionales se introducen en un gen fabricado por el hombre, fabricado según los métodos descritos aquí. El intrón o intrones introducidos artificialmente pueden ser funcionales en células hospedantes para el ajuste génico de la misma manera que los intrones de origen natural sirven funcionalmente en el ajuste génico.

Sistema de evolución dirigida optimizada

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

Un evento de cruzamiento es un punto en una secuencia quimérica en el que se produce un desplazamiento en la secuencia desde una variante parental a otra variante parental. Tal punto está normalmente en la unión donde se ligan juntos oligonucleótidos de dos progenitores para formar una única secuencia. Este método permite el cálculo de las concentraciones correctas de secuencias oligonucleotídicas de manera que la población quimérica final de secuencias está enriquecida para el número escogido de eventos de cruzamiento. Esto proporciona más control sobre la elección de variantes quiméricas que tienen un número predeterminado de eventos de cruzamiento.

Además, este método proporciona un medio conveniente para explorar una tremenda cantidad del espacio de variantes proteicas posibles en comparación con otros sistemas. Previamente, si se generaron, por ejemplo, 10^{13} moléculas quiméricas durante una reacción, sería extremadamente difícil ensayar tal número elevado de variantes quiméricas en busca de una actividad particular. Además, una porción significativa de la población proge- nia tendría un número muy elevado de eventos de cruzamiento, lo que daría como resultado proteínas que tendrían menos probabilidad de tener niveles incrementados de una actividad particular. Usando estos métodos, la población de moléculas quiméricas se puede enriquecer en aquellas variantes que tienen un número particular de eventos de cruzamiento. De este modo, aunque todavía se pueden generar 10^{13} moléculas quiméricas durante la reacción, cada una de las moléculas escogidas para el análisis posterior tendrá muy probablemente, por ejemplo, sólo tres eventos de cruzamiento. Debido a que la población proge- nia resultante puede estar sesgada para que tenga un número predeterminado de eventos de cruzamiento, los límites en la variedad funcional entre las moléculas quiméricas se reducen. Esto proporciona un número más manejable de variables cuando se calcula qué oligonucleótido de los polinucleótidos parentales originales puede ser responsable de afectar un rasgo particular.

Un método para crear una secuencia polinucleotídica proge- nia quimérica es crear oligonucleótidos que corresponden a fragmentos o porciones de cada secuencia parental. Cada oligonucleótido incluye preferiblemente una región única de solapamiento de manera que el mezclamiento de todos los oligonucleótidos da como resultado una nueva variante que tiene cada fragmento oligonucleotídico ensamblado en el orden correcto. En USSN 09/332.835 se puede encontrar información adicional. El número de oligonucleótidos generados para cada variante parental posee una relación con el número total de cruzamientos resultantes en la molécula quimérica que se crea finalmente. Por ejemplo, se pueden proporcionar tres variantes de secuencias nucleotídicas parentales para sufrir una reacción de ligación a fin de encontrar una variante quimérica que tiene, por ejemplo, mayor actividad a temperatura elevada. Como ejemplo, se puede generar un conjunto de 50 secuencias oligonucleotídicas que corresponden a cada una de las porciones de cada variante parental. En consecuencia, durante el proceso de reensamblaje de ligación, podría haber hasta 50 eventos de cruzamiento en cada una de las secuencias quiméricas. La probabilidad de que cada uno de los polinucleótidos quiméricos generados contendrá oligonucleótidos procedentes de cada variante parental en orden alterno es muy baja. Si cada fragmento oligonucleotídico está presente en la reacción de ligación en la misma cantidad molar, es probable que en algunas posiciones los oligonucleótidos procedentes del mismo polinucleótido parental se ligarán próximos entre sí, y de este modo no darán como resultado un evento de cruzamiento. Si la concentración de cada oligonucleótido procedente de cada progenitor se mantiene constante durante cualquier etapa de ligación en este ejemplo, hay una posibilidad de 1/3

(suponiendo 3 progenitores) de que un oligonucleótido procedente de la misma variante parental se ligue en la secuencia quimérica y no produzca cruzamiento.

En consecuencia, se puede determinar una función de densidad de probabilidad (PDF) para predecir la población de eventos de cruzamiento que es probable que se produzcan durante cada etapa en la reacción de ligación dado un número fijo de variantes parentales, un número de oligonucleótidos que corresponden a cada variante, y las concentraciones de cada variante durante cada etapa en la reacción de ligación. Más abajo se describen las estadísticas y matemáticas detrás de la determinación de la PDF. Utilizando estos métodos, se puede calcular tal función de densidad de probabilidad, y de este modo enriquecer la población progenie quimérica para un número predeterminado de eventos de cruzamiento que resultan de una reacción de ligación particular. Además, se puede predeterminar un número diana de eventos de cruzamiento, y el sistema se puede programar entonces para calcular las cantidades de partida de cada oligonucleótido parental durante cada etapa en la reacción de ligación para dar como resultado una función de densidad de probabilidad que se centra en el número predeterminado de eventos de cruzamiento. Un evento de cruzamiento es un punto en una secuencia quimérica en el que se produce un desplazamiento en la secuencia desde una variante parental a otra variante parental. Tal punto está normalmente en la unión donde se ligan juntos oligonucleótidos de dos progenitores para formar una única secuencia. El método permite el cálculo de las concentraciones correctas de secuencias oligonucleotídicas de manera que la población quimérica final de secuencias está enriquecida para el número escogido de eventos de cruzamiento. Esto proporciona más control sobre la elección de variantes quiméricas que tienen un número predeterminado de eventos de cruzamiento.

Además, estos métodos proporcionan un medio conveniente para explorar una tremenda cantidad del espacio de variantes proteicas posible en comparación con otros sistemas. Usando los métodos descritos aquí, la población de moléculas quiméricas se puede enriquecer para aquellas variantes que tienen un número particular de eventos de cruzamiento. De este modo, aunque todavía se pueden generar 10^{13} moléculas quiméricas durante una reacción, cada una de las moléculas escogidas para análisis posterior tiene muy probablemente, por ejemplo, sólo tres eventos de cruzamiento. Debido a que la población progenie resultante se puede sesgar para que tenga un número predeterminado de eventos de cruzamiento, los límites en la variedad funcional entre las moléculas quiméricas se reducen. Esto proporciona un número más manejable de variables cuando se calcula qué oligonucleótido de los polinucleótidos parentales originales puede ser responsable de afectar a un rasgo particular.

En un aspecto, el método crea una secuencia polinucleotídica progenie quimérica creando oligonucleótidos que corresponden a fragmentos o porciones de cada secuencia parental. Cada oligonucleótido incluye preferiblemente una región única de solapamiento de manera que el mezclamiento de los oligonucleótidos juntos da como resultado una nueva variante que tiene cada fragmento oligonucleotídico ensamblado en el orden correcto. Véase también USSN 09/332.835.

El número de oligonucleótidos generados para cada variante parental posee una relación con el número total de cruzamientos resultantes en la molécula quimérica que se crea finalmente. Por ejemplo, se pueden proporcionar tres variantes de secuencias nucleotídicas parentales para sufrir una reacción de ligación a fin de encontrar una variante quimérica que tiene, por ejemplo, mayor actividad a temperatura elevada. Como ejemplo, se puede generar un conjunto de 50 secuencias oligonucleotídicas que corresponden a cada una de las porciones de cada variante parental. En consecuencia, durante el proceso de reensamblaje de ligación podría haber hasta 50 eventos de cruzamiento en cada una de las secuencias quiméricas. La probabilidad de que cada uno de los polinucleótidos quiméricos generados contenga oligonucleótidos procedentes de cada variante parental en orden alterno es muy baja. Si cada fragmento oligonucleotídico está presente en la reacción de ligación en la misma cantidad molar, es probable que en algunas posiciones los oligonucleótidos procedentes del mismo polinucleótido parental se ligarán próximos entre sí, y de este modo no darán como resultado un evento de cruzamiento. Si la concentración de cada oligonucleótido procedente de cada progenitor se mantiene constante durante cualquier etapa de ligación en este ejemplo, hay una posibilidad de 1/3 (suponiendo 3 progenitores) de que un oligonucleótido procedente de la misma variante parental se ligue en la secuencia quimérica y no produzca cruzamiento.

En consecuencia, se puede determinar una función de densidad de probabilidad (PDF) para predecir la población de eventos de cruzamiento que es probable que ocurran durante cada etapa en la reacción de ligación dado un número fijo de variantes parentales, un número de oligonucleótidos correspondientes a cada variante, y las concentraciones de cada variante durante cada etapa en la reacción de ligación. Más abajo se describen las estadísticas y matemáticas que están detrás de la determinación de la PDF. Se puede calcular tal función de densidad de probabilidad, y de este modo enriquecer la población progenie quimérica para un número predeterminado de eventos de cruzamiento que resultan de una reacción de ligación particular. Además, se puede predeterminar un número diana de eventos de cruzamiento, y el sistema se puede programar entonces para calcular las cantidades de partida de cada oligonucleótido parental durante cada etapa en la reacción de ligación para dar como resultado una función de densidad de probabilidad que se centra en el número predeterminado de eventos de cruzamiento.

Determinación de los eventos de cruzamiento

Las realizaciones de la invención incluyen un sistema y software que recibe una función de densidad de probabilidad (PDF) de cruzamiento deseado, el número de genes progenitores a reensamblar, y el número de fragmentos en el

reensamblaje, como entradas. El resultado de este programa es una "PDF de fragmentos" que se puede usar para determinar una receta para producir genes reensamblados, y la PDF de cruzamiento estimada de esos genes. El procesamiento descrito aquí se lleva a cabo preferiblemente en MATLAB® (The Mathworks, Natick, Massachusetts), un lenguaje de programación y entorno de desarrollo para computación técnica.

5 Procesos iterativos

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

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

Barajado *in vivo*

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

En un aspecto, la invención proporciona un método para producir un polinucleótido híbrido a partir de al menos un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido. La invención se puede usar para producir un polinucleótido híbrido introduciendo al menos un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido que comparten al menos una región de homología de secuencia parcial en una célula hospedante adecuada. Las regiones de homología de secuencia parcial promueven procesos que dan como resultado la reorganización de secuencias productora de un polinucleótido híbrido. La expresión "polinucleótido híbrido", como se usa aquí, es cualquier secuencia nucleotídica que resulta del método de la presente invención y contiene secuencia de al menos dos secuencias polinucleotídicas originales. Tales polinucleótidos híbridos pueden resultar de eventos de recombinación intermoleculares que promueven la integración de las secuencias entre moléculas de ADN. Además, tales polinucleótidos híbridos pueden resultar de procesos de reclasificación reductiva intramolecular que utilizan secuencias repetidas para alterar una secuencia nucleotídica dentro de una molécula de ADN.

Producción de variantes de secuencias

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

Las variantes aisladas pueden ser de origen natural. La variante también se puede crear *in vitro*. Las variantes se pueden crear usando técnicas de ingeniería genética tales como mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis química al azar, procedimientos de supresión con exonucleasas III, y técnicas de clonación estándar. Como alternativa, tales variantes, fragmentos, análogos, o derivados se pueden crear usando procedimientos de síntesis o modificación química. Otros métodos para obtener variantes también son familiares para los expertos en la técnica. Estos incluyen procedimientos en los que las secuencias de ácidos nucleicos obtenidas de aislados naturales se modifican para generar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que tienen características que potencian su valor en aplicaciones industriales o de laboratorio. En tales procedimientos, se genera y se caracteriza un gran número de secuencias variantes que tienen una o más diferencias nucleotídicas con respecto a la secuencia obtenida del aislado natural. Estas diferencias nucleotídicas pueden dar como resultado cambios de aminoácidos con respecto a los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos de los aislados naturales.

Por ejemplo, se pueden crear variantes usando PCR propensa a errores. En PCR propensa a errores, la PCR se lleva a cabo en condiciones en las que la fidelidad de copiado de la ADN polimerasa es baja, de manera que se obtiene una tasa elevada de mutaciones de punto a lo largo de toda la longitud del producto de PCR. La PCR propensa a error se describe, por ejemplo, en Leung, D.W., et al., *Technique*, 1:11-15, 1989) y en Caldwell, R. C. y

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

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

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

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

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

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

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

En algunas realizaciones, se crean variantes usando mutagénesis de conjunto exponencial. La mutagénesis de conjunto exponencial es un proceso para generar bibliotecas combinatorias con un porcentaje elevado de mutantes únicos y funcionales, en el que pequeños grupos de restos se distribuyen al azar en paralelo para identificar, en cada posición alterada, aminoácidos que conducen a proteínas funcionales. La mutagénesis de conjunto exponencial se describe, por ejemplo, en Delegrave (1993) Biotechnology Res.11:1548-1552. Las mutagénesis al azar y dirigida al sitio se describen, por ejemplo, en Arnold (1993) Current Opinion in Biotechnology 4:450-455.

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

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

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

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

- En algunos aspectos, las variantes, fragmentos, derivados y análogos de los polipéptidos de la invención retienen la misma función o actividad biológica que los polipéptidos ejemplares, por ejemplo una actividad de fosfolipasa, como se describe aquí. En otros aspectos, la variante, fragmento, derivado, o análogo, incluye una proproteína, de manera que la variante, fragmento, derivado, o análogo se puede activar mediante escisión de la porción proproteínica para producir un polipéptido activo.

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

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

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

- Por ejemplo, los codones de un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa aislada de una célula bacteriana se modifican de manera que el ácido nucleico se exprese óptimamente en una célula bacteriana diferente de la bacteria a partir de la cual derivó la fosfolipasa, una levadura, un hongo, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula de mamífero. Los métodos para optimizar codones son bien conocidos en la técnica; véanse, por ejemplo, la patente U.S. nº 5.795.737; Baca (2000) Int. J. Parasitol. 30:113-118; Hale (1998) Protein Expr. Purif. 12:185-188; Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253. Véase también Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253, que describe la optimización de codones en sistemas de ratón; Outchkourov (2002) Protein Expr. Purif. 24:18-24, que describe la optimización de codones en levadura; Feng (2000) Biochemistry 39:15399-15409, que describe la

optimización de codones en *E. coli*; Humphreys (2000) Protein Expr. Purif. 20:252-264, que describe la optimización del uso de codones que afecta a la secreción en *E. coli*.

Animales no humanos transgénicos

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

25 “Animales genosuprimidos” también se puede usar para la práctica de los métodos de la invención. Por ejemplo, en un aspecto, los animales transgénicos o modificados de la invención comprenden un “animal genosuprimido”, por ejemplo un “ratón genosuprimido”, manipulado para no expresar o para ser incapaz de expresar una fosfolipasa.

Plantas y semillas transgénicas

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

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

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

En un aspecto, la primera etapa en la producción de una planta transgénica implica obtener un constructo de expresión para la expresión en una célula vegetal. Estas técnicas son bien conocidas en la técnica. Pueden incluir seleccionar y clonar un promotor, una secuencia codificante para facilitar la unión eficiente de ribosomas a ARNm, y seleccionar las secuencias terminadoras génicas apropiadas. Un promotor constitutivo ejemplar es CaMV35S, procedente del virus del mosaico de la coliflor, que generalmente da como resultado un grado elevado de expresión en plantas. Otros promotores son más específicos y responden a pistas en el entorno interno o externo de la planta.

Un promotor inducible por la luz ejemplar es el promotor del gen *cab*, que codifica la proteína de unión a clorofila *a/b* mayor.

En un aspecto, el ácido nucleico se modifica para lograr una mayor expresión en una célula vegetal. Por ejemplo, es probable que una secuencia de la invención tenga un mayor porcentaje de pares nucleotídicos A-T en comparación con el observado en una planta, algunos de los cuales prefieren pares nucleotídicos G-C. Por lo tanto, los nucleótidos A-T en la secuencia codificante se pueden sustituir por nucleótidos G-C sin cambiar significativamente la secuencia de aminoácidos para potenciar la producción del producto génico en células vegetales.

Se puede añadir un gen marcador seleccionable al constructo génico a fin de identificar células o tejidos vegetales que han integrado con éxito el transgén. Esto puede ser necesario debido a que el logro de la incorporación y expresión de genes en células vegetales es un evento raro, que se produce en sólo un pequeño porcentaje de los tejidos o células seleccionados como dianas. Los genes marcadores seleccionables codifican proteínas que proporcionan resistencia a agentes que son normalmente tóxicos para las plantas, tales como antibióticos o herbicidas. Solamente las células vegetales que tienen integrado el gen marcador seleccionable sobrevivirán cuando se hagan crecer en un medio que contiene el antibiótico o herbicida apropiado. En cuanto a otros genes insertados, los genes marcadores también requieren secuencias de promotor y de terminación para el funcionamiento apropiado.

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

En un aspecto, los protoplastos se pueden inmovilizar e inyectar con ácidos nucleicos, por ejemplo, un constructo de expresión. Aunque la regeneración vegetal a partir de protoplastos no es fácil con cereales, la regeneración vegetal es posible en legumbres usando embriogénesis somática a partir de callo derivado de protoplasto. Los tejidos organizados se pueden transformar con ADN desnudo usando técnica de pistola génica, en la que ADN se reviste en micropartículas de volframio, disparados 1/100 del tamaño de las células, que poseen el ADN profundamente en las células y orgánulos. El tejido transformado se induce entonces a regenerarse, habitualmente mediante embriogénesis somática. Esta técnica ha tenido éxito en varias especies de cereales, incluyendo maíz y arroz.

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

Como alternativa, los ácidos nucleicos, por ejemplo un constructo de expresión, se puede combinar con regiones de flanqueo de T-DNA adecuadas y se pueden introducir en un vector hospedante de *Agrobacterium tumefaciens* convencional. Las funciones de virulencia del hospedante de *Agrobacterium tumefaciens* dirigirán la inserción del constructo y marcador adyacente en el ADN de la célula vegetal cuando la célula se infecta mediante la bacteria. Las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, incluyendo el desarme y uso de vectores binarios, están bien descritas en la bibliografía científica. Véase, por ejemplo, Horsch (1984) *Science* 233:496-498; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803 (1983); Gene Transfer to Plants, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlín 1995). El ADN en una célula de *A. tumefaciens* está contenido en el cromosoma bacteriano así como en otra estructura conocida como plásmido Ti (inductor de tumores). El plásmido Ti contiene un tramo de ADN denominado T-DNA (~20 kb de longitud) que es transferido a la célula vegetal en el proceso de infección y una serie de genes *vir* (virulencia) que dirigen el proceso de infección. *A. tumefaciens* puede infectar solamente a una planta a través de heridas: cuando una raíz o tallo vegetal es herido, da ciertas señales químicas, a cuya respuesta los genes *vir* de *A. tumefaciens* son activados y dirigen una serie de eventos necesarios para la transferencia del T-DNA desde el plásmido Ti al cromosoma de la planta. El T-DNA entra entonces en la célula vegetal a través de la herida. Una suposición es que el T-DNA espera hasta que el ADN vegetal está siendo replicado o transcrito, y después se inserta él mismo en el ADN vegetal expuesto. A fin de usar *A. tumefaciens* como vector transgénico, se ha de eliminar la sección inductora de tumores de T-DNA, mientras que se retienen las regiones frontera de T-DNA y los genes *vir*. El transgén se inserta entonces entre las regiones frontera de T-DNA, donde es transferido a la célula vegetal y se integra en los cromosomas de la planta.

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

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

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

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

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

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

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

Polipéptidos y péptidos

La invención proporciona polipéptidos aislados, sintéticos o recombinantes que tienen una identidad de secuencia (por ejemplo, al menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o identidad completa de secuencia (100%)) con una secuencia ejemplar de la invención, por ejemplo, la SEQ ID NO: 6 que tiene uno o más cambios (por ejemplo, mutaciones) de secuencia como se establece en las Tablas 12 a 15, como se discute en el Ejemplo 3 debajo, o un fragmento enzimáticamente activo de los mismos.

Como se describe anteriormente, la identidad puede ser sobre la longitud completa del polipéptido, o, la identidad puede ser sobre una subsecuencia del mismo, por ejemplo, una región de al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o más residuos. Los polipéptidos de la invención también pueden ser más cortos que la longitud completa de los polipéptidos ejemplares. En la realización alternativa, la invención proporciona polipéptidos (péptidos, fragmentos) que varían en tamaño dentro del rango de entre aproximadamente 5 y la longitud completa de un polipéptido, por ejemplo, una enzima, tal como una fosfolipasa, por ejemplo, fosfolipasa; siendo los tamaños ejemplares de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400 o más residuos, por ejemplo, residuos contiguos de las fosfolipasas ejemplares. Los péptidos de la invención pueden ser útiles como, por ejemplo, sondas de etiquetado, antígenos, tolerágenos, motivos, sitios activos de fosfolipasa, dominios de unión, dominios reguladores, y similares.

En un aspecto, la invención proporciona polipéptidos que tienen secuencias según se establece en la SEQ ID NO: 6 que comprenden (y que tienen) uno o más cambios (por ejemplo, mutaciones) de residuos de aminoácidos según se establece en las Tablas 12 a 15, y subsecuencias de los mismos, por ejemplo, sus sitios activos ("dominios catalíticos") que tienen una actividad de fosfolipasa, por ejemplo, una actividad de fosfolipasa C (PLC), por ejemplo, una actividad de PI-PLC. En un aspecto, el polipéptido tiene una actividad de fosfolipasa pero carece de actividad de hidrólisis del aceite neutro (triglicérido). Por ejemplo, en un aspecto, el polipéptido tiene una actividad de fosfolipasa pero carece de cualquier actividad que afecte una fracción de aceite neutro (triglicérido). En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de desgomado que comprende el uso de un polipéptido de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa, pero no una actividad de lipasa.

"Aminoácido" o "secuencia de aminoácidos" como se utiliza aquí se refiere a un oligopéptido, péptido, polipéptido, o secuencia de proteínas, o a un fragmento, porción, o subunidad de cualquiera de estos, y a las moléculas sintéticas o existentes de manera natural.

Los términos "polipéptido" y "proteína" como se utilizan aquí, se refieren a los aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces de péptido o enlaces de péptido modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos modificados aparte de los 20 aminoácidos codificados por el gen. El término "polipéptido" también incluye péptidos y fragmentos de polipéptido, motivos y similares. El término también incluye polipéptidos glicosilados. Los péptidos y polipéptidos de la invención también incluyen todas las formas "miméticas" y "peptidomiméticas", como se describe con más detalle debajo.

Como se utiliza aquí, el término "aislado" significa que el material se elimina de su ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural si es existente de manera natural). Por ejemplo, no se aísla un polinucleótido o polipéptido existente de manera natural presente en un animal vivo, pero se aísla el mismo polinucleótido o polipéptido, separado de ciertos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural. Tales polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o tales polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición, y aún ser aislados en ese tal vector o composición que no es parte de su ambiente natural. Como se utiliza aquí, una composición o material aislado también puede ser una composición "purificada", es decir, no requiere pureza absoluta; más bien, se pretende como una definición relativa. Los ácidos nucleicos individuales obtenidos a partir de una biblioteca se pueden purificar de manera convencional para la homogeneidad electroforética. En aspectos alternativos, la invención proporciona ácidos nucleicos que han sido purificados a partir de ADN genómico o de otras secuencias en una biblioteca u otro ambiente por al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más órdenes de magnitud.

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

Los péptidos y polipéptidos de la invención se pueden también glucosilar. La glucosilación se puede añadir post-traduccionalmente ya sea de forma química o mediante mecanismos biosintéticos celulares, en el que estos últimos

incorporan el uso de motivos de glucosilación conocidos, que pueden ser nativos para la secuencia o se pueden añadir como un péptido o se pueden añadir en la secuencia codificante del ácido nucleico. La glucosilación se puede enlazar mediante O o enlazar mediante N.

5 Los péptidos y polipéptidos de la invención, como se definen anteriormente, incluyen todas las formas "miméticas" y "peptidomiméticas". Los términos "mimético" y "peptidomimético" se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales de los polipéptidos de la invención. El mimético puede estar compuesto completamente de análogos sintéticos no naturales de aminoácidos, o es una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservativas de aminoácidos naturales, en tanto que tales sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético. En cuanto a los polipéptidos de la invención que son variantes conservativas, la experimentación habitual determinará si un mimético está dentro del alcance de la invención, es decir, que su estructura y/o función no esté sustancialmente alterada. De este modo, en un aspecto, una composición mimética está dentro del alcance de la invención si tiene una actividad de fosfolipasa.

15 Las composiciones miméticas polipeptídicas de la invención pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales. En aspecto alternativo, las composiciones miméticas de la invención incluyen uno o todos los siguientes tres grupos estructurales: a) grupos de enlace de restos distintos de los enlaces de amida naturales ("enlace peptídico"); b) restos no naturales en lugar de restos de aminoácidos de origen natural; o c) restos que inducen un mimetismo estructural secundario, es decir, inducen o estabilizan una estructura secundaria, por ejemplo una vuelta beta, vuelta gamma, lámina beta, conformación de hélice alfa, y similar. Por ejemplo, un polipéptido de la invención se puede caracterizar como un mimético cuando todos o algunos de sus restos están unidos por medios químicos distintos de enlaces peptídicos naturales. Los restos peptidomiméticos individuales se pueden unir mediante enlaces peptídicos, otros enlaces químicos o medios de acoplamiento, tales como, por ejemplo, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos enlazantes que pueden ser una alternativa a los enlazamientos con enlaces de amida tradicionales ("enlace peptídico") incluyen, por ejemplo, cetometileno (por ejemplo, -C(=O)-CH₂- para -C(=O)-NH-), aminometileno (CH₂-NH), etileno, olefina (CH=CH), éter (CH₂-O), tioéter (CH₂-S), tetrazol (CN₄-), tiazol, retroamida, tioamida, o éster (véase, por ejemplo, Spatola (1983) en Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins, Vol. 7, p. 267-357, "Peptide Backbone Modifications," Marcell Dekker, NY).

Un polipéptido de la invención también se puede caracterizar como un mimético al contener todos o algunos restos no naturales en lugar de restos de aminoácidos de origen natural. Los restos no naturales están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes; más abajo se describen unas pocas composiciones no naturales ejemplares, útiles como miméticos de restos de aminoácidos naturales y directrices. Los miméticos de aminoácidos aromáticos se pueden generar sustituyendo, por ejemplo, D- o L-nafilalanina; D- o L-fenilglicina; D- o L-2-tienilalanina; D- o L-1, -2, 3-, o 4-pirenilalanina; D- o L-3-tienilalanina; D- o L-(2-piridinil)-alanina; D- o L-(3-piridinil)-alanina; D- o L-(2-pirazinil)-alanina; D- o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluoro-fenilalanina; D o L-p-bifenilfenilalanina; K- o L-p-metoxi-bifenilfenilalanina; D- o L-2-indol(alquil)alaninas; y, D- o L-alquilalaninas, en los que alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, isobutilo, sec-isotilo, iso-pentilo sustituidos o no sustituidos, o aminoácidos no ácidos. Los anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, por ejemplo, anillos aromáticos de tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo, y piridilo.

Los miméticos de aminoácidos ácidos se pueden generar mediante sustitución mediante, por ejemplo, aminoácidos no carboxilados a la vez que se mantiene una carga negativa; (fosfono)alanina; treonina sulfatada. Los grupos laterales carboxílicos (por ejemplo, aspartilo o glutamilo) también se pueden modificar selectivamente mediante reacción con carbodiimidias (R'-N-C-N-R') tales como, por ejemplo, 1-ciclohexil-3(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida o 1-etil-3(4-azonia-4,4-dimetolpentil) carbodiimida. Aspartilo o glutamilo también se puede convertir en restos asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio. Los miméticos de aminoácidos básicos se pueden generar mediante sustitución con, por ejemplo, (además de lisina y arginina) los aminoácidos ornitina, citrulina, o ácido (guanidino)-acético, o ácido (guanidino)alquil-acético, en los que alquilo es como se define anteriormente. Los derivados de nitrilo (por ejemplo, que contienen el resto CN- en lugar de COOH) se pueden sustituir por asparagina o glutamina. Los restos asparaginilo y glutaminilo se pueden desaminar a los restos aspartilo o glutamilo correspondientes. Los miméticos de restos de arginina se pueden generar haciendo reaccionar arginilo con, por ejemplo, uno o más reactivos convencionales, incluyendo, por ejemplo, fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, o ninhidrina, preferiblemente en condiciones alcalinas. Los miméticos de restos de tirosina se pueden generar haciendo reaccionar tirosilo con, por ejemplo, compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Se puede usar N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies O-acetilrosilicas y derivados 3-nitro, respectivamente. Los miméticos de restos de cisteína se pueden generar haciendo reaccionar restos de cisteinilo con, por ejemplo, alfa-haloacetatos tales como ácido 2-cloroacético o cloracetamida y aminas correspondientes, para dar derivados carboximetílicos o carboxiamidometílicos. Los miméticos de restos de cisteína también se pueden generar haciendo reaccionar restos cisteinílicos con, por ejemplo, bromo-trifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidozoi)propiónico; fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo; disulfuro de metil 2-piridilo; p-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4 nitrofenol; o, cloro-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol. Los

miméticos de lisina se pueden generar (y los restos aminoterminales se pueden alterar) haciendo reaccionar lisinilo con, por ejemplo, anhídrido succínico u otros anhídridos de ácidos carboxílicos. Los miméticos de restos de lisina y que contienen otros alfa-amino también se pueden generar mediante reacción con imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, fosfato de piridoxal, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitro-bencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4-pentanodiona y reacciones catalizadas con transamidasa con glioxilato. Los miméticos de metionina se pueden generar mediante reacción con, por ejemplo, sulfóxido de metionina. Los miméticos de prolina incluyen, por ejemplo, ácido pipercolico, ácido tiazolidincarboxílico, 3- o 4-hidroxi prolina, deshidroprolina, 3- o 4-metilprolina o 3,3-dimetilprolina. Los miméticos de restos de histidina se pueden generar haciendo reaccionar histidilo con, por ejemplo, procarbonato de dietilo o bromuro de para-bromofenacilo. Otros miméticos incluyen, por ejemplo, los generados mediante hidroxilación de prolina y lisina; la fosforilación de los grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo; la metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina e histidina; la acetilación de la amina N-terminal; la metilación de restos amídicos de cadena principal o la sustitución con aminoácidos N-metilicos, o la amidación de grupos carboxílicos C-terminales.

Un resto, por ejemplo, un aminoácido, de un polipéptido de la invención también se puede sustituir por un aminoácido (o resto peptidomimético) de la quiralidad opuesta. De este modo, cualquier aminoácido de origen natural en la configuración L (que también se puede denominar como R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) se puede sustituir por el aminoácido del mismo tipo estructural químico o un peptidomimético, pero de la quiralidad opuesta, denominado como el D-aminoácido, pero también se puede denominar como la forma R o S.

La invención también proporciona métodos para modificar los polipéptidos de la invención mediante procesos naturales, tales como procesamiento post-traduccional (por ejemplo, fosforilación, acilación, etc.), o mediante técnicas de modificación química, y los polipéptidos modificados resultantes. Las modificaciones se pueden producir en cualquier parte en el polipéptido, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos, y los términos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en los mismos grados o grados variables en varios sitios en un polipéptido dado. También, un polipéptido dado puede tener muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ribosilación con ADP, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de un fosfatidilinositol, ciclación de reticulación, formación de enlace de disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, y adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteína, tal como arginilación. Véase, por ejemplo, Creighton, T.E., *Proteins - Structure and Molecular Properties* 2^a Ed., W.H. Freeman and Company, Nueva York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, Nueva York, p. 1-12 (1983).

También se pueden usar métodos de síntesis química de péptidos en fase sólida para sintetizar el polipéptido o fragmentos de la invención. Tal método se conoce en la técnica desde principios de 1960 (Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963) (véase también Stewart, J. M. y Young, J. D., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2^a Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., p. 11-12), y se ha empleado recientemente en kits de síntesis y diseño de péptidos de laboratorio comercialmente disponibles (Cambridge Research Biochemicals). Tales kits de laboratorio comercialmente disponibles han utilizado generalmente las enseñanzas de H. M. Geysen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81:3998 (1984), y proporcionan la síntesis de péptidos sobre las puntas de una multitud de "varillas" o "alfileres", todos los cuales están conectados a una única placa. Cuando se utiliza tal sistema, se invierte y se inserta una placa de varillas o alfileres en una segunda placa de pocillos o depósitos correspondientes, que contiene disoluciones para la unión o anclaje de un aminoácido apropiado a las puntas de los alfileres o varillas. Repitiendo tal etapa del proceso, es decir, invirtiendo e insertando las puntas de las varillas y alfileres en disoluciones apropiadas, se construyen aminoácidos en péptidos deseados. Además, hay disponible un número de sistemas de síntesis de péptidos FMOC disponibles. Por ejemplo, el ensamblaje de un polipéptido o fragmento se puede llevar a cabo sobre un soporte sólido usando un sintetizador de péptidos automatizado de Applied Biosystems, Inc. Modelo 431ATM. Tal equipo proporciona un acceso fácil a los péptidos de la invención, ya sea mediante síntesis directa o mediante síntesis de una serie de fragmentos que se pueden acoplar usando otras técnicas conocidas.

Enzimas de fosfolipasa

La invención proporciona polipéptidos que tienen una actividad de fosfolipasa, ácidos nucleicos que los codifican, anticuerpos que se unen a ellos, péptidos que representan los sitios activos y los sitios antigénicos (epítopos) de la enzima, dominios reguladores y de unión, y métodos para obtenerlos y utilizarlos. En un aspecto, los polipéptidos de la invención tienen una actividad de fosfolipasa, o cualquier combinación de actividades de fosfolipasa, según se describe aquí (por ejemplo, una actividad de enzima fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), etc.). En aspectos alternativos, las fosfolipasas de la invención tienen actividades que se han modificado a partir de aquellas de las fosfolipasas ejemplares aquí descritas.

Como se utiliza aquí, el término "fosfolipasa" abarca enzimas que tienen cualquier actividad de fosfolipasa, por ejemplo, que escinden un enlace éster de glicerolfosfato (que cataliza la hidrólisis de un enlace éster de

glicerolfosfato), por ejemplo, en un aceite, tal como un aceite bruto o un aceite vegetal. La actividad de fosfolipasa de la invención puede generar una base fosforilada extraíble con agua y un diglicérido. La expresión "una actividad de fosfolipasa" incluye la hidrólisis de enlaces éster de glicerolfosfato a altas temperaturas, bajas temperaturas, pHs alcalinos y a pHs ácidos, escinden un éster de glicerolfosfato para generar una base fosforilada extraíble con agua y un diglicérido, cortan los enlaces de éster de glicerina y ácido fosfórico en los fosfolípidos, y otras actividades, tales como la habilidad para enlazar e hidrolizar un sustrato, tal como un aceite, por ejemplo un aceite bruto o un aceite vegetal, incluyendo el sustrato también fosfatidilcolinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas y esfingomielinas de planta y animal. La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de fosfolipasa C (PLC); una actividad de PI-PLC, una actividad de fosfolipasa A (PLA), tal como una actividad de fosfolipasa A1 o fosfolipasa A2; una actividad de fosfolipasa B (PLB), tal como una actividad de fosfolipasa B1 o fosfolipasa B2, incluyendo actividad de lisofosfolipasa (LPL) y/o actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA); una actividad de fosfolipasa D (PLD), tal como una actividad de fosfolipasa D1 o fosfolipasa D2; y/o una actividad de patatina o cualquier combinación de las mismas. La actividad de fosfolipasa puede comprender la hidrólisis de una glicoproteína, por ejemplo, como una glicoproteína encontrada en un tubérculo de patata o cualquier planta del género *Solanum*, por ejemplo, *Solanum tuberosum*. En realizaciones alternativas, la actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad enzimática de patatina, tal como una actividad de patatina esterasa (véase, por ejemplo, Jimenez (2002) Biotechnol. Prog. 18:635-640). En ciertas realizaciones, la actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de lípido acil-hidrolasa (LAH).

En realizaciones alternativas, las fosfolipasas PLC de la invención utilizan (por ejemplo, catalizan la hidrólisis de) una variedad de sustratos de fosfolípidos incluyendo fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), y/o ácido fosfatídico (PA), o una combinación de los mismos. Adicionalmente, estas enzimas pueden tener grados variables de actividad sobre las formas de lisofosfolípido de estos fosfolípidos. En varios aspectos, las enzimas PLC de la invención pueden mostrar una preferencia por la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina como sustratos.

En realizaciones alternativas, las fosfolipasas PLC de fosfatidilinositol de la invención utilizan una variedad de sustratos de fosfolípidos incluyendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico, o una combinación de los mismos. En realizaciones alternativas, estas enzimas pueden tener grados variables de actividad sobre las formas de lisofosfolípido de estos fosfolípidos. En varios aspectos, las enzimas PLC de fosfatidilinositol de la invención pueden mostrar una preferencia por el fosfatidilinositol como un sustrato.

En realizaciones alternativas, la actividad de fosfolipasa puede comprender ser específica para uno o más sustratos específicos, por ejemplo, una enzima de la invención puede tener una especificidad de acción por PE y PC; PE y PI; PE y PS; PS y PC; PS y PI; PI y PC; PS, PI y PC; PE, PI y PC; PC, PE y PS; PE, PS y PI; o, PE, PS, PI y PC, o cualquier combinación de los mismos.

En realizaciones alternativas, una fosfolipasa de la invención puede tener actividad multifuncional, por ejemplo, una combinación de una o más de las actividades de enzima aquí descritas. Por ejemplo, en un aspecto, un polipéptido de la invención es enzimáticamente activo, pero carece de una actividad de lipasa o carece de cualquier actividad enzimática que afecte una fracción de aceite neutro (triglicérido). Puede ser deseable utilizar tal polipéptido en un procedimiento particular, por ejemplo, en un procedimiento de desgomado donde es importante que la fracción de aceite neutro no sea dañada (disminuida, degradada, por ejemplo, hidrolizada). De esta manera, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de desgomado que comprende el uso de un polipéptido de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa, pero no una actividad de lipasa.

En realizaciones alternativas, los polipéptidos de la invención que tienen actividad enzimática de patatina pueden utilizar una variedad de sustratos de fosfolípidos incluyendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico, o una combinación de los mismos. Adicionalmente, estas enzimas pueden tener grados variables de actividad sobre las formas de lisofosfolípido de estos fosfolípidos. En varios aspectos, las patatinas de la invención se basan en una conservación de la similitud de secuencia de aminoácidos. En varios aspectos, estas enzimas despliegan un diverso conjunto de propiedades bioquímicas y pueden realizar reacciones características de las clases de enzima PLA1, PLA2, PLC, o PLD.

En realizaciones alternativas, los polipéptidos de la invención que tienen fosfolipasas PLD de la invención pueden utilizar una variedad de sustratos de fosfolípidos incluyendo fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico, o una combinación de los mismos. Adicionalmente, estas enzimas pueden tener grados variables de actividad sobre las formas de lisofosfolípido de estos fosfolípidos. En un aspecto, estas enzimas son útiles para llevar a cabo reacciones de transesterificación para producir fosfolípidos estructurados.

En realizaciones alternativas, los polipéptidos de la invención tienen una actividad que comprende la escisión de un enlace éster de glicerolfosfato, la habilidad para hidrolizar enlaces éster de fosfato, incluyendo actividad de patatina, lípido acil-hidrolasa (LAH), fosfolipasa A, B, C y/o fosfolipasa D, o cualquier combinación de las mismas.

Como se utiliza aquí, 1 unidad de enzima es la cantidad de una enzima necesaria para provocar una reacción para procesar 1 micromol de sustancia por minuto bajo condiciones especificadas.

En realizaciones alternativas, la invención proporciona polipéptidos con y sin secuencias señal, y las secuencias señal mismas (por ejemplo, péptidos de secuencias señal aislados). La invención incluye fragmentos o subsecuencias de enzimas de la invención, por ejemplo, péptidos o polipéptidos que comprenden o que consisten en dominios catalíticos ("sitios activos"), sitios de unión, dominios reguladores, epítomos, secuencias señal, dominios pre-pro, y similares. La invención también incluye fosfolipasas inmovilizadas, anticuerpos anti-fosfolipasa y fragmentos de los mismos. La invención incluye heterocomplejos, por ejemplo, proteínas de fusión, heterodímeros, etc., que comprenden las fosfolipasas de la invención. La determinación de los péptidos que representan los sitios antigénicos (epítomos) de la enzima, sitios activos, sitios de unión, secuencias señal, y similares, se puede realizar mediante protocolos de selección de rutina.

Estas enzimas y procedimientos de la invención se pueden utilizar para lograr un desgomado más completo de los aceites con alto contenido de fósforo, en particular, aceites de arroz, soja, maíz, cáñola, y girasol. Por ejemplo, en un aspecto, tras la escisión mediante PI-PLC, el fosfatidilinositol se convierte en diacilglicerol y fosfoinositol. El diacilglicerol se reparte a la fase acuosa (mejorando el rendimiento del aceite) y el fosfoinositol se reparte a la fase acuosa donde se elimina como un componente de la fase pesada durante la centrifugación. Una enzima de la invención, por ejemplo, una PI-PLC de la invención, se puede incorporar en cualquiera de un procedimiento de refinado del aceite químico o físico.

En aspectos alternativos, las enzimas de la invención tienen actividad de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), actividad de fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina, actividad de fosfatasa del ácido fosfático, actividad de fosfolipasa A y/o actividad de fosfolipasa relacionada con la patatina. Estas enzimas se pueden utilizar solas o en combinación entre sí o con otras enzimas de la invención, u otras enzimas. En un aspecto, la invención proporciona métodos en donde estas enzimas (incluyendo la fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PIPLC), fosfolipasa C específica para fosfatidilcolina, y/o fosfolipasa D (en conjunción con una fosfatasa), fosfatasa del ácido fosfático, fosfolipasa A, fosfolipasas relacionadas con la patatina de la invención) se utilizan solas o en combinación en el desgomado de aceites, por ejemplo, aceites vegetales, por ejemplo, aceites con alto contenido de fósforo, tales como aceites de soja, maíz, cáñola, salvado de arroz, y girasol. Estas enzimas y procedimientos de la invención se pueden utilizar para lograr un desgomado más completo de los aceites con alto contenido de fósforo, en particular, aceites de soja, maíz, cáñola, salvado de arroz, y girasol. Tras la escisión mediante PI-PLC, el fosfatidilinositol se convierte en diacilglicerol y fosfoinositol. El diacilglicerol se reparte a la fase acuosa (mejorando el rendimiento del aceite) y el fosfoinositol se reparte a la fase acuosa donde se elimina como un componente de la fase pesada durante la centrifugación. Una enzima de la invención, por ejemplo, una PI-PLC de la invención, se puede incorporar en cualquiera de un procedimiento de refinado del aceite químico o físico.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones, por ejemplo, disoluciones, que comprenden citrato de sodio a pH neutro para hidratar no hidratables. Por ejemplo, la invención proporciona disoluciones de citrato de sodio en un rango de pH de entre aproximadamente 4 a 9, o, 5 a 8, o, 6 a 7, que se pueden utilizar para hidratar fosfolípidos no hidratables (incluyendo enzimas de la invención) en aceites con alto contenido de fósforo. En un aspecto, la hidratación de los fosfolípidos no hidratables es mediante quelación del calcio y magnesio asociados con los fosfolípidos, permitiendo por consiguiente que las sales de fosfolípidos anteriormente insolubles se repartan más fácilmente en la fase acuosa. En un aspecto, una vez que los fosfolípidos se mueven a la interfaz agua/aceite o hacia la fase acuosa, una fosfolipasa de la invención (por ejemplo, una fosfolipasa específica para fosfolipasa de la invención), u otra fosfolipasa, convertirá el fosfolípido en diacilglicerol y un éster de fosfato. En un aspecto, el contenido de metales de calcio y magnesio se aminora tras las adición de ácido y agente cáustico (véase la descripción sobre los procedimientos cáusticos).

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

La presente invención explota las propiedades catalíticas únicas de las enzimas. Mientras que el uso de biocatalizadores (es decir, enzimas purificadas o brutas, células no vivas o vivas) en transformaciones químicas requiere normalmente la identificación de un biocatalizador particular que reacciona con un compuesto de partida específico. La presente invención usa biocatalizadores seleccionados, es decir, las enzimas de la invención, y las condiciones de reacción que son específicas para grupos funcionales que están presentes en muchos compuestos de partida. Cada biocatalizador es específico para un grupo funcional, o varios grupos funcionales relacionados, y puede reaccionar con muchos compuestos de partida que contienen este grupo funcional. Las reacciones

biocatalíticas producen una población de derivados a partir de un único compuesto de partida. Estos derivados se pueden someter a otra ronda de reacciones biocatalíticas para producir una segunda población de compuestos derivados. Se pueden producir miles de variaciones del compuesto original con cada iteración de la derivatización biocatalítica.

5 La invención proporciona métodos para identificar una única enzima PLC activa en una biblioteca, en el que la biblioteca se caracteriza por la serie de reacciones biocatalíticas usadas para producirla, una denominada "historia biosintética". Una realización comprende cribar la biblioteca en busca de actividades biológicas, y el trazado de la historia biosintética identifica la secuencia de reacciones específicas que produce el compuesto activo. La secuencia de reacciones se puede repetir, y se determina en la estructura del compuesto sintetizado. En esta realización, para
10 este modo de identificación, no se requieren tecnologías de inmovilización; los compuestos se pueden sintetizar y ensayar libremente en disolución usando virtualmente cualquier tipo de ensayo de cribado. En esta realización, el grado elevado de especificidad de las reacciones enzimáticas sobre grupos funcionales permite el "trazado" de reacciones enzimáticas específicas que constituyen la biblioteca producida biocatalíticamente.

15 La invención también proporciona métodos para descubrir nuevas fosfolipasas usando los ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos de la invención. En un aspecto, las bibliotecas de fagos lambda se criban para el descubrimiento de fosfolipasas a base de expresión. El uso de bibliotecas de fagos lambda en el cribado permite la detección de clones tóxicos, el acceso mejorado al sustrato, una menor necesidad de manipulación mediante ingeniería de un hospedante, obteniendo un bypass del potencial para cualquier desplazamiento resultante de la excisión másica de la biblioteca, y un crecimiento más rápido a densidades bajas de clones. El cribado de las
20 bibliotecas de fagos lambda puede obtenerse en fase líquida o en fase sólida. El cribado en fase líquida da una mayor flexibilidad en las condiciones del ensayo, una flexibilidad adicional de sustratos, una mayor sensibilidad para clones débiles, y una facilidad de automatización con respecto al cribado en fase sólida.

En realizaciones alternativas, las etapas de procedimiento se llevan a cabo usando automatización robótica, por ejemplo que permite la ejecución de muchos miles de reacciones biocatalíticas y ensayos de cribado por día, así como asegura un nivel elevado de exactitud y reproducibilidad (véase la discusión de ensayos, más abajo). Como
25 resultado, se puede producir una biblioteca de compuestos derivados en cuestión de semanas. Para enseñanzas posteriores sobre la modificación de moléculas, incluyendo moléculas pequeñas, véase el documento PCT/US94/09174.

Secuencias señal de fosfolipasas

30 La invención proporciona secuencias señal de fosfolipasas (por ejemplo, péptidos señal (SPs)), por ejemplo péptidos que comprenden secuencias señal y/o polipéptidos quiméricos, en el que los polipéptidos o quiméricos tienen una secuencia señal como se describe aquí. La invención proporciona ácidos nucleicos que codifican estas secuencias señal (SPs, por ejemplo un péptido que tiene una secuencia que comprende/que consiste en restos terminales amino de un polipéptido de la invención). En un aspecto, la invención proporciona una secuencia señal que
35 comprende un péptido que comprende/consiste en una secuencia como se expone en los restos 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24, 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 28, 1 a 30, 1 a 31, 1 a 32 o 1 a 33 de un polipéptido de la invención, por ejemplo un polipéptido que comprende una secuencia expuesta en SEQ ID NO:6 y que tiene una o más mutaciones como se exponen en las Tablas 12 a 15, o un fragmento enzimáticamente activo del mismo. Cualquiera de estos péptidos puede ser parte de una proteína quimérica, por ejemplo una proteína recombinante.
40 Un péptido de secuencia señal se puede emparejar con otra enzima de la invención (por ejemplo, una fosfolipasa de la invención a partir de la que no se derivó), o con otra fosfolipasa, o con cualquier polipéptido, como se discute adicionalmente, más abajo.

Las secuencias señal ejemplares incluyen los restos 1 a 37 de SEQ ID NO:4, y los restos 1 a 23 de SEQ ID NO:6.

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

Dominios prepro, dominios de unión y dominios catalíticos de fosfolipasas

50 Además de las secuencias señal (por ejemplo, péptidos señal (SPs)), como se discute anteriormente, la invención proporciona dominios prepro, dominios de unión (por ejemplo, dominio de unión a sustrato) y dominios catalíticos (CDs). Los dominios SP, dominios de unión, dominios prepro y/o CDs de la invención pueden ser péptidos aislados, sintéticos o recombinantes, o pueden ser parte de una proteína de fusión, por ejemplo como un dominio heterólogo en una proteína quimérica. La invención proporciona ácidos nucleicos que codifican estos dominios catalíticos (CDs)
55 (por ejemplo, "sitios activos"), dominios prepro, dominios de unión y secuencias señal (SPs, por ejemplo un péptido que tiene una secuencia que comprende/consiste en restos amino terminales de un polipéptido de la invención).

Las secuencias señal (SPs) de fosfolipasas, dominios de unión, dominios catalíticos (CDs) y/o secuencias prepro de la descripción pueden ser péptidos aislados, o secuencias unidas a otra fosfolipasa o a un polipéptido que no es

fosfolipasa, por ejemplo como una proteína de fusión (quimérica). En un aspecto, los polipéptidos que comprenden secuencias señal SPs de fosfolipasas y/o prepro de la invención comprenden secuencias heterólogas a las fosfolipasas de la invención (por ejemplo, una proteína de fusión que comprende una SP y/o prepro de la invención y secuencias de otra fosfolipasa o una proteína que no es fosfolipasa). En un aspecto, la invención también proporciona fosfolipasas de la invención con CDs, SPs y/o secuencias prepro heterólogas, por ejemplo secuencias con una secuencia señal de levadura. Una fosfolipasa de la invención puede comprender una CD, SP y/o prepro heteróloga en un vector, por ejemplo un vector de la serie pPIC (Invitrogen, Carlsbad, CA).

En un aspecto, los SPs, los CDs, y/o las secuencias prepro de la invención se identifican tras la identificación de los polipéptidos que exhiben actividad de fosfolipasa novedosos. Las rutas mediante las cuales las proteínas se ordenan y transportan a su posición celular correcta a menudo se refieren como rutas que tienen como objetivo la proteína. Uno de los elementos más importantes en todos estos sistemas de direccionamiento al objetivo es una secuencia corta de aminoácidos en el amino terminal de un polipéptido recién sintetizado denominada la secuencia señal. Esta secuencia señal dirige una proteína a su posición apropiada en la célula y se elimina durante el transporte o cuando la proteína alcanza su destino final. La mayoría de las proteínas lisosómicas, de membrana, o segregadas tienen una secuencia señal amino-terminal que las marca para el desplazamiento hacia el lumen del retículo endoplásmico. Las secuencias señal pueden variar en longitud desde 13 hasta 45 o más residuos de aminoácidos. Varios métodos de reconocimiento de secuencias señal son conocidos para aquellos de habilidad en la técnica. Por ejemplo, en un aspecto, los péptidos señal de hidrolasa novedosos se identifican mediante un método referido como SignalP. SignalP utiliza una red neural combinada que reconoce tanto los péptidos señal como sus sitios de escisión. (Nielsen, et al., "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites". Protein Engineering, vol. 10, no. 1, p. 1-6 (1997).

En algunos aspectos, una fosfolipasa de la invención puede no tener SPs y/o secuencias prepro, y/o dominios catalíticos (CDs). En un aspecto, la invención proporciona fosfolipasas que carecen de todo o parte de un SP, un CD y/o un dominio prepro. En un aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una secuencia señal (SP), un CD y/o prepro de una fosfolipasa enlazada de manera operativa a una secuencia de ácidos nucleicos de una fosfolipasa diferente u, opcionalmente, puede ser deseable una secuencia señal (SPs), un CD y/o dominio prepro de una proteína diferente a la fosfolipasa.

La invención también proporciona polipéptidos aislados, sintéticos o recombinantes que comprenden secuencias señal (SPs), dominios prepro y/o dominios catalíticos (CDs) de la invención y secuencias heterólogas. Las secuencias heterólogas son secuencias no naturalmente asociadas (por ejemplo, a una fosfolipasa) con un SP, dominio prepro y/o CD. La secuencia a la cual el SP, el dominio prepro y/o el CD no están naturalmente asociados puede estar en el extremo carboxi terminal, extremo amino terminal del SP, del dominio prepro y/o del CD, y/o en ambos extremos del SP y/o el CD. En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido aislado, sintético o recombinante que comprende (o que consiste en) un polipéptido que comprende una secuencia señal (SP), dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) de la invención con la condición de que no esté asociado con alguna secuencia a la cual está naturalmente asociado (por ejemplo, la secuencia de fosfolipasa). De modo semejante en un aspecto, la invención proporciona ácidos nucleicos aislados, sintéticos o recombinantes que codifican estos polipéptidos. De esta manera, en un aspecto, el ácido nucleico aislado, sintético o recombinante de la invención comprende la secuencia de codificación para una secuencia señal (SP), dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) de la invención y una secuencia heteróloga (es decir, una secuencia no naturalmente asociada con la secuencia señal (SP), dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) de la invención). La secuencia heteróloga puede estar en el extremo 3' terminal, en el extremo 5' terminal, y/o en ambos extremos del SP, dominio prepro y/o secuencia de codificación del CD.

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

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

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

La invención proporciona la fusión de subsecuencias N-terminales o C-terminales de las enzimas de la invención (por ejemplo, secuencias señal, secuencias prepro) con otros polipéptidos, proteínas activas o fragmentos de proteína. La producción de una enzima de la invención (por ejemplo, una enzima fosfolipasa C) también se puede realizar expresando la enzima como una proteína de fusión inactiva que más tarde se activa por un evento de escisión proteolítica (utilizando ya sea una actividad de proteasa endógena o exógena, por ejemplo tripsina) que da como resultado la separación de la pareja de la proteína de fusión y la enzima madura, por ejemplo, la enzima fosfolipasa C. En un aspecto, la proteína de fusión de la invención se expresa a partir de un constructo de nucleótidos híbrido que codifica un solo marco de lectura abierto que contiene los siguientes elementos: la secuencia nucleotídica para la proteína de fusión, una secuencia conectora (definida como una secuencia nucleotídica que codifica una secuencia de aminoácidos flexible que une dos dominios de proteína menos flexibles), el sitio de reconocimiento de la escisión de proteasa, y la secuencia de la enzima madura (por ejemplo, cualquier enzima de la invención, por ejemplo, una fosfolipasa). En aspectos alternativos, la proteína de fusión puede comprender una secuencia de pectato liasa, una secuencia de xilanasas, una secuencia de fosfatasa del ácido fosfatídico, u otra secuencia, por ejemplo, una secuencia que se ha mostrado previamente que se sobreexpresa en un sistema hospedante de interés.

Se puede usar cualquier sistema hospedante (véase discusión, anterior), por ejemplo cualquier bacteria, por ejemplo una bacteria grampositiva, tal como *Bacillus*, o una bacteria gramnegativa, tal como *E. coli*, o cualquier levadura, por ejemplo *Pichia pastoris*. La ordenación de las secuencias nucleotídicas en la construcción nucleotídica quimérica se puede determinar basándose en los niveles de expresión proteica logrados con cada constructo de fusión. Procediendo desde el extremo 5' del constructo nucleotídico hasta el extremo 3' del constructo, en un aspecto, las secuencias nucleotídicas se ensamblan como sigue: secuencia señal/proteína de fusión/secuencia enlazadora/sitio de reconocimiento de escisión de proteasa/enzima madura (por ejemplo, cualquier enzima de la invención, por ejemplo una fosfolipasa) o secuencia señal/secuencia pro/enzima madura/secuencia enlazadora/proteína de fusión. La expresión de la enzima (por ejemplo, cualquier enzima de la invención, por ejemplo una fosfolipasa) como una proteína de fusión inactiva puede mejorar la expresión global de la secuencia de la enzima, puede reducir cualquier toxicidad potencial asociada con la sobreproducción de la enzima activa, y/o puede incrementar el período de duración de la enzima antes del uso debido a que la enzima sería inactiva hasta que la proteína de fusión, por ejemplo pectato liasa, se separe de la enzima, por ejemplo proteína fosfolipasa.

En varios aspectos, la invención proporciona formulaciones específicas para la activación de la fosfolipasa de la invención expresada como una proteína de fusión. En un aspecto, la activación de la actividad de fosfolipasa inicialmente expresada como una proteína de fusión inactiva se realiza utilizando una actividad proteolítica o potencialmente una actividad proteolítica en combinación con una peptidasa amino-terminal o carboxilo-terminal. Este evento de activación se puede realizar de diversos modos y en una variedad de puntos en el procedimiento de fabricación/almacenamiento antes de la aplicación en el desgomado de aceites. Los procedimientos ejemplares de la invención incluyen: escisión mediante una actividad endógena expresada por el hospedante de fabricación tras la secreción del constructo de fusión en el medio de fermentación; escisión mediante una actividad de proteasa endógena que se activa o entra en contacto con el constructo de fusión intracelularmente expresado tras la ruptura de las células hospedantes; paso del constructo de fusión bruto o purificado sobre una columna de actividad de proteasa inmovilizada para lograr la escisión y activación de la enzima (por ejemplo, la fosfolipasa de la invención, por ejemplo, una fosfolipasa C) antes de la formulación de la enzima; tratamiento del constructo de fusión bruto o purificado con una fuente soluble de actividad proteolítica; activación de una fosfolipasa (por ejemplo, una fosfolipasa de la invención, por ejemplo, una fosfolipasa C) en la refinería del aceite utilizando ya sea una fuente soluble o insoluble de actividad proteolítica inmediatamente antes del uso en el procedimiento; y/o, activación de la actividad de fosfolipasa (por ejemplo, una fosfolipasa de la invención, por ejemplo, una fosfolipasa C) circulando continuamente la formulación del constructo de fusión a través de una columna de actividad de proteasa inmovilizada a temperatura reducida (por ejemplo, cualquiera entre aproximadamente 4°C y 20°C). Este evento de activación se puede realizar antes del suministro al sitio de uso o puede ocurrir en el sitio en la refinería del aceite.

Glucosilación

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

conocidos, que pueden ser nativos a la secuencia o se pueden añadir como un péptido o se pueden añadir en la secuencia codificante del ácido nucleico.

Ensayos de actividad de fosfolipasa

- 5 La invención proporciona polipéptidos aislados, sintéticos o recombinantes (por ejemplo, enzimas, anticuerpos) que tienen una actividad de fosfolipasa, o cualquier combinación de actividades de fosfolipasa, y ácidos nucleicos que los codifican. Para determinar si un polipéptido tiene una actividad de fosfolipasa y está dentro del alcance de la invención, se puede usar cualquiera de los muchos ensayos de actividad de fosfolipasa conocidos en la técnica. Los protocolos habituales para determinar las actividades de fosfolipasa A, B, D y C, de patatina y de acil hidrolasa de lípido, o actividad de lipasa, son bien conocidos en la técnica.
- 10 Los ensayos de actividad ejemplares incluyen ensayos de turbidez, ensayos de metilumbeliferil fosfocolina (fluorescente), ensayos de lipasa con Amplex Red (fluorescente), ensayos de cromatografía de capa fina (TLC), ensayos citolíticos y ensayos con p-nitro-fenilfosforilcolina. Usando estos ensayos, los polipéptidos se pueden cribar rápidamente en busca de la actividad de fosfolipasa.
- 15 La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de acil hidrolasa de lípido (LAH). Véase, por ejemplo, Jimenez (2001) *Lipids* 36:1169-1174, que describe un ensayo micelar mixto a base de octaetilenglicol monododecil éter para determinar la actividad de acil hidrolasa de lípidos de una patatina. Pinsirom (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48:155-160, describe una actividad de patatina de acil hidrolasa de lípidos (LAH) ejemplar.
- 20 Los ensayos de turbidez para determinar la actividad de fosfolipasa se describen por ejemplo en Kauffmann (2001) "Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design", *Protein Engineering* 14:919-928; Ibrahim (1995) "Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*", *Infect. Immun.* 63:1993-1998.
- 25 Los ensayos de metilumbeliferil fosfocolina (fluorescente) para determinar la actividad de fosfolipasa se describen, por ejemplo, en Goode (1997) "Evidence for cell surface and internal phospholipase activity in ascidian eggs", *Develop. Growth Differ.* 39:655-660; Diaz (1999) "Direct fluorescence-based lipase activity assay", *BioTechniques* 27:696-700.
- 30 Los ensayos de fosfolipasa con Amplex Red (fluorescente), para determinar la actividad de fosfolipasa, están disponibles como kits, por ejemplo la detección de fosfolipasa específica de fosfatidilcolina usando un kit de ensayo de fosfolipasa específico de Amplex Red fosfatidilcolina de Molecular Probes Inc. (Eugene, OR), según las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se mide en un lector de microplacas de fluorescencia usando excitación a 560 ± 10 nm y detección de la fluorescencia a 590 ± 10 nm. El ensayo es sensible a concentraciones muy bajas de enzima.
- 35 Los ensayos de cromatografía de capa fina (TLC) para determinar la actividad de fosfolipasa se describen, por ejemplo, en Reynolds (1991) *Methods in Enzymol.* 197:3-13; Taguchi (1975) "Phospholipase from *Clostridium novyi* type A.I.", *Biochim. Biophys. Acta* 409:75-85. La cromatografía de capa fina (TLC) es una técnica ampliamente usada para la detección de actividad de fosfolipasa. Se han usado diversas modificaciones de este método para extraer los fosfolípidos de las mezclas de ensayo acuosas. En algunos ensayos de PLC, la hidrólisis se detiene mediante adición de cloroformo/metanol (2:1) a la mezcla de reacción. El material de partida sin reaccionar y el diacilglicerol se extraen en la fase orgánica y se pueden fraccionar mediante TLC, mientras que el producto del grupo de cabeza permanece en la fase acuosa. Para una medida más precisa de la digestión fosfolipídica, se pueden usar sustratos radiomarcados (véase, por ejemplo, Reynolds (1991) *Methods in Enzymol.* 197:3-13). Las relaciones de productos y reaccionantes se pueden usar para calcular el número real de moles de sustrato hidrolizado por unidad de tiempo. Si todos los componentes se extraen por igual, cualesquiera pérdidas en esta acción afectarán por igual a todos los componentes. La separación de los productos de la digestión fosfolipídica se puede lograr mediante TLC con gel de sílice, usándose cloroformo/metanol/agua (65:25:4) como un sistema disolvente (véase, por ejemplo, Taguchi (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 409:75-85).
- 40 Los ensayos con p-nitrofenilfosforilcolina para determinar la actividad de fosfolipasa se describen, por ejemplo, en Korbsrisate (1999) "Cloning and characterization of a nonhemolytic phospholipase gene from *Burkholderia pseudomallei*", *J. Clin. Microbiol.* 37:3742-3745; Berka (1981) "Studies of phospholipase (heat labile hemolysin) in *Pseudomonas aeruginosa*", *Infect. Immun.* 34:1071-1074. Este ensayo se basa en la hidrólisis enzimática del análogo sustrato p-nitrofenilfosforilcolina para liberar un compuesto cromógeno amarillo, p-nitrofenol, detectable a 405 nm. Este sustrato es conveniente para un cribado de producción elevada.
- 50 Un ensayo citolítico puede detectar fosfolipasas con actividad citolítica basándose en la lisis de eritrocitos. Las fosfolipasas tóxicas pueden interactuar con membranas de células eucariotas e hidrolizar fosfatidilcolina y efigomielina, conduciendo a la lisis celular. Véase, por ejemplo, Titball (1993) *Microbiol. Rev.* 57:347-366.
- 55 Fosfolipasas híbridas (quiméricas) y bibliotecas peptídicas

En un aspecto, la invención proporciona fosfolipasas híbridas y proteínas de fusión, incluyendo bibliotecas peptídicas, que comprenden secuencias de la invención. Las bibliotecas peptídicas de la invención se pueden usar para aislar moduladores peptídicos (por ejemplo, activadores o inhibidores) de dianas, tales como sustratos de fosfolipasa, receptores, enzimas. Las bibliotecas peptídicas de la invención se pueden usar para identificar parejas de unión formales de dianas, tales como ligandos, por ejemplo citocinas, hormonas y similares. En un aspecto, la invención proporciona proteínas quiméricas que comprenden una secuencia señal (SP) y/o dominio catalítico (CD) de la invención y una secuencia heteróloga (véase anteriormente).

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

En un aspecto, los métodos de la invención producen nuevos polipéptidos híbridos utilizando procesos celulares que integran la secuencia de un primer polinucleótido tal como polinucleótidos híbridos resultantes codifican polipéptidos que demuestran actividades derivadas de los primeros polipéptidos biológicamente activos. Por ejemplo, los primeros polinucleótidos pueden ser una secuencia de ácido nucleico ejemplar que codifica fosfolipasa ejemplar de la invención. El primer ácido nucleico puede codificar una enzima de un organismo que funciona efectivamente en una condición medioambiental particular, por ejemplo salinidad elevada. Se puede "integrar" con una enzima codificada por un segundo polinucleótido de un organismo diferente que funciona efectivamente en una condición medioambiental diferente, tal como temperaturas extremadamente elevadas. Por ejemplo, cuando los dos ácidos nucleicos pueden producir una molécula híbrida mediante por ejemplo recombinación y/o reclasificación reductiva. Un polinucleótido híbrido que contiene secuencias de los polinucleótidos originales primero y segundo puede codificar una enzima que muestra características de ambas enzimas codificadas por los polinucleótidos originales. De este modo, la enzima codificada por el polinucleótido híbrido puede funcionar efectivamente en condiciones medioambientales compartidas por cada una de las enzimas codificadas por los polinucleótidos primero y segundo, por ejemplo salinidad elevada y temperaturas extremas.

Como alternativa, un polipéptido híbrido que resulta de este método de la invención puede mostrar actividad enzimática especializada no presentada en las enzimas originales. Por ejemplo, tras la recombinación y/o reclasificación reductiva de polinucleótidos que codifican actividades de fosfolipasa, el polinucleótido híbrido resultante codificado por un polinucleótido híbrido se puede cribar en busca de actividades especializadas obtenidas de cada una de las enzimas originales, es decir, el tipo de enlace sobre el que actúa la fosfolipasa, y la temperatura a la que funciona la fosfolipasa. De este modo, por ejemplo, la fosfolipasa se puede cribar para averiguar aquellas funcionalidades químicas que distinguen la fosfolipasa híbrida de las fosfolipasas originales, tales como: (a) amida (enlaces peptídicos), es decir, fosfolipasas; (b) enlaces de éster, es decir, fosfolipasas y lipasas; (c) acetales, es decir, glucosidasas, y, por ejemplo, la temperatura, pH o concentración de sal a la que funciona el polipéptido híbrido.

Las fuentes de los polinucleótidos a "integrar" con ácidos nucleicos de la invención se pueden aislar de organismos individuales ("aislados"), colecciones de organismos que se han hecho crecer en medios definidos ("cultivos de enriquecimiento"), u organismos no cultivados ("muestras medioambientales"). El uso de un enfoque independiente de cultivos para derivar polinucleótidos que codifican nuevas bioactividades a partir de muestras medioambientales es lo más preferible puesto que permite el acceso a fuentes inexploradas de biodiversidad. Las "bibliotecas medioambientales" se generan a partir de muestras medioambientales, y representan los genomas colectivos de organismos de origen natural logrados en vectores de clonación que se pueden propagar en hospedantes procariontes adecuados. Debido a que el ADN clonado se extrae inicialmente de forma directa a partir de muestras medioambientales, las bibliotecas no están limitadas a la pequeña fracción de procariontes que se puede hacer crecer en cultivo puro. Adicionalmente, una normalización del ADN medioambiental presente en estas muestras podría permitir una representación más igualitaria del ADN procedente de todas las especies presentes en la muestra original. Esto puede incrementar drásticamente la eficiencia de hallar genes interesantes a partir de constituyentes minoritarios de la muestra que pueden estar subrepresentados por varios órdenes de magnitud en comparación con la especie dominante.

Por ejemplo, las bibliotecas génicas generadas a partir de uno o más microorganismos sin cultivar se criban en busca de una actividad de interés. Las rutas potenciales que codifican moléculas bioactivas de interés se capturan primero en células procariontes en forma de bibliotecas de expresión génica. Los polinucleótidos que codifican actividades de interés se aíslan de tales bibliotecas y se introducen en una célula hospedante. La célula hospedante se hace crecer en condiciones que promueven la recombinación y/o reclasificación reductiva, creando biomoléculas potencialmente activas con nuevas actividades o actividades mejoradas.

Los microorganismos a partir de los cuales se pueden preparar polinucleótidos híbridos incluyen microorganismos procariontes, tales como *Eubacteria* y *Archaeobacteria*, y microorganismos eucariotes inferiores tales como hongos, algunas algas y protozoos. Los polinucleótidos se pueden aislar de muestras medioambientales. El ácido nucleico se

puede recuperar sin cultivar un microorganismo, o se puede recuperar de uno o más organismos cultivados. En un aspecto, tales microorganismos pueden ser extremófilos, tales como hipertermófilos, psicrófilos, psicrótrofos, halófilos, barófilos y acidófilos. En un aspecto, los polinucleótidos que codifican enzimas de fosfolipasa aislados de microorganismos extremófilos se usan para obtener enzimas híbridas. Tales enzimas pueden funcionar a temperaturas por encima de 100°C, por ejemplo, en manantiales calientes terrestres y respiraderos térmicos de las profundidades marinas, a temperaturas por debajo de 0°C en, por ejemplo, aguas árticas, en el entorno salino saturado de, por ejemplo, el Mar Muerto, a valores de pH aproximadamente 0 en, por ejemplo, depósitos de carbón y manantiales geotérmicos ricos en azufre, o a valores de pH mayores que 11 en, por ejemplo, lodos de aguas residuales. Por ejemplo, las fosfolipasas clonadas y expresadas a partir de organismos extremófilos pueden mostrar una actividad elevada en un amplio intervalo de temperaturas y pHs.

Los polinucleótidos seleccionados y aislados como se describen aquí, incluyendo al menos un ácido nucleico de la invención, se introducen en una célula hospedante adecuada. Una célula hospedante adecuada es cualquier célula que es capaz de promover la recombinación y/o reclasificación reductiva. Los polinucleótidos seleccionados pueden estar en un vector que incluye secuencias de control apropiadas. La célula hospedante puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o preferiblemente la célula hospedante puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción del constructo en la célula hospedante se puede efectuar mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, o electroporación (Davis et al., 1986).

Los hospedantes apropiados ejemplares pueden ser cualquiera de las células hospedantes familiares para aquellos expertos en la técnica, incluyendo células procariotas, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células de mamífero, células de insecto, o células vegetales. Las células bacterianas ejemplares incluyen cualquier especie dentro del género *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus*, incluyendo, por ejemplo, *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Las células fúngicas ejemplares incluyen cualquier especie de *Aspergillus*. Las células de levadura ejemplares incluyen cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Schwanniomyces*, incluyendo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de insecto ejemplares incluyen cualquier especie de *Spodoptera* o *Drosophila*, incluyendo *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Las células animales ejemplares incluyen CHO, COS o melanoma Bowes o cualquier línea celular humana o de ratón. La selección de un hospedante apropiado está dentro de las habilidades de aquellos expertos en la técnica. Se estima que la selección de un hospedante apropiado para recombinación y/o redistribución reductiva o sólo para la expresión de la proteína recombinante está dentro del alcance de aquellos expertos en la técnica a partir de las enseñanzas aquí. Los sistemas de cultivo de células de mamífero que se pueden emplear para la recombinación y/o redistribución reductiva o sólo para la expresión de la proteína recombinante incluyen, por ejemplo, las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritas en "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants" (Gluzman, 1981), las líneas C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender un origen de replicación, un potenciador y un promotor adecuados, y sitios de unión al ribosoma necesarios, sitios de poliadenilación, sitios dadores y aceptores de ajuste, secuencias de terminación transcripcional, y secuencias no transcritas que flanquean al 5'. Las secuencias de ADN derivadas de los sitios de poliadenilación y de ajuste de SV40 se pueden utilizar para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

Las células hospedantes que contienen los polinucleótidos de interés (para recombinación y/o reclasificación reductiva, o solamente para la expresión de proteína recombinante) se pueden cultivar en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similar, son aquellas usadas previamente con la célula hospedante seleccionada para expresión, y serán manifiestas para los expertos normales. Los clones que se identifican por tener la actividad enzimática específica se pueden secuenciar entonces para identificar la secuencia polinucleotídica que codifica una enzima que tiene la actividad potenciada.

En otro aspecto, los ácidos nucleicos y métodos de la presente invención se pueden usar para generar nuevos polinucleótidos para rutas bioquímicas, por ejemplo rutas de uno o más operones o racimos génicos o sus porciones. Por ejemplo, las bacterias y muchos eucariotas tienen un mecanismo coordinado para regular genes cuyos productos están implicados en procesos relacionados. Los genes se agrupan, en estructuras denominadas "racimos génicos", en un único cromosoma, o se transcriben juntos bajo el control de una única secuencia reguladora, incluyendo un único promotor que inicia la transcripción de todo el racimo. De este modo, un racimo génico es un grupo de genes adyacentes que son idénticos o están relacionados, habitualmente en cuanto a su función.

El ADN del racimo génico se puede aislar de diferentes organismos y se puede ligar en vectores, particularmente vectores que contienen secuencias reguladoras de la transcripción que pueden controlar y regular la producción de una proteína detectable o una actividad de matriz relacionada con proteínas a partir de los racimos génicos ligados. El uso de vectores que tienen una capacidad excepcionalmente grande para la introducción de ADN exógeno es particularmente apropiado para uso con tales racimos génicos, y se describe a título de ejemplo aquí para incluir el factor f (o factor de fertilidad) de *E. coli*. Este factor f de *E. coli* es un plásmido que afecta a la transferencia de alta frecuencia de sí mismo durante la conjugación, y es ideal para lograr y propagar de forma estable grandes

fragmentos de ADN, tales como racimos génicos de muestras microbianas mixtas. Como vectores de clonación, se pueden usar “fósmidos”, cósmidos o vectores de cromosoma artificial bacteriano (BAC). Estos derivan del factor *f* de *E. coli* que es capaz de integrar de forma estable grandes segmentos de ADN genómico. Cuando se integran con ADN de una muestra medioambiental no cultivada mixta, esto hace posible lograr grandes fragmentos genómicos en forma de una “biblioteca de ADN medioambiental” estable. Los vectores cosmídicos se diseñaron originalmente para clonar y propagar grandes segmentos de ADN genómico. La clonación en vectores cosmídicos se describe con detalle en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Una vez ligados en un vector apropiado, dos o más vectores que contienen diferentes racimos génicos de policetida sintasa se pueden introducir en una célula hospedante adecuada. Las regiones de homología de secuencia parcial compartida por los racimos génicos promoverán procesos que dan como resultado la reorganización de las secuencias, dando como resultado un racimo génico híbrido. El nuevo racimo génico híbrido se puede cribar entonces en busca de actividades mejoradas no encontradas en los racimos génicos originales.

De este modo, en un aspecto, la invención se refiere a un método para producir un polipéptido híbrido biológicamente activo usando un ácido nucleico de la invención, y cribar el polipéptido en busca de una actividad (por ejemplo, actividad potenciada):

(1) introduciendo al menos un primer polinucleótido (por ejemplo, un ácido nucleico de la invención) en ligación operable, y un segundo polinucleótido en enlazamiento operable, compartiendo dicho al menos primer nucleótido y segundo nucleótido al menos una región de homología de secuencia parcial, en una célula hospedante adecuada;

(2) haciendo crecer la célula hospedante en condiciones que promueven la reorganización de secuencias dando como resultado un polinucleótido híbrido en enlazamiento operable;

(3) expresar un polipéptido híbrido codificado por el polinucleótido híbrido;

(4) cribar el polipéptido híbrido en condiciones que promueven la identificación de la actividad biológica deseada (por ejemplo, actividad de fosfolipasa potenciada); y

(5) aislar el polinucleótido que codifica el polipéptido híbrido.

Los métodos para cribar diversas actividades enzimáticas son conocidos por los expertos en la técnica, y se explican en la presente memoria descriptiva. Tales métodos se pueden emplear cuando se aíslan polipéptidos y polinucleótidos de la invención.

La reclasificación *in vivo* se puede centrar en procesos “intermoleculares”, denominados colectivamente como “recombinación”. En bacterias, generalmente se denomina como un fenómeno “dependiente de RecA”. La invención se puede basar en procesos de recombinación de una célula hospedante para recombinar y reclasificar secuencias, o la capacidad de las células para mediar procesos reductivos para disminuir la complejidad de secuencias cuasi repetidas en la célula mediante supresión. Este proceso de “reclasificación reductiva” se produce mediante un proceso “intramolecular”, dependiente de RecA. De este modo, en un aspecto de la invención, usando los ácidos nucleicos de la invención, se generan nuevos polinucleótidos mediante el proceso de reclasificación reductiva. El método implica la generación de constructos que contienen secuencias consecutivas (secuencias codificantes originales), su inserción en un vector apropiado, y su introducción subsiguiente en una célula hospedante apropiada. La reclasificación de las identidades moleculares individuales se produce mediante procesos combinatorios entre las secuencias consecutivas en el constructo que posee regiones de homología, o entre unidades cuasi repetidas. El proceso de reclasificación recombina y/o reduce la complejidad y extensión de las secuencias repetidas, y da como resultado la producción de nuevas especies moleculares.

Diversos tratamientos se pueden aplicar para potenciar la tasa de reclasificación. Estos podrían incluir el tratamiento con luz ultravioleta, o productos químicos que dañan el ADN, y/o el uso de estirpes celulares hospedantes que presentan niveles potenciados de “inestabilidad genética”. De este modo, el proceso de reclasificación puede implicar recombinación homóloga o la propiedad natural de secuencias cuasi repetidas para dirigir su propia evolución.

Las secuencias repetidas o “cuasi repetidas” desempeñan un papel en la inestabilidad genética. “Cuasi repetidas” son repeticiones que no están restringidas a su estructura de unidad original. Las unidades cuasi repetidas se pueden presentar como un conjunto de secuencias en un constructo; unidades consecutivas de secuencias similares. Una vez ligadas, las uniones entre las secuencias consecutivas se hacen esencialmente invisibles, y la naturaleza cuasi repetitiva del constructo resultante es ahora continua a nivel molecular. El proceso de supresión que lleva a cabo la célula para reducir la complejidad del constructo resultante funciona entre las secuencias cuasi repetidas. Las unidades cuasi repetidas proporcionan un repertorio prácticamente ilimitado de moldes sobre los que se pueden producir eventos de deslizamiento. Los constructos que contienen las cuasi repeticiones proporcionan así eficazmente elasticidad molecular suficiente de que se pueden producir eventos de supresión (y potencialmente inserción) virtualmente en cualquier parte en las unidades cuasi repetitivas. Cuando las secuencias cuasi repetidas están todas ligadas en la misma orientación, por ejemplo cabeza a cola o viceversa, la célula no puede distinguir unidades individuales. En consecuencia, el proceso reductivo se puede producir a través de las secuencias. Por el

contrario, cuando por ejemplo las unidades se presentan cabeza a cabeza, en lugar de cabeza a cola, la inversión delinea los puntos finales de la unidad adyacente, de manera que la formación de supresión favorecerá la pérdida de unidades discretas. De este modo, en un aspecto de la invención, las secuencias a reclasificar están en la misma orientación. La orientación al azar de secuencias cuasi repetidas dará como resultado la pérdida de eficiencia de reclasificación, mientras que la orientación consistente de las secuencias ofrecerá la eficiencia más elevada. Sin embargo, aunque el tener un menor número de las secuencias contiguas en la misma orientación disminuye la eficiencia, todavía puede proporcionar suficiente elasticidad para la recuperación eficaz de nuevas moléculas. Se pueden obtener constructos con las secuencias cuasi repetidas en la misma orientación para permitir una mayor eficiencia.

Las secuencias se pueden ensamblar en la orientación cabeza a cola usando cualquiera de una variedad de métodos, incluyendo los siguientes: a) se pueden utilizar cebadores que incluyen una cabeza poly-A y una cola poly-T que cuando son monocatenarios proporcionarían orientación. Esto se logra obteniendo las primeras pocas bases de los cebadores a partir de ARN y por tanto fácilmente ARNasa H eliminada. b) Se pueden utilizar cebadores que incluyen sitios de escisión de restricción únicos. Se requerirían múltiples sitios, una batería de secuencias únicas, y etapas repetidas de síntesis y ligación. c) Las pocas bases internas del cebador se podrían tiliar y se podría usar una exonucleasa para producir moléculas con una cola apropiada.

La recuperación de las secuencias reclasificadas se basa en la identificación de vectores de clonación con un índice repetitivo (RI) reducido. Las secuencias codificantes reclasificadas se pueden recuperar entonces mediante amplificación. Los productos se vuelven a clonar y se expresan. La recuperación de vectores de clonación con RI reducido se puede ver afectada por: 1) el uso de vectores mantenidos sólo establemente cuando el constructo se reduce en complejidad. 2) La recuperación física de vectores acortados mediante procedimientos físicos. En este caso, el vector de clonación se recuperaría usando procedimientos de aislamiento de plásmidos estándar y se fraccionarían en tamaño en un gel de agarosa, o columna con un corte de bajo peso molecular utilizando procedimientos estándar. 3) La recuperación de vectores que contienen genes interrumpidos que se pueden seleccionar cuando disminuye el tamaño del inserto. 4) El uso de técnicas de selección directas con un vector de expresión y la selección apropiada.

Las secuencias codificantes (por ejemplo, genes) de organismos relacionados pueden demostrar un grado elevado de homología y codificar productos proteicos bastante diversos. Estos tipos de secuencias son particularmente útiles en la presente invención como cuasi repeticiones. Sin embargo, este proceso no está limitado a tales repeticiones casi idénticas.

Lo siguiente es un método ejemplar de la invención. Las secuencias de ácidos nucleicos codificantes (cuasi repeticiones) derivan de tres (3) especies, incluyendo un ácido nucleico de la invención. Cada secuencia codifica una proteína con un conjunto distinto de propiedades, incluyendo una enzima de la invención. Cada una de las secuencias difiere en un único par o unos pocos pares de bases en una posición única en la secuencia. Las secuencias cuasi repetidas se amplifican separada o colectivamente y se ligan en conjuntos aleatorios de manera que todas las posibles permutaciones y combinaciones están disponibles en la población de moléculas ligadas. El número de unidades cuasi repetidas se puede controlar mediante las condiciones de ensamblaje. El número medio de unidades cuasi repetidas en un constructo se define como el índice repetitivo (RI). Una vez formados, los constructos se pueden fraccionar o no por tamaños en un gel de agarosa según protocolos publicados, se pueden insertar en un vector de clonación, y se pueden transfectar en una célula hospedante apropiada. Las células se propagan entonces y se efectúa la "reclasificación reductiva". La velocidad del proceso de reclasificación reductiva se puede estimular mediante la introducción de daño de ADN si se desea. Si la reducción en RI está mediada por la formación de supresión entre secuencias repetidas mediante un mecanismo "intramolecular", o mediada por eventos parecidos a recombinación a través de mecanismos "intermoleculares" es inmaterial. El resultado final es una reclasificación de las moléculas en todas las posibles combinaciones. En un aspecto, el método comprende la etapa adicional de cribar los miembros de la biblioteca del conjunto barajado para identificar miembros de la biblioteca barajados individuales que tienen la capacidad de unirse o de otro modo interactuar o catalizar una reacción particular (por ejemplo, tal como un dominio catalítico de una enzima) con una macromolécula predeterminada, tal como por ejemplo un receptor proteínico, un oligosacárido, virión, u otro compuesto o estructura predeterminada. Los polipéptidos, por ejemplo fosfolipasas, que se identifican a partir de tales bibliotecas se pueden usar para diversos fines, por ejemplo los procesos industriales descritos aquí, y/o se pueden someter a uno o más ciclos adicionales de barajado y/o selección.

En otro aspecto, se prevé que antes o durante la recombinación o reclasificación, los polinucleótidos generados mediante el método de la invención se puedan someter a agentes o procesos que promuevan la introducción de mutaciones en los polinucleótidos originales. La introducción de tales mutaciones incrementaría la diversidad de polinucleótidos híbridos resultantes y polinucleótidos codificados a partir de ellos. Los agentes o procesos que promueven la mutagénesis pueden incluir, pero no se limitan a: (+)-CC-1065, o un análogo sintético tal como (+)-CC-1065-(N3-adenina (véase Sun y Hurley, (1992); un aducto 4'-fluoro-4-aminobifenílico N-acetilado o desacetilado capaz de inhibir la síntesis de ADN (véase, por ejemplo, van de Poll et al. (1992)); o un aducto 4-aminobifenílico N-acetilado o desacetilado capaz de inhibir la síntesis de ADN (véase también van de Poll et al. (1992), p. 751-758); cromo trivalente, una sal de cromo trivalente, un aducto de ADN con hidrocarburo aromático policíclico (PAH) capaz de inhibir la replicación de ADN, tal como 7-bromometilbenz[a]antraceno ("BMA"), tris(2,3-dibromopropil)fosfato

(“Tris-BP”), 1,2-dibromo-3-cloropropano (“DBCP”), 2-bromoacroleína (2BA), benzo[a]pireno-7,8-dihidrodiol-9-10-epóxido (“BPDE”), una sal de halógeno de platino(II), N-hidroxi-2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-quinolina (“N-hidroxi-IQ”), y N-hidroxi-2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-f]-piridina (“N-hidroxi-PhIP”). Los medios especialmente preferidos para ralentizar o detener la amplificación de PCR consiste en luz ultravioleta (+)-CC-1065 y (+)-CC-1065- (N3-adenina). Los medios particularmente englobados son aductos de ADN y polinucleótidos que comprenden los aductos de ADN de los polinucleótidos o conjunto de polinucleótidos, que se pueden liberar o eliminar mediante un proceso que incluye calentar la disolución que comprende los polinucleótidos antes del procesamiento posterior.

Metodologías de cribado y dispositivos de monitorización “en línea”

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

Soportes sólidos para la enzima inmovilizada

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

Por ejemplo, los soportes sólidos útiles en esta invención incluyen geles. Algunos ejemplos de geles incluyen sefarosa, gelatina, glutaraldehído, glutaraldehído tratado con quitosano, albúmina-glutaraldehído, quitosano-xantana, gel de toyopearl (gel polimérico), alginato, alginato-poliilisina, carrageenano, agarosa, glioxil agarosa, agarosa magnética, dextrano-agarosa, hidrogel de poli(carbamoiilsulfonato), hidrogel de BSA-PEG, polialcohol vinílico (PVA) fosforilado, monoaminoetil-N-aminoetil (MANA), amino, o cualquier combinación de los mismos.

Otro soporte sólido útil en la presente invención son las resinas o polímeros. Algunos ejemplos de resinas o polímeros incluyen celulosa, acrilamida, nailon, rayón, poliéster, resina de intercambio iónico, AMBERLITE™ XAD-7, AMBERLITE™ XAD-8, AMBERLITE™ IRA-94, AMBERLITE™ IRC-50, polivinilo, poliacrílico, polimetacrilato, o cualquier combinación de los mismos.

Otro tipo de soporte sólido útil en la presente invención es material cerámico. Algunos ejemplos incluyen material cerámico no poroso, material cerámico poroso, SiO₂, Al₂O₃. Otro tipo de soporte sólido útil en la presente invención es vidrio. Algunos ejemplos incluyen vidrio no poroso, vidrio poroso, vidrio aminopropílico, o cualquier combinación de los mismos. Otro tipo de soporte sólido que se puede usar es un microelectrodo. Un ejemplo es una magnetita revestida con polietilenimina. Como soporte sólido, se pueden usar partículas gráficas.

Otros soportes sólidos ejemplares utilizados para practicar la invención comprenden productos de tierra de diatomeas y silicatos. Algunos ejemplos incluyen diatomitas CELITE®, KENITE®, DIACTIV®, PRIMISIL®, DIAFIL®, y silicatos sintéticos de calcio y magnesio MICRO-CEL®, CALFLO®, SILASORB™, y CELKATE®. Otro ejemplo de un soporte sólido es una célula, tal como un glóbulo rojo.

Métodos de inmovilización

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

Matrices capilares

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

incluir una pluralidad de capilares formados en una matriz de capilares adyacentes, en el que cada capilar comprende al menos una pared que define una luz para retener una muestra. El aparato puede incluir además material intersticial colocado entre capilares adyacentes en la matriz, y uno o más indicios de referencia formados en el material intersticial. Un capilar para cribar una muestra, en el que el capilar se adapta para ser unido en una matriz de capilares, puede incluir una primera pared que define una luz para retener la muestra, y una segunda pared formada de un material filtrante, para filtrar la energía de excitación proporcionada a la luz para excitar la muestra.

Un polipéptido o ácido nucleico, por ejemplo un ligando, se puede introducir en un primer componente en al menos una porción de un capilar de una matriz capilar. Cada capilar de la matriz capilar puede comprender al menos una pared que define una luz para retener el primer componente. Se puede introducir una burbuja de aire en el capilar detrás del primer componente. Se puede introducir un segundo componente en el capilar, en el que el segundo componente se separa del primer componente por la burbuja de aire. Se puede introducir una muestra de interés como un primer líquido marcado con una partícula detectable en un capilar de una matriz capilar, en el que cada capilar de la matriz capilar comprende al menos una pared que define una luz para retener el primer líquido y la partícula detectable, y en el que la al menos una pared se reviste con un material de unión para unir la partícula detectable a la al menos una pared. El método puede incluir además eliminar el primer líquido del tubo capilar, en el que la partícula detectable unida se mantiene en el capilar, e introducir un segundo líquido en el tubo capilar.

La matriz capilar puede incluir una pluralidad de capilares individuales que comprenden al menos una pared exterior que define una luz. La pared exterior del capilar puede ser una o más paredes fusionadas juntas. De forma similar, la pared puede definir una luz que es de forma cilíndrica, cuadrada, hexagonal, o de cualquier otra forma geométrica, en tanto que las paredes formen una luz para retener un líquido o muestra. Los capilares de la matriz capilar se pueden mantener juntos en estrecha proximidad para formar una estructura plana. Los capilares se pueden unir juntos, fusionándolos (por ejemplo, cuando los capilares están hechos de vidrio), pegándolos, uniéndolos, o sujetándolos lado a lado. La matriz capilar puede estar formada de cualquier número de capilares individuales, por ejemplo un intervalo de 100 a 4.000.000 de capilares. Una matriz capilar puede formar una placa de microtitulación que tiene aproximadamente 100.000 o más capilares individuales unidos juntos.

Matrices o "biochips"

Los ácidos nucleicos o polipéptidos de la invención se pueden inmovilizar o aplicar a una matriz. Una matriz se puede usar para cribar o monitorizar bibliotecas de composiciones (por ejemplo, pequeñas moléculas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) en busca de su capacidad para unirse a o modular la actividad de un ácido nucleico o un polipéptido de la invención. Por ejemplo, en un aspecto de la invención, un parámetro monitorizado es la expresión transcrita de un gen de fosfolipasa. Uno o más o todos los transcritos de una célula se pueden medir mediante hibridación de una muestra que comprende transcritos de la célula, o ácidos nucleicos representativos de o complementarios a transcritos de una célula, mediante hibridación a ácidos nucleicos inmovilizados en una matriz o "biochip". Mediante el uso de una "matriz" de ácidos nucleicos en un microchip, algunos o todos los transcritos de una célula se pueden cuantificar simultáneamente. Como alternativa, también se pueden usar matrices que comprenden ácido nucleico genómico, para determinar el genotipo de una cepa recientemente obtenida mediante ingeniería obtenida mediante los métodos de la invención. También se pueden usar "matrices polipeptídicas" para cuantificar simultáneamente una pluralidad de proteínas.

En una realización alternativa, la invención proporciona "matrices" o "micromatrices" o "biochips" o "chips" que comprenden una pluralidad de elementos diana, en donde cada elemento diana puede comprender una cantidad definida de uno o más polipéptidos (incluyendo anticuerpos) o ácidos nucleicos inmovilizados sobre un área definida de una superficie del sustrato, y al menos un ácido nucleico y/o polipéptido es un ácido nucleico y/o polipéptido de esta invención.

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

En la práctica de los métodos de la invención, cualquier matriz conocida y/o método para obtener y usar matrices se pueden incorporar en todo o en parte, o sus variaciones, como se describe, por ejemplo, en las patentes U.S. n^{os} 6.277.628; 6.277.489; 6.261.776; 6.258.606; 6.054.270; 6.048.695; 6.045.996; 6.022.963; 6.013.440; 5.965.452; 5.959.098; 5.856.174; 5.830.645; 5.770.456; 5.632.957; 5.556.752; 5.143.854; 5.807.522; 5.800.992; 5.744.305; 5.700.637; 5.556.752; 5.434.049; véanse también, por ejemplo, los documentos WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; véanse también, por ejemplo, Johnston (1998) Curr. Biol. 8:R171-R174; Schummer (1997) Biotechniques 23:1087-1092; Kern (1997) Biotechniques 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) Genes, Chromosomes & Cancer 20:399-407; Bowtell (1999) Nature Genetics Supp. 21:25-32. Véanse también las solicitudes de patentes U.S. publicadas n^{os} 20010018642; 20010019827; 20010016322; 20010014449; 20010014448; 20010012537; 20010008765.

Anticuerpos y métodos de cribado a base de anticuerpos

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

Un "anticuerpo" de esta invención puede incluir un péptido o polipéptido derivado a partir de, modelado o sustancialmente codificado por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o fragmentos de los mismos, capaz de unirse específicamente un antígeno o epitopo, véase, por ejemplo *Fundamental Immunology*, Tercera Edición, W.E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993); Wilson (1994) *J. Immunol. Methods* 175:267-273; Yarmush (1992) *J. Biochem. Biophys. Methods* 25:85-97. El término anticuerpo incluye porciones de unión al antígeno, es decir, "sitios de unión al antígeno", (por ejemplo, fragmentos, subsecuencias, regiones determinantes de la complementariedad (CDRs)) que retienen la capacidad para unirse al antígeno, incluyendo (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente de bisulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Los anticuerpos monocatenarios también se incluyen por referencia en el término "anticuerpo".

Los anticuerpos se pueden usar en inmunoprecipitación, tinción (por ejemplo, FACS), columnas de inmunoafinidad, y similares. Si se desea, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican antígenos específicos se pueden generar mediante inmunización seguida de aislamiento del polipéptido o ácido nucleico, amplificación o clonación e inmovilización de polipéptido sobre una matriz de la invención.

Como alternativa, los métodos de la invención se pueden usar para modificar la estructura de un anticuerpo producido por una célula a modificar, por ejemplo se puede incrementar o disminuir una afinidad por el anticuerpo. Además, la capacidad para obtener o modificar anticuerpos puede ser un fenotipo manipulado en una célula mediante los métodos de la invención.

Los métodos de inmunización, producción y aislamiento de anticuerpos (policlonales y monoclonales) son conocidos por los expertos en la técnica, y se describen en la bibliografía científica y de patentes; véanse, por ejemplo, Coligan, *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY*, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (eds.) *BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY* (7ª ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA ("Stites"); Goding, *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE* (2ª ed.) Academic Press, Nueva York, NY (1986); Kohler (1975) *Nature* 256:495; Harlow (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Publications, Nueva York. Los anticuerpos también se pueden generar in vitro, por ejemplo usando bibliotecas de presentación de fagos que expresan sitios de unión a anticuerpos recombinantes, además de los métodos in vivo tradicionales que usan animales. Véanse, por ejemplo, Hoogenboom (1997) *Trends Biotechnol.* 15:62-70; Katz (1997) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26:27-45.

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

En procedimientos de inmunoafinidad, el anticuerpo se une a un soporte sólido, tal como una perla u otra matriz de columna. La preparación proteica se coloca en contacto con el anticuerpo en condiciones en las que el anticuerpo se une específicamente a uno de los polipéptidos de la invención. Después de un lavado para eliminar las proteínas no unidas específicamente, se eluyen los polipéptidos unidos específicamente.

La capacidad de las proteínas en una muestra biológica para unirse al anticuerpo se puede determinar usando cualquiera de una variedad de procedimientos familiares para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la unión se puede determinar marcando el anticuerpo con un marcador detectable tal como un agente fluorescente, un marcador enzimático, o un radioisótopo. Como alternativa, la unión del anticuerpo a la muestra se puede detectar usando un segundo anticuerpo que tiene tal marcador detectable en él. Los ensayos particulares incluyen ensayos de ELISA, ensayos de sándwich, radioinmunoensayos, y transferencias Western.

Los anticuerpos policlonales generados frente a los polipéptidos de la invención se pueden obtener mediante inyección directa de los polipéptidos en un animal, o administrando los polipéptidos a un animal, por ejemplo un animal no humano. El anticuerpo así obtenido se unirá entonces al propio polipéptido. De esta manera, se puede usar incluso una secuencia que codifica sólo un fragmento del polipéptido para generar anticuerpos que se pueden unir a todo el polipéptido nativo. Tales anticuerpos se pueden usar entonces para aislar el polipéptido de células que expresan ese polipéptido.

Para la preparación de anticuerpos monoclonales, se puede usar cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos mediante cultivos continuos de estirpes celulares. Los ejemplos incluyen la técnica de hibridoma, la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de célula B humana, y la técnica de hibridoma de EBV (véase, por ejemplo, Cole (1985) en *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., p. 77-96).

- 5 Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios frente a los polipéptidos de la invención. Como alternativa, se pueden usar ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados frente a estos polipéptidos o sus fragmentos.

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

Kits

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

Usos industriales y médicos de las enzimas de la invención

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

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

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

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

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

- 55 En otra realización, se proporciona aquí un método para obtener un fosfolípido a partir de un aceite comestible. En cierta realización, los fosfolípidos obtenidos mediante los métodos proporcionados aquí incluyen una variedad de fosfolípidos, incluyendo, pero no limitado a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE),

lisofosfatidilserina (LPS), lisofosfatidilinositol (LPI), ácido lisofosfatídico (LPA), colina (C), etanolamina (E), serina (S), e inositol (I).

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

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

La invención proporciona procedimientos que usan enzima o enzimas descritas aquí para obtener y procesar aceites comestibles, incluyendo la generación de aceites comestibles con mayores cantidades de 1,3-DAG. Los diacilgliceroles son compuestos de origen natural encontrados en muchos aceites comestibles. En un aspecto de un método de la invención, por ejemplo el procedimiento de desgomado de aceite, una base (cáustica) provoca la isomerización de 1,2-DAG, producido por PLC, en 1,3-DAG, que proporciona un beneficio para la salud nutricional con respecto a 1,2-DAG, por ejemplo el 1,3-DAG se quema como energía en lugar de ser almacenado como grasa (como lo es 1,2-DAG). Añadiendo la PLC al inicio del procedimiento de refinado cáustico (y subsiguientemente el ácido y la materia cáustica), los métodos de la invención generan un nivel elevado de 1,3-DAG (disminuyendo 1,2-DAG). Nutricionalmente, 1,3-DAG es mejor para usted que 1,2-DAG. En aspectos alternativos, la invención comprende un procedimiento de desgomado de aceite que usa una PLC de la invención, con lo que el producto oleoso desgomado final contiene no menos de 0,5%, 1,0%, 2,0% o 3,0% o más de 1,3-DAG.
15
20

De este modo, la invención proporciona un procedimiento para obtener (a través de interesterificación) un aceite refinado (por ejemplo, un aceite de diacilglicerol), incluyendo aceites comestibles, que contiene mayores niveles de 1,3-diacilglicerol (1,3-DAG), en el que se “añade inicialmente” o se añade antes de la adición de ácido o de la materia cáustica una fosfolipasa, tal como una enzima de la invención. La generación mediante hidrólisis enzimática de un DAG a partir de un triglicérido genera mediante interesterificación 1,3 DAG a partir de 1,2 DAG. El aceite comestible que comprende 1,3 DAG muestra diferentes efectos metabólicos en comparación con los agentes comestibles convencionales. Las diferencias en las rutas metabólicas entre 1,3 DAG y 1,2 DAG o triglicéridos permiten que se queme una mayor porción de ácidos grasos a partir de 1,3 diacilglicerol como energía en lugar de ser almacenada como grasa. Los estudios clínicos han demostrado que el consumo habitual de aceite de DAG como parte de una dieta sensible puede ayudar a los individuos a gestionar su peso corporal y grasa corporal. Además, el metabolismo de 1,3 DAG reduce los triglicéridos postprandiales circulantes en el torrente sanguíneo. Puesto que la obesidad y los niveles elevados de lípidos sanguíneos están asociados con factores de riesgo para enfermedades crónicas que incluyen enfermedad cardiovascular y diabetes tipo II, estas condiciones de salud relacionadas con el estilo de vida pueden ser impactadas de manera beneficiosa con el consumo habitual de aceites de DAG.
25
30
35

El consumo de aceite que comprende DAG puede tener lugar a través de una variedad de medios. De este modo, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento que usa una enzima de la invención para obtener un alimento, por ejemplo un producto horneado, que tiene mayores niveles de diacilglicerol 1,3-DAG, y productos horneados que comprenden aceites de diacilglicerol. En un aspecto, los productos horneados son galletas, tartas y productos horneados similares.
40

En realizaciones alternativas, la combinación de enzimas que se puede usar en los métodos de la invención, incluyendo el procesamiento de aceites comestibles, incluye (en la que una, varias o todas las enzimas en la combinación comprenden una enzima de la presente invención):

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

Desgomado de aceites y procesamiento del aceite vegetal

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

Estos procedimientos de la invención se pueden usar en una “escala de procedimiento”, por ejemplo en una escala de aproximadamente 15.000; 25.000; 50.000; 75.000; o 100.000 lbs de aceite refinado/día hasta aproximadamente
55 1, 2, 3, 4, 5 o 6 o más millones de lbs de aceite refinado/día.

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

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

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

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

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

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

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

Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en la aplicación industrial del desgomado enzimático como se describe, por ejemplo, en el documento CA 1102795, que describe un método para aislar lípidos polares a partir de

lípidos de cereales mediante la adición de al menos 50% en peso de agua. Este método es un desgomado modificado, en el sentido de que utiliza el principio de añadir agua a una mezcla de aceite bruta.

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

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

En diversos procedimientos ejemplares de la invención, un número de etapas distintas componen el procedimiento de desgomado que antecede a los procedimientos de blanqueo del núcleo y refinado con desodorización. Estas etapas incluyen calentar, mezclar, retener, separar y secar. Tras la etapa de calentamiento, se añade agua y a menudo ácido y se mezclan para permitir que la "goma" de fosfolípido insoluble se aglomere en partículas que se pueden separar. Mientras que el agua separa muchos de los fosfátidos en el desgomado, las porciones de los fosfolípidos son fosfátidos no hidratables (NHPs) presentes como sales de calcio o magnesio. Los procedimientos de desgomado se dirigen a estos NHPs mediante la adición de ácido. Tras la hidratación de los fosfolípidos, el aceite se mezcla, se retiene y se separa mediante centrifugación. Finalmente, el aceite se seca y se almacena, se transporta o refina, como se ilustra, por ejemplo, en la Figura 1. Las gomas resultantes se procesan posteriormente para productos de lecitina, o se añaden nuevamente a la harina.

En una realización, se proporciona aquí un método para la hidratación de fosfolípidos no hidratables dentro de una matriz de lípido permitiéndoles migrar a una interfaz aceite-agua. Los fosfolípidos no hidratables posteriormente se hacen reaccionar y/o se eliminan de los lípidos. En una realización, el método comprende a) mezclar un ácido acuoso con un aceite comestible para obtener una mezcla ácida que tiene pH menor que aproximadamente 4; y b) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla reaccionada que tiene pH de aproximadamente 6-9, en donde el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende una fase acuosa en un tamaño de gota promedio entre aproximadamente 15 μm hasta aproximadamente 45 μm de tamaño. En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen en un tamaño de gota entre aproximadamente 15 μm hasta aproximadamente 45 μm de tamaño, en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En cierta realización, los métodos proporcionados aquí permiten que los fosfolípidos no hidratables dentro de una matriz de lípido migren a una interfaz aceite-agua.

En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende una fase acuosa en un tamaño de gota promedio entre aproximadamente 15-40 μm , 15-35 μm , 17-40 μm , 20-40 μm , 20-30 μm , 25-30 μm , 25-40 μm , o 25-35 μm . En ciertas realizaciones, el meclamiento en la etapa a) crea una emulsión que comprende una fase acuosa en un tamaño de gota promedio entre aproximadamente 15-40 μm , 15-35 μm , 17-40 μm , 20-40 μm , 20-30 μm , 25-30 μm , 25-40 μm , o 25-35 μm . En ciertas realizaciones, el meclamiento en la etapa b) crea una emulsión que comprende una fase acuosa en un tamaño de gota promedio entre aproximadamente 15-40 μm , 15-35 μm , 17-40 μm , 20-40 μm , 20-30 μm , 25-30 μm , 25-40 μm , o 25-35 μm . En ciertas realizaciones, el tamaño de gota promedio es aproximadamente 15 μm , 17 μm , 19 μm , 20 μm , 22 μm , 25 μm , 27 μm , 30 μm , 35 μm , o 40 μm . En ciertas realizaciones, el tamaño de gota promedio es aproximadamente 20 μm .

En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota entre aproximadamente 20 μm hasta aproximadamente 40 μm de tamaño, en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En ciertas realizaciones, las etapas de meclamiento crean una emulsión que comprende aproximadamente 60-95%, 60-90%, 60-80%, 70-95%, 80-95% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota entre aproximadamente 20-40 μm , 20-35 μm , 25-40 μm , 30-40 μm , 35-40 μm , o 25-45 μm , en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60, 70, 80, 90, 93, 95, 96, 97, 98, o 99% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota entre aproximadamente 15-45 μm , 20-40 μm , 20-45 μm , 25-40 μm , 20-35 μm , 30-40 μm , 35-40 μm , o 25-45 μm , en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el

volumen total de la fase acuosa. En ciertas realizaciones, el meclamiento en la etapa a) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60, 70, 80, 90, 93, 95, 96, 97, 98, o 99% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota entre aproximadamente 15-45 μm , 20-40 μm , 20-45 μm , 25-40 μm , 20-35 μm , 30-40 μm , 35-40 μm , o 25-45 μm , en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En ciertas realizaciones, el meclamiento en la etapa b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60, 70, 80, 90, 93, 95, 96, 97, 98, o 99% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota entre aproximadamente 15-45 μm , 20-40 μm , 20-45 μm , 25-40 μm , 20-35 μm , 30-40 μm , 35-40 μm , o 25-45 μm , en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 10-30% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota menor que aproximadamente 10 μm , en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 20-25% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota menor que aproximadamente 10 μm , en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60-95% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota mayor que aproximadamente 10 μm , en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 70-80% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota mayor que aproximadamente 10 μm , en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En ciertas realizaciones, el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 90% de la fase acuosa en volumen en un tamaño de gota promedio de aproximadamente 20 μm , en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa.

Sin estar atado por cualquier teoría particular, se cree que en la etapa a), las sales de calcio, magnesio, y hierro del ácido fosfatídico y la fosfatidil etanolamina se disocian. Los cationes libres de calcio, magnesio, y hierro reaccionan con, por ejemplo, los aniones citrato, acetato o fosfato del ácido, para formar sales de metales. En la etapa b), los cationes metálicos de la base, por ejemplo los iones de sodio o potasio, forman complejos con el ácido fosfatídico o la fosfatidil etanolamina. En ciertas realizaciones, el método adicionalmente comprende la adición de agua seguido de un meclamiento de cizallamiento elevado para formar una emulsión mecánica. Posteriormente, los fosfolípidos emulsionados se eliminan mediante desgomado químico o se hacen reaccionar en el desgomado enzimático.

Cualquier dispositivo de cizallamiento y/o meclamiento estimado adecuado por alguien de habilidad en la técnica se puede utilizar para el meclamiento en los métodos proporcionados aquí. En ciertas realizaciones, el meclamiento comprende cizallamiento y agitación. En cierta realización, el dispositivo de meclamiento es un mezclador de cabeza, incluyendo un mezclador digital IKA RW 20 con una paleta de cuchilla plana. En ciertas realizaciones, el dispositivo de meclamiento se opera a aproximadamente 50 rpm, 100 rpm, 150 rpm o 200 rpm para una agitación normal y a aproximadamente 250 rpm, 300 rpm, 350 rpm, 400 rpm o más para una agitación vigorosa. En cierta realización, el meclamiento con cizallamiento se realiza con el homogeneizador T-50 basic Ultra-Turrax de IKA con un elemento de dispersión S 50 N - G 45 G a 10.000 rpm.

En ciertas realizaciones, el mezclador es un mezclador de cizallamiento elevado de rotor/estator con velocidad de la punta (velocidad radial en la cámara del mezclador) de al menos aproximadamente 1400 cm/s. En ciertas realizaciones, la energía disipada por el mezclador es al menos 1,0 KW/tonelada métrica de producto/h. En ciertas realizaciones, las emulsiones aceite/agua en escala industrial se obtienen con velocidades de la punta que varían dentro del rango de desde aproximadamente 1400 cm/s hasta 2300 cm/s, o incluso más altas. En ciertas realizaciones, la velocidad la punta es aproximadamente 1400 cm/s, 1600 cm/s, 1800 cm/s, 2000 cm/s, 2100 cm/s, 2300 cm/s, 2500 cm/s, 3000 cm/s, o 3500 cm/s. En ciertas realizaciones, la velocidad de la punta es aproximadamente 2300 cm/s. En ciertas realizaciones, la energía disipada por el mezclador es desde aproximadamente 1,0 hasta aproximadamente 2,0 KW/tonelada métrica de producto/h. En ciertas realizaciones, la energía disipada por el mezclador es aproximadamente 2,0 KW/tonelada métrica de producto/h. En ciertas realizaciones, para un proceso continuo, se requieren 10 KW de disipación de energía efectiva en el mezclador de cizallamiento elevado para 10 toneladas métricas de aceite por hora.

En ciertas realizaciones, el meclamiento de ácido comprende cizallamiento durante menos de aproximadamente 1 minuto. En ciertas realizaciones, el meclamiento de ácido comprende cizallamiento durante aproximadamente 1 segundo, 3 segundos, 5 segundos, 8 segundos, 10 segundos, 20 segundos, 30 segundos, 40 segundos, 50 segundos o 60 segundos. En ciertas realizaciones, el meclamiento de ácido comprende cizallamiento durante al menos aproximadamente 1 minuto. En ciertas realizaciones, el meclamiento de ácido comprende cizallamiento durante al menos aproximadamente 1 segundo hasta aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 1 segundo hasta aproximadamente 10 minutos, al menos aproximadamente 1 segundo hasta aproximadamente 7 minutos, al menos aproximadamente 1 segundo hasta aproximadamente 5 minutos, al menos aproximadamente 1 segundo hasta aproximadamente 3 minutos o al menos aproximadamente 1 segundo hasta aproximadamente 2 minutos. En ciertas realizaciones, el meclamiento de ácido comprende cizallamiento durante al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 minutos.

- En ciertas realizaciones, el meclamiento de ácido comprende cizallamiento seguido de agitación desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 5 horas. En ciertas realizaciones, la mezcla ácida se agita durante al menos aproximadamente 1 minuto. En ciertas realizaciones, la agitación de ácido se continúa desde aproximadamente 10 minutos hasta aproximadamente 5 horas o más. En ciertas realizaciones, la agitación de ácido se continúa desde aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 5 horas o más. En ciertas realizaciones, la agitación de ácido se continúa desde aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 3 horas o más. En ciertas realizaciones, la agitación de ácido se continúa desde aproximadamente 30 minutos hasta aproximadamente 2 horas o más. En ciertas realizaciones, la agitación de ácido se continúa durante aproximadamente 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 150 o 180 minutos.
- En ciertas realizaciones, el ácido utilizado en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, y mezclas de los mismos. En una realización, el ácido es ácido cítrico.
- En ciertas realizaciones, el pH de la mezcla ácida en la etapa a) es aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4. En ciertas realizaciones, el pH de la mezcla ácida en la etapa a) es aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 o 4.
- En ciertas realizaciones, el meclamiento de ácido se continúa hasta que se disocian las sales de calcio, magnesio, y hierro del ácido fosfatídico y la fosfatidil etanolamina.
- En ciertas realizaciones, el ácido acuoso utilizado en el método comprende al menos aproximadamente 5% en peso de ácido basado en el peso combinado del ácido y el agua. En ciertas realizaciones, el ácido acuoso utilizado en el método comprende al menos aproximadamente 5 hasta aproximadamente 90%, aproximadamente 5 hasta aproximadamente 80%, aproximadamente 5 hasta aproximadamente 70%, aproximadamente 10 hasta aproximadamente 90%, aproximadamente 20 hasta aproximadamente 60%, aproximadamente 30 hasta aproximadamente 60%, o aproximadamente 40 hasta aproximadamente 60% en peso de ácido basado en el peso combinado del ácido y el agua. En ciertas realizaciones, el ácido acuoso utilizado en el método comprende al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 85, 90% en peso de ácido basado en el peso combinado del ácido y el agua. En ciertas realizaciones, el ácido acuoso utilizado en los métodos comprende al menos aproximadamente 5% en peso de ácido cítrico basado en el peso combinado del ácido cítrico y el agua. En ciertas realizaciones, el ácido acuoso utilizado en los métodos comprende al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60% en peso de ácido cítrico basado en el peso combinado del ácido cítrico y el agua. En ciertas realizaciones, el ácido acuoso utilizado en los métodos comprende al menos aproximadamente 40, 45, 50, 55 o 60% en peso de ácido cítrico basado en el peso combinado del ácido cítrico y el agua. En una realización, el ácido acuoso utilizado en el método comprende aproximadamente 50% en peso de ácido cítrico basado en el peso combinado del ácido cítrico y el agua. En ciertas realizaciones, el ácido acuoso utilizado en los métodos comprende al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 85, 90% en peso de ácido fosfórico basado en el peso combinado del ácido fosfórico y el agua.
- En ciertas realizaciones, el ácido acuoso se utiliza en al menos aproximadamente 0,01% en peso basado en el peso total del aceite. En ciertas realizaciones, el ácido acuoso se utiliza en al menos aproximadamente 0,05% en peso basado en el peso total del aceite. En ciertas realizaciones, el ácido acuoso se utiliza en al menos aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10%, aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 5%, aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 3%, aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 2% o aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 2% en peso basado en el peso total del aceite. En ciertas realizaciones, el ácido acuoso se utiliza en aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 5, 7 o 10% en peso basado en el peso total del aceite.
- Una base se mezcla con la mezcla ácida para obtener una mezcla reaccionada que tiene pH de aproximadamente 6-9 en la fase acuosa. El meclamiento se continúa para permitir que los fosfolípidos no hidratables dentro de una matriz de lípido migren a una interfaz aceite-agua. Cualquier base estimada adecuada por uno de habilidad en la técnica se puede utilizar en la etapa b). En ciertas realizaciones, la base se selecciona del grupo que consiste en hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, silicato de sodio, carbonato de sodio, carbonato de calcio, y una combinación de los mismos. En una realización, la base es hidróxido de sodio. En ciertas realizaciones, la base se añade como una disolución acuosa diluida tal que la base no saponifica aceite neutro alguno. En ciertas realizaciones, la base se añade como disolución acuosa aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 8 M, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4 M, aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3 M, o aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3 M. En ciertas realizaciones, la base se añade como disolución acuosa aproximadamente 0,1 M, 0,5 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M u 8 M. En una realización, la cantidad mínima de base a ser utilizada para que la eliminación de los NHPs sea efectiva es tal que el pH de la fase acuosa se eleva a al menos aproximadamente 6. En ciertas realizaciones, la cantidad de base utilizada es suficiente para elevar el pH de la fase acuosa hasta aproximadamente 6, 6,5, 7, 7,5 u 8. En ciertas realizaciones, el meclamiento de la base se continúa durante al menos aproximadamente 1 minuto. En ciertas realizaciones, el meclamiento de la base se continúa desde aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 5 horas o más. En ciertas realizaciones, el meclamiento de la base se continúa durante aproximadamente 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 150 o 180 minutos.

- Los métodos proporcionados aquí se pueden conducir a cualquier temperatura estimada adecuada por uno de habilidad en la técnica. En ciertas realizaciones, la temperatura durante el proceso está en el rango desde aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 100°C, aproximadamente 20°C hasta aproximadamente 90°C, aproximadamente 40°C hasta aproximadamente 80°C, o aproximadamente 40°C hasta aproximadamente 70°C. En ciertas realizaciones, la temperatura durante el proceso es aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 o 100°C.
- 5 En ciertas realizaciones, el agua se añade después de la reacción con la base en una cantidad desde aproximadamente 0,1 hasta 5% o más basado en el volumen total de la mezcla de reacción seguido de un meclamiento de cizallamiento elevado para formar una emulsión mecánica que permite ya sea que los fosfolípidos sean emulsionados en el desgomado químico o reaccionados en el desgomado enzimático.
- 10 En ciertas realizaciones, el agua se añade entonces en aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5% o más basado en el volumen total de la mezcla de reacción.
- En una realización, se proporciona aquí un método en donde la hidratación de los NHPs es seguida del tratamiento enzimático para eliminar varios fosfolípidos y lecitinas. Tales métodos se pueden practicar sobre ya sea aceites desgomados con agua o brutos.
- 15 En ciertas realizaciones, un método de desgomado de aceite proporcionado aquí comprende: a) mezclar un ácido acuoso con un aceite comestible para obtener una mezcla ácida que tiene pH de aproximadamente 1 a 4; b) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla reaccionada que tiene pH de aproximadamente 6-9; y c) desgomar la mezcla reaccionada con agua o una enzima para obtener un aceite desgomado, en donde el meclamiento en las etapas a) y/o b) se lleva a cabo con un meclamietor de cizallamiento elevado.
- 20 En las realizaciones donde se utiliza una enzima en la etapa de desgomado, se pueden añadir una o más enzimas al aceite ya sea por separado o conjuntamente. Los parámetros de la reacción enzimática incluyendo la temperatura, pH, y concentración de la enzima se pueden controlar para optimizar la reacción para una combinación de enzimas particular en un sistema de aceite particular. Muchas variedades de enzimas y sus equivalentes son adecuadas para el uso en los métodos proporcionados aquí, incluyendo las familias de fosfolipasa A y fosfolipasa C que están comercialmente disponibles. Las enzimas ejemplares se describen aquí en cualquier otra parte.
- 25 En ciertas realizaciones, las diferentes fosfolipasas utilizadas conjuntamente en la etapa de desgomado enzimático se mezclan antes de la adición al aceite a ser tratado.
- Alternativamente, las enzimas se añaden al aceite por separado, ya sea secuencialmente o simultáneamente.
- 30 La cantidad de enzima utilizada en los métodos proporcionados aquí depende de las condiciones de reacción, el tipo de aceite y el tipo de uso de la enzima. En ciertas realizaciones, la cantidad está en el rango desde 10 hasta 20.000 unidades, desde 20 hasta 10.000 unidades, desde 50 hasta 5.000 unidades, o desde 100 hasta 2.000 unidades, por 1 kg del aceite.
- 35 En una realización, se proporciona aquí un método para eliminar NHPs, fosfolípidos hidratables, y lecitinas (conocidos colectivamente como "gomas") de los aceites vegetales para producir un producto de grasa o aceite desgomado que se puede utilizar para la producción de alimentos y/o aplicaciones no alimentarias. En ciertas realizaciones, los métodos de desgomado proporcionados aquí utilizan agua, varios ácidos y/o varias bases, o una combinación de los mismos.
- 40 En una realización, los métodos proporcionados aquí son útiles para la eliminación de sales del ácido fosfatídico y fosfatidil etanolamina a partir de aceites vegetales. En ciertas realizaciones, se forman sales de citrato de magnesio y calcio en la etapa a). Los métodos proporcionados aquí eliminan los problemas asociados con el ensuciamiento del equipo debido a la deposición de sales de citrato de magnesio y calcio en los equipos después de las reacciones. Las sales de citrato de magnesio y calcio son solubles en el pH en el cual se lleva a cabo la reacción enzimática y el procesamiento adicional en los métodos proporcionados aquí.
- 45 En ciertas realizaciones, se proporcionan aquí métodos para mejorar la velocidad de reacción de una fosfolipasa utilizada en un desgomado enzimático, tal que la reacción de la enzima tiene una duración de menos de aproximadamente seis, cinco, cuatro, tres, dos o una hora. En ciertas realizaciones, la mejora en la velocidad de reacción se logra mediante un meclamiento de cizallamiento elevado de la mezcla reaccionada de la etapa b) para formar una emulsión mecánica que posteriormente se hace reaccionar con la enzima.
- 50 En todavía otro aspecto, se proporciona aquí un método para el desgomado de una composición de aceite vegetal en la cual se pueden tratar fosfolípidos tanto hidratables como no hidratables en un solo proceso, en donde una reacción de la enzima se completa en menos de aproximadamente una hora.
- 55 En cierta realización, el aceite comprende aceite de *Neochloris oleoabundans*, aceite de *Scenedesmus dimorphus*, aceite de *Euglena gracilis*, aceite de *Phaeodactylum tricornutum*, aceite de *Pleurochrysis carterae*, aceite de *Prymnesium parvum*, aceite de *Tetraselmis chui*, aceite de *Tetraselmis suecica*, aceite de *Isochrysis galbana*, aceite de *Nannochloropsis salina*, aceite de *Botryococcus braunii*, aceite de *Dunaliella tertiolecta*, aceite de especies de

5 Nannochloris, aceite de especies de Spirulina, aceite de Chlorophycease, aceite de Bacilliarophy, aceite de acai, aceite de almendras, aceite de babasú, aceite de semilla de grosella negra, aceite de semilla de borraja, aceite de cáñola, aceite de anacardo, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de crambe, aceite de semilla de lino, aceite de semilla de uva, aceite de avellanas, otros aceites de nueces, aceite de cáñamo, aceite de jatropa, aceite de jojoba, aceite de linaza, aceite de nuez de macadamia, aceite de hueso de mango, aceite de limnanthes alba, aceite de mostaza, aceite de pata de buey, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de cacahuete, aceite de pecana, aceite de piñón, aceite de pistacho, aceite de adormidera, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de sésamo, aceite de manteca de karité, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, taloil, aceite de tsubaki, aceite de nuez, variedades de aceites "naturales" que tienen composiciones de ácidos grasos alteradas por medio de Organismos Genéticamente Modificados (GMO) o "producción" tradicional tales como aceites con alto contenido de ácido oleico, con bajo contenido de ácido linolénico, o con bajo contenido de ácidos saturados (aceite de cáñola con alto contenido de ácido oleico, aceite de soja con bajo contenido de ácido linolénico o aceites de girasol con alto contenido de ácido esteárico), o una mezcla de los mismos. En una realización, los aceites que se pueden tratar incluyen pero no se limitan a los siguientes: aceite de cáñola, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de avellanas, aceite de cáñamo, aceite de linaza, aceite de hueso de mango, aceite de limnanthes alba, aceite de pata de buey, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, oleína de palma, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, taloil, aceite de tsubaki, y aceite vegetal.

20 En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados aquí reducen el contenido de fosfolípidos de un aceite a menos de aproximadamente 30 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 20 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 15 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 10 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 7 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 5 ppm de fósforo o menos de aproximadamente 3 ppm de fósforo. En ciertas realizaciones, los métodos proporcionados aquí reducen el contenido de fosfolípidos de un aceite hasta 25 aproximadamente 10 ppm de fósforo, aproximadamente 7 ppm de fósforo, aproximadamente 5 ppm de fósforo o aproximadamente 3 ppm de fósforo.

Después de la etapa de desgomado, el aceite desgomado se puede separar de las gomas, y someterse a etapas de procesamiento adicional conocidas en la técnica, incluyendo blanqueamiento o desodorización, según pueda ser necesario o deseable dependiendo del uso final para el cual está destinado el producto de aceite desgomado.

30 En cierta realización, se proporcionan aquí métodos para obtener fosfolípidos, que comprenden:

a) mezclar un ácido acuoso con el aceite comestible para obtener una mezcla ácida que tiene pH menor que aproximadamente 4;

35 b) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla reaccionada que tiene pH de aproximadamente 6-9, en donde el meclamiento en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen en un tamaño de gota entre aproximadamente 15 μm hasta aproximadamente 45 μm de tamaño;

c) mezclar una enzima seleccionada a partir de fosfolipasa A, fosfolipasa C, fosfolipasa C específica para fosfatidil-inositol, o una combinación de los mismos; y

d) aislar los fosfolípidos.

40 En diversos procedimientos ejemplares de la invención, los niveles de fósforo se reducen suficientemente bajos para el refinado físico. El procedimiento de separación puede dar como resultado pérdidas de rendimiento potencialmente mayores que el refinado cáustico. Adicionalmente, los procedimientos de desgomado pueden generar productos de desecho que no se pueden vender como lecitina comercial, véase, por ejemplo, la Figura 2 para un procedimiento de desgomado ejemplar para aceites físicamente refinados. Por lo tanto, estos procedimientos no han logrado una 45 cuota significativa de mercado, y los procedimientos de refinado cáustico continúan dominando la industria para salvado de arroz, soja, cáñola y girasol. Obsérvese sin embargo que una enzima fosfolipasa C empleada en un procedimiento de desgomado especial disminuiría la formación de gomas y devolvería la porción de diglicérido del fosfolípido nuevamente al aceite.

50 En un aspecto, la invención proporciona métodos que usan una PI-PLC de la invención en la fracción de goma. En un aspecto de este método, el aceite se añade al aceite bruto para crear una emulsión que da como resultado la mejora de la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol a la fase acuosa (desgomado con agua). Tras la centrifugación, estos fosfolípidos son componentes principales de la fracción acuosa de la goma. Los fosfolípidos en la fracción de goma se pueden tratar con fosfolipasa C o fosfolipasa D más fosfatasa (u otras combinaciones, señaladas más abajo) para general diacilglicerol (DAG) y un éster de fosfato. En este punto, el DAG se puede 55 extraer de los otros componentes de la goma y se puede tratar con una lipasa en condiciones adecuadas para la transesterificación del DAG para producir un triacilglicerol (lípido estructurado) deseado.

En otro aspecto, la mayor parte del 1,2-DAG se puede convertir en 1,3-DAG incrementando el pH de la goma tras la reacción de PLC, por ejemplo añadiendo materia cáustica. El 1,3-DAG se puede extraer entonces de la goma y se

puede hacer reaccionar con una lipasa en condiciones apropiadas para transesterificar el 1,3-DAG en la posición sn2 para crear el triacilglicerol estructurado deseado.

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

- 5 En un aspecto, los fosfolípidos procedentes del desgomado con agua se usan en combinación con una PLC descrita aquí para crear lípidos estructurados. El aceite desgomado con agua se puede exponer a una PLC y/o PLD (tanto una o ambas pueden ser enzimas descritas aquí) más fosfatasa, o una de estas combinaciones, seguido de PLA (puede ser una enzima descrita aquí) para reducir los niveles de fósforo hasta niveles adecuados para el refinado cáustico o físico.
- 10 En realizaciones alternativas, la combinación de enzimas que se puede usar en los métodos de la invención, incluyendo estos procedimientos de desgomado, incluyen (en el que una, varias o todas las enzimas en la combinación comprenden una enzima de la actual invención):
- O PLC + PI-PLC + PLA (PLA añadida tras terminar las reacciones de PLC);
 - O PLD + fosfatasa + PI-PLC, seguido de PLA; o
- 15 O PLC o (PLC + PI-PLC) + PLA específica para ácido fosfatídico (todas las enzimas se añaden juntas o secuencialmente).

Refinado cáustico

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

En un aspecto, una enzima fosfolipasa C de la invención hidroliza un fosfátido en un enlace de fosfoéster de glicerilo para generar un diglicérido y un compuesto de fosfato soluble en agua. El fosfátido hidrolizado se mueve a la fase acuosa, dejando el diglicérido en la fase oleosa, como se ilustra en la Figura 3. Un objetivo del "auxiliar de refinado cáustico" de PLC es convertir las gomas de fosfolípidos formadas durante la neutralización en un diacilglicérido que migrará nuevamente a la fase oleosa. Por el contrario, un objetivo del "auxiliar de desgomado de PLC" es reducir los fosfolípidos en el aceite bruto hasta un fósforo equivalente a menos de 10 partes por millón (ppm).

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

Una realización alternativa de la invención para ayudar a la fosfolipasa antes del refinado cáustico es expresar la fosfolipasa en una planta. En otra realización, la fosfolipasa se añade durante la trituración de la planta, semillas u otra parte de la planta. Como alternativa, la fosfolipasa se añade tras la trituración pero antes del refinado (es decir, en vasijas de contención). Además, la fosfolipasa se añade como un pretratamiento de refinado, con o sin ácido.

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

En otra realización de la invención, la fosfolipasa se añade tras el refinado cáustico (Figura 5). En un caso, la fosfolipasa se añade en un mezclador intenso o en un mezclador de retención, antes de la separación. Como alternativa, la fosfolipasa se añade tras la etapa de calentamiento. En otra realización, la fosfolipasa se añade en la etapa de centrifugación. En una realización adicional, la fosfolipasa se añade a la grasa para jabón. Como alternativa, la fosfolipasa se añade al agua de lavado. En otro caso, la fosfolipasa se añade durante las etapas de blanqueo y/o desodorizado.

En un aspecto, una enzima fosfolipasa, por ejemplo una fosfolipasa C, de la invención hidrolizará el fosfátido tanto de fosfolípidos hidratables como no hidratables en aceites brutos y desgomados neutralizados, antes del blanqueamiento y eliminación del olor. Los procedimientos de "refinado cáustico" ejemplares de la invención se ilustran en la Figura 4 y Figura 6. La Figura 4 incluye tiempos, temperatura y pHs ejemplares para mezclador estático (30 a 60 min., 50 a 60°C, pH 5 a 6,5) y mezclador de retención (3 a 10 min., 20 a 40°C). La enzima diana se puede aplicar como un producto de goteo en el procedimiento de neutralización cáustica existente, como se ilustra en la Figura 4. En este aspecto, la enzima no necesitará soportar niveles de pH extremos si se añade tras la adición de la materia cáustica. Como se ilustra en la Figura 6 (un procedimiento ejemplar de "carga frontal" de enzima), se puede usar cualquier fosfolipasa, incluyendo, por ejemplo, una fosfolipasa de la invención, tal como PLC, PI-PLC, PLB, PLA y/o PLC, en un procedimiento de desgomado de aceite bruto, como se describe, por ejemplo, en Bailey's Industrial Oil & Fat Products v.4 (ed. Y. H. Hui). La Figura 7 y la Figura 8 ilustran variaciones de métodos de la invención en las que se usan en el procedimiento dos o tres etapas de centrifugación, respectivamente, procedimiento el cual se puede usar para procesar cualquier aceite, por ejemplo un aceite vegetal tal como un aceite de soja bruto, como se muestra en la figura. El método ejemplar de la Figura 8 tiene una etapa de centrifugación antes del refinado cáustico (además de una etapa de centrifugación tras el refinado cáustico y antes del lavado con agua, y después del lavado con agua), mientras que el método ejemplar de la Figura 7 no tiene ninguna etapa de centrifugación antes del refinado cáustico. La Figura 9 ilustra otra variación ejemplar de este procedimiento que usa tratamiento ácido y que tiene una etapa de centrifugación antes de una etapa de desgomado; este procedimiento ejemplar se puede usar para procesar cualquier aceite, por ejemplo en un aceite vegetal tal como aceite de soja bruto, como se muestra en la figura.

En un aspecto, una fosfolipasa de la invención permite eliminar el fósforo hasta los niveles bajos aceptables en el refinado físico. En un aspecto, una PLC de la invención hidrolizará el fosfátido tanto de los fosfolípidos hidratables como de los no hidratables en aceites brutos antes del blanqueo y desodorización. La enzima diana se puede aplicar como un producto de aplicación inmediata en la operación de desgomado existente; véase, por ejemplo, la Figura 5. Dado el mezclamiento subóptimo en el equipo comercial, es probable que se necesitará ácido para poner en contacto los fosfolípidos no hidratables con la enzima en la interfaz aceite/agua. Por lo tanto, en un aspecto, se usa una PLC de la invención estable a ácidos.

En un aspecto, un procedimiento de auxiliar de desgomado de PLC de la invención puede eliminar pérdidas en una, o en las tres, áreas señaladas en la Tabla 4. Las pérdidas asociadas en un procedimiento de PLC se pueden estimar en aproximadamente 0,8% frente al 5,2% en base a la masa debido a la eliminación del fosfátido.

Tabla 4: Pérdidas apuntadas por los productos de PLC

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

Los beneficios potenciales adicionales de este procedimiento de la invención incluyen los siguientes:

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

Los aceites procesados (por ejemplo, "desgomado") mediante los métodos de la invención incluyen oleaginosas, por ejemplo aceite de soja, aceite de colza y aceite de girasol. En un aspecto, el "auxiliar del refinado cáustico de PLC" de la invención puede ahorrar 1,2% con respecto a los procedimientos de refinado cáustico existentes. La aplicación del auxiliar del refinado se dirige a aceite de soja que se ha desgomado para lecitina, y también se excluyen de los cálculos de valor/carga.

Las dianas de comportamiento de los procedimientos de la invención pueden variar según las aplicaciones, y más específicamente el punto de adición de enzima; véase la Tabla 5.

Tabla 5: Dianas de comportamiento mediante aplicación

ES 2 590 037 T3

	Auxiliar del refinado cáustico	Auxiliar del desgomado
Niveles entrantes de fósforo en aceite	<200 ppm*	600-1.400 ppm
Niveles finales de fósforo en aceite	<10 ppm †	<10 ppm
Gomas hidratables y no hidratables	Sí	Sí
Tiempo de residencia	3-10 minutos	30 minutos‡
Formulación líquida	Sí	Sí
pH diana	8-10‡‡‡	5,0-5,5‡‡
Temperatura diana	20-40°C	~50-60°C
Contenido de agua	<5%	1-1,25%
Pureza de la formulación enzimática	Sin lipasa/proteasa ¹	Sin lipasa/proteasa
Otros requisitos clave	Eliminación de Fe	Eliminación de Fe
<p>* Aceite desgomado con agua</p> <p>† Niveles diana logrados en la etapa de neutralización cáustica aguas arriba, pero se deben de mantener</p> <p>‡ 1-2 horas existente</p> <p>‡‡ El desgomado ácido requerirá una enzima que sea estable en condiciones mucho más ácidas: pH a 2,3 para ácido cítrico a 5% (~Roehm USPN 6.001.640).</p> <p>‡‡‡ El pH del aceite neutralizado NO es neutro. El ensayo en POS indica que el pH estará en el intervalo alcalino de 6,5-10 (9 de diciembre de 2002). Es necesario determinar el intervalo de pH típico.</p>		

Otros procedimientos que se pueden usar con una fosfolipasa de la invención, por ejemplo una fosfolipasa A₁, pueden convertir fosfolípidos nativos no hidratables en una forma hidratable. En un aspecto, la enzima es sensible al calor. Esto puede ser deseable, puesto que el calentamiento del aceite puede destruir la enzima. Sin embargo, la reacción de desgomado se debe ajustar a pH 4-5 y 60°C para adecuar esta enzima. A una dosis de saturación de aceite de 300 unidades/kg, este procedimiento ejemplar es útil llevando el contenido de fósforo en aceite previamente desgomado con agua hasta ≤10 ppm de P. Las ventajas pueden ser un menor contenido de H₂O y los ahorros resultantes en el uso, manipulación y desechos. La Tabla 6 enumera aplicaciones ejemplares para usos industriales para las enzimas de la invención:

5

10

Tabla 6: Aplicación ejemplar

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

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

15

En un procedimiento ejemplar, cuando la enzima se añade a y reacciona con un aceite bruto, la cantidad de fosfolipasa empleada es aproximadamente 10-10.000 unidades, o, como alternativa, aproximadamente 100-2.000

unidades, por 1 kg de aceite bruto. El tratamiento enzimático se lleva a cabo durante 5 minutos hasta 10 horas a una temperatura de 30°C a 90°C, o, como alternativa, aproximadamente 40°C a 70°C. Las condiciones pueden variar dependiendo de la temperatura óptima de la enzima. La cantidad de agua añadida para disolver la enzima es 5-1.000 partes en peso por 100 partes en peso de aceite bruto, o, como alternativa, aproximadamente 10 a 200 partes en peso por 100 partes en peso de aceite bruto.

Al terminar tal tratamiento enzimático, el líquido de la enzima se separa con un medio apropiado, tal como un separador centrífugo, y se obtiene el aceite procesado. Los compuestos que contienen fósforo, producidos mediante descomposición enzimática de sustancias gomosas en tal procedimiento, se transfieren prácticamente todos a la fase acuosa y se eliminan de la fase oleosa. Al terminar el tratamiento enzimático, si es necesario, el aceite procesado se puede lavar adicionalmente con agua o con ácido orgánico o inorgánico tal como, por ejemplo, ácido acético, ácido fosfórico, ácido succínico, y similar, o con disoluciones salinas.

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

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

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

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

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

En un aspecto, la invención también proporciona procedimientos que usan una fosfolipasa de la invención (por ejemplo, una fosfolipasa de la invención específica de fosfolipasa), u otra fosfolipasa, en un "procedimiento de refinado orgánico" modificado, que puede comprender la adición de la enzima (por ejemplo una PI-PLC) en un tanque de alojamiento de ácido nítrico.

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

comporta como un emulsionante.

Las enzimas y métodos de la invención se pueden usar en procedimientos para la reducción de componentes que contienen fósforo en aceites comestibles que comprenden una cantidad derivada de fósforo no hidratable, usando una fosfolipasa de la invención, por ejemplo un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa A y/o B, como se describe, por ejemplo, en la patente EP número: EP 0869167. En un aspecto, el aceite comestible es un aceite bruto, un aceite denominado "no desgomado". En un aspecto, el método trata un aceite no desgomado, incluyendo aceites prensados o aceites extraídos, o una mezcla de los mismos, de, por ejemplo, colza, soja, sésamo, cacahuete, maíz o girasol. El contenido de fosfátidos en un aceite bruto puede variar de 0,5 a 3% p/p, que corresponde a un contenido de fósforo en el intervalo de 200 a 1200 ppm, o en el intervalo de 250 a 1200 ppm. Aparte de los fosfátidos, el aceite bruto también puede contener pequeñas configuraciones de hidratos de carbono, compuestos de azúcar y compuestos ácidos de metal/fosfátido de Ca, Mg y Fe. En un aspecto, el procedimiento comprende el tratamiento de un fosfolípido o lisofosfolípido con la fosfolipasa de la invención para hidrolizar grupos acilo grasos. En un aspecto, el fosfolípido o lisofosfolípido comprende lecitina o lisolecitina. En un aspecto del procedimiento, el aceite comestible tiene un contenido de fósforo entre aproximadamente 50 y 250 ppm, y el procedimiento comprende tratar el aceite con una fosfolipasa de la invención para hidrolizar una parte principal del fosfolípido y separar una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado del aceite. En un aspecto, antes del procedimiento de desgomado enzimático, el aceite se desgoma con agua. En un aspecto, los métodos proporcionan la producción de un pienso para animales, que comprende mezclar la fosfolipasa de la invención con sustancias de pienso y al menos un fosfolípido.

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

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

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

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

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

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

la saturación de los soportes.

3) La dispersión de los aceites y grasas en forma de gotitas finas, en una disolución enzimática diluida, en aspectos alternativos que contienen entre aproximadamente 0,05 a 4%, o que contienen entre aproximadamente 0,2 a 4%, en volumen de una enzima de la invención. Esta técnica se describe, por ejemplo, en la patente belga nº 595.219. Una columna cilíndrica con una altura de varios metros, con tapa cónica, se llena con una disolución enzimática diluida. Para este fin, se escoge un disolvente que no es tóxico y no miscible en el aceite o grasa a procesar, preferiblemente agua. La parte inferior de la columna está equipada con un sistema de distribución en la que el aceite o grasa se inyecta de forma continua en una forma extremadamente dividida (aproximadamente 10.000 flujo por m²). De este modo, se forma un número infinito de gotitas de aceite o grasa, que se elevan lentamente en la disolución de enzimas y llegan a la superficie, evacuándose continuamente en la parte superior de la tapa cónica del reactor.

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

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

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

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. nº 6.162.623. En estos métodos ejemplares, la invención proporciona una enzima anfifílica. Se puede inmovilizar, por ejemplo preparando una emulsión que contiene una fase hidrófoba continua y una fase acuosa dispersa que contiene la enzima, y un soporte para la enzima, y eliminando agua de la fase dispersa hasta que esta fase se convierte en partículas revestidas con enzima sólidas. La enzima puede ser una lipasa. La lipasa inmovilizada se puede usar para reacciones catalizadas mediante lipasa, tales como interesterificación de mono-, di- o triglicéridos, desacidificación de un aceite triglicérido, o eliminación de fosfolípidos a partir de un aceite triglicérido cuando la lipasa es una fosfolipasa. La fase acuosa puede contener un líquido de fermentación, un aceite triglicérido comestible puede ser la fase hidrófoba, y los soportes incluyen azúcares, almidón, dextrano, derivados de celulosa solubles en agua, y restos de fermentación. Este método ejemplar se puede usar para procesar triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, glicerol, fosfolípidos o ácidos grasos, que pueden estar en la fase hidrófoba. En un aspecto, el procedimiento para la eliminación de fosfolípidos a partir de un aceite triglicérido comprende mezclar un aceite triglicérido que contiene fosfolípidos con una preparación que contiene una fosfolipasa de la invención; hidrolizar los fosfolípidos a lisofosfolípidos; separar los fosfolípidos hidrolizados del aceite, en el que la fosfolipasa es una fosfolipasa inmovilizada.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. nº 6.127.137. Este método ejemplar hidroliza ambos grupos acilo grasos en fosfolípido intacto. La fosfolipasa de la invención usada en estos métodos no tiene actividad de lipasa, y es activa a pH muy bajo. Estas propiedades la hacen muy adecuada para uso en el desgomado de aceites, ya que se pueden suprimir tanto la hidrólisis enzimática como alcalina (saponificación) del aceite. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para hidrolizar grupos acilo grasos en un fosfolípido o lisofosfolípido, que comprende tratar el fosfolípido o lisofosfolípido con la fosfolipasa que hidroliza ambos grupos acilo grasos en un fosfolípido y está esencialmente libre de actividad de fosfolipasa. En un aspecto, la fosfolipasa de la invención tiene un óptimo de temperatura a aproximadamente 50°C, medido a pH 3 a pH 4 durante 10 minutos, y un pH óptimo de aproximadamente pH 3, medido a 40°C durante aproximadamente 10 minutos. En un aspecto, el fosfolípido o lisofosfolípido comprende lecitina o lisolecitina. En un aspecto, después de hidrolizar una parte

importante del fosfolípido, se separa del aceite una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para eliminar fosfolípido de un aceite comestible, que comprende tratar el aceite a pH 1,5 a 3 con una dispersión de una disolución acuosa de la fosfolipasa de la invención, y separar del aceite una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado. En un aspecto, el aceite se trata para eliminar mucílago antes del tratamiento con la fosfolipasa. En un aspecto, el aceite antes del tratamiento con la fosfolipasa contiene el fosfolípido en una cantidad correspondiente a 50 a 250 ppm de fósforo. En un aspecto, el tratamiento con fosfolipasa se realiza a 30°C a 45°C durante 1 a 12 horas a una dosis de fosfolipasa de 0,1 a 10 mg/l en presencia de 0,5 a 5% de agua.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. n° 6.025.171. En este método ejemplar las enzimas de la invención se inmovilizan preparando una emulsión que contiene una fase hidrófoba continua, tal como un aceite triglicérido, y una fase acuosa dispersa que contiene una enzima anfífila, tal como lipasa o una fosfolipasa de la invención, y material soporte que se disuelve parcialmente o está parcialmente sin disolver en la fase acuosa, y eliminando agua de la fase acuosa hasta que la fase se convierte en partículas de soporte revestidas con enzima sólidas. La parte sin disolver del material soporte puede ser un material que es insoluble en agua y en aceite, o un material soluble en agua en forma no disuelta debido a que la fase acuosa ya está saturada con el material soluble en agua. La fase acuosa se puede formar con un líquido de fermentación de lipasa bruta que contiene restos de fermentación y biomasa que pueden servir como materiales soporte. La lipasa inmovilizada es útil para el reordenamiento y desacidificación de ésteres en aceites. Tras una reacción, la enzima inmovilizada se puede regenerar para una reacción subsiguiente añadiendo agua para obtener una disolución parcial del soporte, y con la enzima resultante y la fase acuosa que contiene el soporte dispersas en una fase hidrófoba evaporando agua para nuevamente formar partículas de soporte revestidas con enzima.

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

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

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. n° 5.264.367. El contenido de componentes que contienen fósforo y el contenido de hierro de un aceite vegetal o animal comestible, tal como un aceite, por ejemplo

aceite de soja, que se ha refinado en húmedo para eliminar mucílago, se reducen mediante descomposición enzimática poniendo en contacto el aceite con una disolución acuosa de una enzima, por ejemplo una fosfolipasa A1, A2, o B, y separando entonces la fase acuosa del aceite tratado. En un aspecto, la invención proporciona un método enzimático para disminuir el contenido de componentes que contienen fósforo y hierro en aceites, que se han refinado para eliminar mucílago. Un aceite, que se ha refinado para eliminar mucílago, se puede tratar con una enzima de la invención, por ejemplo fosfolipasa C, A1, A2, o B. Se pueden lograr contenidos de fósforo por debajo de 5 ppm, y contenidos de hierro por debajo de 1 ppm. El bajo contenido de hierro puede ser ventajoso para la estabilidad del aceite.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para preparar aceites transesterificados, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. n° 5.288.619. La invención proporciona métodos para la transesterificación enzimática para preparar un aceite de margarina que tiene tanto un contenido bajo de ácido trans como un contenido bajo de ácido graso de cadena intermedia. El método incluye las etapas de proporcionar una mezcla de reacción de transesterificación que contiene un material fuente de ácido esteárico y un aceite vegetal líquido comestible, transesterificar el material fuente de ácido esteárico y el aceite vegetal usando una lipasa específica de las posiciones 1, 3, y finalmente hidrogenar entonces la mezcla de ácidos grasos para proporcionar un material fuente de ácido graso reciclado para una reacción de reciclaje con el aceite vegetal. La invención también proporciona un método en contracorriente para preparar un aceite transesterificado. El método incluye las etapas de proporcionar una zona de reacción de transesterificación que contiene una lipasa específica de las posiciones 1, 3, introducir un aceite vegetal en la zona de transesterificación, introducir un material fuente de ácido esteárico, conducir un fluido en contracorriente de gas supercrítico o de gas licuado subcrítico, llevar a cabo una reacción de transesterificación de la corriente de triglicérido con la corriente de ácido esteárico o monoéster de ácido esteárico en la zona de reacción, extraer una corriente de aceite de margarina triglicérido transesterificado, extraer una fase fluida en contracorriente, hidrogenar el ácido esteárico o monoéster de ácido esteárico transesterificado para proporcionar un material fuente de ácido esteárico reciclado hidrogenado, e introducir el material fuente de ácido esteárico reciclado hidrogenado en la zona de reacción.

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

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

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

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

la reacción transcurre en etapas, esto también abre la posibilidad de ajustar diferentes valores de pH en las etapas individuales. Por ejemplo, en la primera etapa, el pH de la disolución se puede ajustar a 7, por ejemplo, y en una segunda etapa a 2,5, añadiendo ácido cítrico. Sin embargo, en al menos una etapa, el pH de la disolución enzimática debe estar por debajo de 4, o por debajo de 3. Si el pH se ajusta subsiguientemente por debajo de este nivel, se puede encontrar un deterioro del efecto. Por lo tanto, el ácido cítrico se puede añadir a la disolución enzimática antes de que ésta última se mezcle en el aceite.

Tras terminar el tratamiento enzimático, la disolución enzimática, junto con los productos de descomposición del NHP contenido en ella, se puede separar de la fase oleosa, por lotes o de forma continua, por ejemplo por medio de centrifugación. Puesto que las enzimas se caracterizan por un nivel elevado de estabilidad, y la cantidad de los productos de descomposición contenidos en la disolución es pequeña (pueden precipitar como lodo), la misma fase enzimática acuosa se puede usar varias veces. También existe la posibilidad de liberar la enzima del lodo, véase, por ejemplo, el documento DE-A 4339556, de manera que se puede usar nuevamente una disolución enzimática que está esencialmente libre de lodo. En un aspecto de este procedimiento de desgomado, se obtienen aceites que contienen menos de 15 ppm de fósforo. Un objetivo son contenidos de fósforo menores de 10 ppm, o menores de 5 ppm. Con contenidos de fósforo por debajo de 10 ppm, es fácilmente posible el procesamiento adicional del aceite según el procedimiento de desacidificación destilativa. Un número de otros iones, tales como magnesio, calcio, cinc, así como hierro, se puede eliminar del aceite, por ejemplo por debajo de 0,1 ppm. De este modo, este producto posee prerrequisitos ideales para una buena resistencia a la oxidación durante el procesamiento y almacenamiento posteriores.

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

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

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

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

desodorizar, o se puede blanquear y refinar físicamente.

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

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para el desgomado de aceites vegetales como se describe, por ejemplo, Buchold, et al., Frankfurt/Main, Alemania. Fett Wissenschaft Technologie (1993), 95(8), 300-304. En este procedimiento ejemplar de la invención para el desgomado de aceites vegetales comestibles, se usan suspensiones acuosas de una enzima de la invención, por ejemplo fosfolipasa A2, para hidrolizar el ácido graso unido a la posición sn2 del fosfolípido, dando como resultado 1-acil-lisofosfolípidos que son insolubles en aceite y de este modo más susceptibles a la separación física. Incluso la adición de pequeñas cantidades correspondientes a aproximadamente 700 unidades de lecitasa/kg de aceite da como resultado una concentración residual de P menor que 10 ppm, de manera que el refinado químico es sustituible por el refinado físico, eliminando la necesidad de neutralización, división de la grasa para jabón, y tratamiento con agua de desecho.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para el desgomado de aceites vegetales como se describe, por ejemplo, por EnzyMax. Dahlke, Klaus. Dept. G-PDO, Lurgi Ol-Gas, Chemie, GmbH, Frankfurt, Alemania. Oleagineux, Corps Gras, Lipides (1997), 4(1), 55-57. Este procedimiento ejemplar es un procedimiento de desgomado para el refinado físico de casi cualquier tipo de aceite. Mediante una hidrólisis catalizada enzimáticamente, los fosfatidos se convierten en lisofosfatidos solubles en agua, que se separan del aceite mediante centrifugación. El contenido de fósforo residual en el aceite desgomado enzimáticamente puede ser tan bajo como 2 ppm de P.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para el desgomado de aceites vegetales como se describe, por ejemplo, por Cleenewerck, et al., N.V. Vamo Mills, Izegem, Belg. Fett Wissenschaft Technologie (1992), 94:317-22; y Clausen, Kim; Nielsen, Munk. Novozymes A/S, Den. Dansk Kemi (2002) 83(2):24-27. Las fosfolipasas y métodos de la invención pueden incorporar el refinado previo de aceites vegetales con ácidos como se describe, por ejemplo, por Nilsson-Johansson, et al., Fats Oils Div., Alfa-Laval Food Eng. AB, Tumba, Swed. Fett Wissenschaft Technologie (1988), 90 (11), 447-51; y Munch, Ernst W. Cereol Deutschland GmbH, Mannheim, Alemania. Editore(s): Wilson, Richard F. Proceedings of the World Conference on Oilseed Processing Utilization, Cancun, Mexico, Nov. 12-17, (2001), Meeting Date 2000, 17-20.

Las fosfolipasas y métodos de la invención también se pueden usar para el desgomado de aceites vegetales como se describe, por ejemplo, por Jerzewska, et al., Inst. Przemyslu Miesnego i Tluszczowego, Warsaw, Pol., Tluszcz Jadalne (2001), 36(3/4), 97-110. En este procedimiento de la invención, el desgomado enzimático de aceite de colza hidratado con bajo contenido de ácido erúico es mediante el uso de una fosfolipasa A2 de la invención. La enzima puede catalizar la hidrólisis de enlaces de éster de ácido graso al átomo de carbono central del resto de glicerol en fosfolípidos. Puede hidrolizar fosfolípidos no hidratables a sus lisocompuestos hidratables correspondientes. Con una preparación enzimática no purificada, se pueden lograr mejores resultados con la adición de una preparación del 2% durante 4 horas (87% de eliminación de P).

En otro procedimiento ejemplar de la invención para el desgomado de aceite (o un procedimiento de desgomado de aceite que usa una enzima de la invención), se añade un polímero ácido, por ejemplo un alginato o pectina. En este procedimiento de desgomado de aceite de la invención, se añade un polímero ácido (por ejemplo, ácido algínico o pectina, o una forma salina más soluble) al aceite bruto con una cantidad baja de agua (por ejemplo, en un intervalo de entre aproximadamente 0,5 y 5%). En este aspecto, los polímeros ácidos pueden reducir y/o destruir complejos de fosfolípido-metal mediante la unión de calcio y/o magnesio en el aceite bruto, mejorando de ese modo la solubilidad de los fosfolípidos no hidratables. En aspectos alternativos, estos fosfolípidos se moverán a la interfaz aceite/agua o entrarán en la fase acuosa y se convertirán en diacilglicerol, y la cadena lateral correspondiente o el fosfolípido intacto se eliminarán mediante centrifugación subsiguiente como un componente de la fase pesada. La presencia del polímero ácido en la fase acuosa puede incrementar también la densidad de la fase acuosa, y puede dar como resultado una separación mejorada de la fase pesada a partir de la fase oleosa (ligera).

Un procedimiento ejemplar de la invención para el desgomado de aceite (o un procedimiento de desgomado de aceite que usa una enzima de la invención) altera el procedimiento de desodorización para obtener una fracción de diacilglicerol (DAG). En aspecto alternativo, si es necesario o se desea, tras el desgomado asistido por enzimas, las condiciones de desodorización (temperatura, presión, configuración del aparato de destilación) se pueden modificar con el objetivo de mejorar la separación de los ácidos grasos libres (FFA) de la fracción de

diacilglicerol/triacilglicerol, o se pueden modificar adicionalmente para separar el diacilglicerol de la fracción de triacilglicerol. Como resultado de estas modificaciones, usando este método de la invención, es posible obtener FFA y diacilglicerol de grado alimentario si se usa una enzima de la invención (por ejemplo, una fosfatasa, o una PLC, o una combinación de PLC y fosfatasas) para desgomar aceite comestible en un procedimiento de refinado físico.

5 En diversos aspectos, la práctica de los métodos de la invención como se describen aquí (o el uso de las enzimas de la invención) tiene ventajas tales como: disminuye o elimina el disolvente y la recuperación del disolvente; reduce los costes de capital; disminuye los costes del refinado aguas abajo, disminuye el uso de sustancias químicas, equipo, tiempo de procesamiento, energía (calor) y uso de agua/generación de aguas de desecho; produce aceite de mayor calidad; el aceite prensado por el expulsor se puede usar sin refinar en algunas aplicaciones de cocción y salteado (este aceite prensado puede tener características superiores de estabilidad, color y olor, y un contenido elevado de tocoferol); produce harina de mayor calidad; produce un menor contenido de grasa en la harina (actualmente, la harina que sale de la prensa mecánica provoca problemas de digestión en rumiantes); produce atributos nutricionales mejorados – niveles reducidos de glucosinolatos, taninos, sinapina, ácido fítico (como se describe, por ejemplo, en Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils, AOCS 1997).

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

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

40 Procesamiento enzimático de oleaginosas

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

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

60 En aspectos alternativos, los procedimientos de la invención se pueden poner en práctica con procedimientos de extracción acuosos. Los métodos de extracción acuosos pueden ser de tecnologías alternativas medioambientalmente más limpias para la extracción de aceite. Los rendimientos bajos de extracción de procedimientos acuosos se pueden superar usando enzimas que hidrolizan los polisacáridos estructurales que forman la pared celular de oleaginosas, o que hidrolizan las proteínas que forman las membranas del cuerpo

lipídicas y celulares, por ejemplo utilizando digestiones que comprenden celulasa, hemicelulasa, y/o protopectinasa para la extracción de aceite a partir de células de soja. En un aspecto, los métodos se pueden poner en práctica con una enzima de la invención como se describe por Kasai (2003) *J. Agric. Food Chem.* 51:6217-6222, que dio a conocer que la enzima más eficaz para digerir la pared celular fue celulasa.

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

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

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

Purificación de fitosteroles a partir de aceites vegetales

- La invención proporciona métodos para purificar fitosteroles y triterpenos, o esteroides vegetales, a partir de aceites vegetales. Los fitosteroles que se pueden purificar usando fosfolipasas y métodos de la invención incluyen β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, estigmastanol β -sitostanol, sitostanol, desmosterol, calinasterol, poriferasterol, clonasterol y brasicasterol. Los esteroides vegetales son productos agrícolas importantes para las industrias de la salud y de la nutrición. De este modo, las fosfolipasas y métodos de la invención se usan para obtener emulsionantes para fabricantes cosméticos e intermedios esteroideos y precursores para la producción de fármacos hormonales. Las fosfolipasas y métodos de la invención se usan para obtener (por ejemplo, purificar) análogos de fitosteroles y sus ésteres para uso como agentes reductores de colesterol con beneficios sanitarios cardiológicos. Las fosfolipasas y métodos de la invención se usan para purificar esteroides vegetales para reducir los niveles séricos de colesterol inhibiendo la absorción de colesterol en la luz intestinal. Las fosfolipasas y métodos de la invención se usan para purificar esteroides vegetales que tienen propiedades inmunomoduladoras a concentraciones extremadamente bajas, incluyendo respuesta celular potenciada de linfocitos T, y la capacidad citotóxica de células asesinas naturales contra una estirpe celular de cáncer. Las fosfolipasas y métodos de la invención se usan para purificar esteroides vegetales para el tratamiento de tuberculosis pulmonar, artritis reumatoide, manejo de pacientes infectados con VIH, e inhibición de estrés inmunitario, por ejemplo en corredores de maratón.

- Las fosfolipasas y métodos de la invención se usan para purificar componentes de esteroides presentes en las fracciones de esteroides de aceites vegetales de primera necesidad (por ejemplo, aceites de coco, cáñola, manteca de cacao, maíz, algodón, lino, oliva, palma, cacahuete, salvado de arroz, alazor, sésamo, soja, girasol), tales como sitosterol (40,2-92,3%), campesterol (2,6-38,6%), estigmasterol (0-31%) y 5-avenasterol (1,5-29%).

- Los métodos de la invención pueden incorporar el aislamiento de esteroides derivados de plantas en oleaginosas mediante extracción con disolventes con cloroformo-metanol, hexano, cloruro de metileno, o acetona, seguido de la saponificación y purificación cromatográfica para obtener esteroides totales enriquecidos. Como alternativa, las muestras vegetales se pueden extraer mediante extracción con fluido supercrítico con dióxido de carbono

- 5 supercrítico, para obtener extractos lipídicos totales a partir de los cuales se pueden enriquecer y aislar los esteroides. Para la caracterización y cuantificación subsiguientes de los compuestos de esteroles, el aislado bruto se puede purificar y separar mediante una amplia variedad de técnicas cromatográficas, incluyendo cromatografía en columna (CC), cromatografía de gases, cromatografía de capa fina (TLC), cromatografía de líquidos de altas prestaciones (HPLC) de fase normal, HPLC de fase inversa, y electrocromatografía capilar. De todas las técnicas de aislamiento y separación cromatográficas, los procedimientos de CC y TLC emplean los ensayos más accesibles, asequibles y adecuados para la limpieza, purificación de muestras, ensayos cualitativos y estimados preliminares de los esteroides en muestras de ensayo.
- 10 Los fitosteroides se pierden en los aceites vegetales como subproductos durante los procedimientos de refinado de aceites comestibles. Las fosfolipasas y métodos de la invención usan fitosteroides aislados de tales subproductos para obtener productos enriquecidos en fitosteroides aislados a partir de tales subproductos. Los métodos de aislamiento y purificación de fitosteroides de la invención pueden incorporar subproductos de la industria del procesamiento de aceites, y pueden comprender operaciones tales como destilación molecular, extracción líquido-líquido y cristalización.
- 15 Los métodos de la invención pueden incorporar procedimientos para la extracción de lípidos para extraer fitosteroides. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden usar disolventes no polares como hexano (usado habitualmente para extraer la mayoría de los tipos de aceites vegetales) para extraer cuantitativamente fitosteroides libres y ésteres de ácidos grasos fitosterófilos. Los glucósidos esterófilos y los glucósidos esterófilos acilados grasos se extraen sólo parcialmente con hexano, y el incremento de la polaridad del disolvente da un mayor porcentaje de extracción. Un procedimiento que se puede usar es el método de cloroformo-metanol de Bligh y Dyer para la extracción de todas las clases de lípidos de esteroles, incluyendo fosfolípidos. Un método ejemplar tanto para separar cualitativamente como para analizar cuantitativamente las clases de lípidos de fitosteroides comprende la inyección del extracto lipídico en el sistema de HPLC.
- 20
- 25 Las fosfolipasas y métodos de la invención se pueden usar para eliminar esteroides de grasas y aceites, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. nº 6.303.803. Este es un método para reducir el contenido de esteroles de las grasas y aceites que contienen esteroides. Es un procedimiento eficiente y eficaz desde el punto de vista del coste, basado en la afinidad del colesterol y otros esteroides por moléculas anfipáticas que forman bicapas fluidas hidrófobas, tales como bicapas fosfolipídicas. Los agregados de fosfolípidos se ponen en contacto, por ejemplo, con una grasa o aceite que contiene esteroles en un medio acuoso, y después se mezclan. La estructura molecular de esta mezcla fosfolipídica agregada tiene una elevada afinidad por el colesterol y otros esteroides, y puede eliminar selectivamente tales moléculas de grasas y aceites. La mezcla de separación acuosa se mezcla durante un tiempo suficiente para reducir selectivamente el contenido de esteroles del producto graso/oleoso a través del reparto del esteroles en la porción de los agregados fosfolipídicos. La grasa o aceite con un contenido reducido de esteroles se separa de la mezcla de separación acuosa. Como alternativa, la fracción correspondientemente enriquecida en esteroles también se puede aislar de la mezcla de separación acuosa. Estas etapas se pueden llevar a cabo a temperaturas ambientales, los costes implicados en el calentamiento se minimizan, así como la posibilidad de degradación térmica del producto. Adicionalmente, se necesita una cantidad mínima de equipo, y puesto que todos los materiales requeridos son de grado alimentario, los métodos no requieren precauciones especiales con respecto a la manipulación, eliminación de desechos, o contaminación del producto o productos finales.
- 30
- 35
- 40 Las fosfolipasas y métodos de la invención se pueden usar para eliminar esteroides de grasas y aceites, como se describe, por ejemplo, en la patente U.S. nº 5.880.300. Los agregados fosfolipídicos se ponen en contacto con, por ejemplo, grasa o aceite que contiene esteroles en un entorno acuoso, y después se mezclan. Tras el mezclado adecuado, la grasa o aceite con contenido reducido de esteroles se separa de la mezcla de separación acuosa. Como alternativa, el fosfolípido correspondientemente enriquecido en esteroles también se puede aislar de la mezcla de separación acuosa. Los aceites de plantas (por ejemplo, vegetales) contienen esteroides vegetales (fitosteroides) que también se pueden eliminar usando los métodos de la presente invención. Este método es aplicable a un producto graso/oleoso en cualquier etapa de un ciclo de procesamiento comercial. Por ejemplo, el procedimiento de la invención se puede aplicar a aceites refinados, blanqueados y desodorizados ("aceites RBD"), o a cualquier etapa del procesamiento antes de lograr el estado de RBD. Aunque el aceite RBD puede tener una densidad alterada en comparación con el aceite pre-RBD, los procedimientos se adaptan fácilmente a aceites RBD o pre-RBD, o a diversos otros productos grasos/oleosos, mediante variación del contenido de fosfolípidos, composición de fosfolípidos, relaciones fosfolípido:agua, temperatura, presión, condiciones de mezclado, condiciones de separación, como se describe más abajo.
- 45
- 50
- 55 Como alternativa, las enzimas y métodos de la invención se pueden usar para aislar fitosteroides u otros esteroides en etapas intermedias en el procesamiento de aceites. Por ejemplo, se sabe que los fitosteroides se pierden durante la desodorización de los aceites vegetales. Una fracción de destilado que contiene esteroles, procedente por ejemplo de una etapa intermedia del procesamiento, se puede someter a los procedimientos de extracción de esteroles descritos anteriormente. Esto proporciona una lecitina enriquecida en esteroles u otro material fosfolipídico, que se puede procesar posteriormente a fin de recuperar los esteroides extraídos.
- 60 Composiciones detergentes

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

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

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

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

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

Tratamiento de desechos

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

Destoxificación

Las fosfolipasas (por ejemplo, las PI-PLCs de la invención) se pueden utilizar en procesos de detoxificación, por ejemplo, para la detoxificación de endotoxinas, por ejemplo, composiciones que comprenden lipopolisacáridos (LPS), y, la invención proporciona procesos de detoxificación utilizando al menos una enzima de la invención, por ejemplo, un polipéptido que comprende una secuencia según se establece en la SEQ ID NO: 6 y que tiene una o más mutaciones según se establece en las Tablas 12 a 15, o un fragmento enzimáticamente activo del mismo.

En un aspecto, una fosfolipasa de la invención se utiliza para detoxificar un lipopolisacárido (LPS). En un aspecto, esta detoxificación es mediante la desacilación de cadenas de ácidos grasos 2' y/o 3' del lípido A. En un aspecto, una fosfolipasa (por ejemplo, una PI-PLC) de la invención se utiliza para hidrolizar una cadena 2'-lauroílo y/o una cadena 3'-miristoílo de un lípido, por ejemplo, un lípido A (por ejemplo, de una endotoxina bacteriana). En un aspecto, el proceso de la invención se utiliza para destruir una endotoxina, por ejemplo, una toxina de una bacteria gramnegativa, como de *E. coli*. En un aspecto, una fosfolipasa (por ejemplo, una PI-PLC) de la invención se utiliza para mitigar los efectos del envenenamiento por toxina (por ejemplo, de una infección gramnegativa en curso), o, para prevenir profilácticamente los efectos de la endotoxina durante una infección (por ejemplo, una infección en un animal o un ser humano). Consecuentemente, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una fosfolipasa (por ejemplo, PI-PLC) de la invención, y un método que utiliza una hidrolasa de la invención, para la mitigación o prevención de los efectos tóxicos de los lipopolisacáridos (LPS), por ejemplo, durante la septicemia.

Procesamiento de alimentos

Las fosfolipasas de la invención se pueden utilizar para procesar alimentos, por ejemplo, para cambiar su estabilidad, durabilidad, sabor, textura, mejorar su estado nutricional, y similares. Por ejemplo, en un aspecto, las fosfolipasas de la invención se utilizan para generar fosfolípidos ácidos para controlar el sabor amargo en los alimentos.

En un aspecto, la invención proporciona procesos de fabricación de queso utilizando las fosfolipasas de la invención (y, de esta manera, la invención también proporciona quesos que comprenden fosfolipasas de la invención). En un aspecto, las enzimas de la invención (por ejemplo, fosfolipasa A, lisofosfolipasa o una combinación de las mismas) se utilizan para procesar quesos para el realce del sabor, para incrementar el rendimiento y/o para “estabilizar” los quesos, por ejemplo, reduciendo la tendencia a “desaceitarse”, o, en un aspecto, las enzimas de la invención se utilizan para producir queso a partir de leche de quesería. Estos procesos de la invención pueden incorporar cualquier método o protocolo, por ejemplo, como se describe por ejemplo, en las Patentes U.S. nos 6.551,635, y 6.399.121, WO 03/070013, WO 00/054601. Por ejemplo, en un aspecto, las fosfolipasas de la invención se utilizan para estabilizar la emulsión de grasa en la leche o composiciones que comprenden leche, por ejemplo la crema, y se utilizan para estabilizar las composiciones de leche, por ejemplo para la fabricación de crema o licores de crema. En un aspecto, la invención proporciona un proceso para mejorar el sabor de un queso utilizando al menos una enzima de la invención, comprendiendo el proceso incubar una proteína, una grasa y una lipasa en un medio acuoso bajo condiciones que producen un sabor mejorado del queso (por ejemplo, amargura reducida), por ejemplo, como se describe en WO 99/66805. En un aspecto, las fosfolipasas de la invención se utilizan para mejorar el sabor en un queso (por ejemplo, una cuajada) mediante el meclamiento con agua, una proteasa, y una lipasa (de la invención) a una temperatura elevada, por ejemplo, entre aproximadamente 75°C a 95°C, según se describe, por ejemplo, en la Patente U.S. n° 4.752.483. En un aspecto, las fosfolipasas de la invención se utilizan para acelerar el envejecimiento del queso añadiendo una enzima de la invención (por ejemplo, una lipasa o una fosfolipasa) a un queso (por ejemplo, una leche de quesería) antes de añadir un coagulante a la leche, o, añadiendo una enzima de la invención a una cuajada con sal antes del prensado, por ejemplo, como se describe, por ejemplo, en la Patente U.S. n° 4.707.364. En un aspecto, una lipasa de la invención se utiliza para degradar un triglicérido en la grasa de la leche para liberar los ácidos grasos libres, dando como resultado una mejora del sabor. Una proteasa también se puede utilizar en cualquiera de estos procesos de la invención, véase, por ejemplo, Brindisi (2001) J. of Food Sci. 66:1100-1107. En otro aspecto, una combinación de esterases, lipasas, fosfolipasas y/o proteasas se puede utilizar en éstos o cualquier proceso de la invención.

En un aspecto, una fosfolipasa de la invención se utiliza para reducir el contenido de componentes de fósforo en un alimento, por ejemplo, un aceite, tal como un aceite vegetal que tiene un alto contenido de fósforo no hidratable, por ejemplo, según se describe en WO 98/26057.

Conversión de biomasa y producción de biocombustibles limpios

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

de lisofosfolipasa (LPL), o una actividad de fosfolipasa y de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o una actividad de fosfolipasa y de lisofosfolipasa (LPL) y una actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o actividad de patatina, o una combinación de las mismas.

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

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

20 La invención proporciona métodos, enzimas y mezclas de enzimas o “cócteles” para procesar un material, por ejemplo un material biomásico, que comprende un celooligosacárido, un oligómero de arabinosilano, una lignina, una lignocelulosa, un xilano, un glucano, una celulosa y/o un azúcar fermentable, que comprenden poner en contacto la composición con un polipéptido de la invención, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la invención, en el que opcionalmente el material deriva de una cosecha agrícola (por ejemplo, trigo, cebada, patatas, panizo de pradera, madera de álamo), es un subproducto de una producción de alimentos o de piensos, es un producto residual lignocelulósico, o es un residuo vegetal o un papel residual o un producto de papel residual, y
25 opcionalmente el residuo vegetal comprende tallos, hojas, vainas, cáscaras, maíz o mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, fibra de maíz, heno, paja (por ejemplo paja de arroz o paja de trigo), bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha, pulpa de cítrico, y pieles de cítricos, madera, lascas de madera, virutas de madera, pasta maderera, residuo de pasta, residuo maderero, astillas de madera y serrín, residuos y restos de construcción y/o de demolición (por ejemplo madera, virutas de madera y serrín), y opcionalmente el residuo papelerero comprende papel de fotocopia descargado o usado, papel de impresora de ordenador, papel de agenda, papel de bloc de notas, papel de máquina de escribir, periódicos, revistas, cartón y materiales de envasado a base de papel, y materiales de papel reciclado. Además, se pueden usar desechos urbanos, por ejemplo la fracción papelerera de residuos sólidos municipales, residuos madereros municipales, y residuos vegetales municipales, junto con otros materiales que contienen azúcar, almidón, y/o celulosa. En aspectos alternativos, el procesamiento del material, por ejemplo el
30 material biomásico, genera un bioalcohol, por ejemplo un bioetanol, un biometanol, biobutanol o biopropanol.

Como alternativa, el polipéptido de la invención se puede expresar en el material vegetal biomásico o en la propia materia prima.

40 Los métodos de la invención también incluyen coger una biomasa o material vegetal procesado o “convertido” (por ejemplo, mediante un procedimiento que comprende el uso de una enzima de esta invención), por ejemplo un material que comprende lípidos o un material lignocelulósico (procesado, por ejemplo, mediante enzimas de la invención) y convertirlo en un combustible (por ejemplo un bioalcohol, por ejemplo un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel) mediante fermentación (por ejemplo, mediante levadura) y/o mediante síntesis química. En un aspecto, los azúcares producidos se fermentan, y/o los productos no fermentables se gasifican.

45 Los métodos de la invención también incluyen convertir algas, aceite vegetal tal como aceites vegetales vírgenes o aceites vegetales residuales, grasas animales y grasas (por ejemplo sebo, manteca, y grasa amarilla), o aguas residuales, usando enzimas de la invención, y convertirlos en un combustible (por ejemplo, un bioalcohol, por ejemplo un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel) mediante fermentación y/o mediante síntesis o conversión química.

50 Las enzimas de la invención (incluyendo, por ejemplo, organismos tales como microorganismos, por ejemplo hongos, levaduras o bacterias, que fabrican y por ejemplo segregan enzimas recombinantes) se pueden usar en o se pueden incluir/integrar en cualquier etapa en cualquier procedimiento de conversión de biomasa, por ejemplo en una etapa cualquiera, varias etapas, o se pueden incluir en todas las etapas, o todos los siguientes métodos de procedimientos de conversión de biomasa, o todas estas alternativas de biocombustible:

55 ■ Combustión directa: la combustión de material por calor directo, y es la tecnología de biomasa más simple; puede ser muy económica si la fuente de biomasa está próxima.

■ Pirólisis: es la degradación térmica de la biomasa por calor en ausencia de oxígeno. La biomasa se puede calentar hasta una temperatura entre aproximadamente 800 y 1400 grados Fahrenheit, pero no se introduce oxígeno para apoyar la combustión, dando como resultado la creación de gas, fueloil y carbón.

■ **Gasificación:** la biomasa se puede usar para producir metano a través del calentamiento o digestión anaerobia. Se puede derivar de la biomasa un Syngas, una mezcla de monóxido de carbono e hidrógeno.

5 ■ **Gas de vertedero:** es generado por la descomposición (digestión anaerobia) de basura enterrada en vertederos. Cuando el residuo orgánico se descompone, genera gas que consiste en aproximadamente 50% de metano, el componente principal de gas natural.

■ **Digestión anaerobia:** convierte materia orgánica en una mezcla de metano, el componente principal de gas natural, y dióxido de carbono. En un aspecto, la biomasa tal como agua residual (aguas de cloaca), estiércol, o residuo del procesamiento de alimentos, se mezcla con agua y se alimenta en un tanque digestor sin aire.

■ **Fermentación**

10 ■ **Fermentación alcohólica:** el alcohol de combustible se produce convirtiendo masa celulósica y/o almidón en azúcar, fermentando el azúcar hasta alcohol, separando después por destilación la mezcla de agua y alcohol. Las materias primas tales como cosechas dedicadas (por ejemplo, trigo, cebada, patatas, panizo de pradera, madera de álamo), residuos o restos agrícolas (por ejemplo, paja de arroz, rastrojo de maíz, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, cáscaras de arroz, fibra de maíz, pulpa de remolacha, pulpa de cítrico, y pieles de cítricos), residuos de bosques (por ejemplo, lascas de maderas duras y maderas blandas, residuos de maderas duras y de maderas blandas procedentes de operaciones de la madera, virutas de madera, y serrín), residuos urbanos (por ejemplo, fracción de papel de residuos sólidos municipales, residuo maderero municipal, residuos vegetales municipales), residuos madereros (por ejemplo residuo de aserradero, residuo de molienda de pasta maderera, residuo de construcción, residuo de demolición, lascas de madera, y serrín), virutas y papel residual u otros materiales que contienen azúcar, almidón, y/o celulosa se pueden convertir en azúcares, y después en alcohol mediante fermentación con levadura. Como alternativa, los materiales que contienen azúcares se pueden convertir directamente en alcohol mediante fermentación.

25 ■ **Transesterificación:** Una reacción ejemplar para convertir aceite en biodiésel se denomina transesterificación. El procedimiento de transesterificación hace reaccionar un alcohol (como metanol) con los aceites triglicéridos contenidos en aceites vegetales, grasas animales, o grasas recicladas, formando ésteres alquílicos de ácidos grasos (biodiésel) y glicerina. La reacción requiere calor y un catalizador de base fuerte, tal como hidróxido de sodio o hidróxido de potasio.

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

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

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

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

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

55 Las enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o “cócteles” de la invención, también se pueden utilizar en el refinado de glicerina. El subproducto de glicerina contiene jabones y catalizador no reaccionado que se neutralizan con un ácido. El agua y el alcohol se eliminan para producir 50% a 80% de glicerina bruta. Los contaminantes restantes incluyen grasas y aceites no reaccionados, que pueden ser procesados utilizando los polipéptidos de la invención. En una planta grande de biodiésel de la invención, la glicerina se puede purificar adicionalmente, por ejemplo, a una pureza del 99% o más, para las industrias farmacéutica y cosmética.

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

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

En una realización, las enzimas, incluyendo la mezcla de enzimas o “cócteles” de la invención, y los métodos de la invención se pueden usar junto con medios más “tradicionales” para obtener etanol, metanol, propanol, butanol, propanol y/o diésel a partir de biomasa, por ejemplo como los métodos que comprenden hidrolizar lípidos y/o materiales lignocelulósicos secando cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo material biomásico que comprende lípidos o material biomásico lignocelulósico, en un reactor a un catalizador comprendido en una disolución diluida de un ácido fuerte y una sal metálica; esto puede reducir la energía de activación, o la temperatura, de la hidrólisis de la celulosa para obtener mayores rendimientos de azúcar; véanse, por ejemplo, las patentes U.S. n^{os} 6.660.506 y 6.423.145.

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

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

Otro método ejemplar que incorpora el uso de enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o “cócteles” de la invención, comprende hidrolizar previamente cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo material biomásico que comprende lípidos o material biomásico lignocelulósico, en un reactor de hidrólisis previa; añadir un líquido ácido al material sólido (por ejemplo, material lignocelulósico) para obtener una mezcla; calentar la mezcla hasta la temperatura de reacción; mantener la temperatura de reacción durante un tiempo suficiente para fraccionar el material lignocelulósico en una porción solubilizada que contiene al menos aproximadamente 20% de la lignina procedente del material lignocelulósico, y una fracción sólida que contiene celulosa; eliminar una porción solubilizada de la fracción sólida mientras se está a la temperatura de

reacción o próxima a ella, en el que la celulosa en la fracción sólida se hace más susceptible a la digestión enzimática; y recuperar una porción solubilizada. Véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 5.705.369. Las enzimas de la invención se pueden añadir en cualquier etapa de este procedimiento ejemplar.

5 La invención proporciona métodos para obtener composiciones de combustibles para motores (por ejemplo, para motores de encendido por bujía) basadas en hidrocarburos líquidos mezclados con un alcohol de grado combustible obtenido usando una enzima o un método de la invención. En un aspecto, los combustibles obtenidos mediante uso de una enzima de la invención comprenden, por ejemplo, mezclas de gas líquido de gas de carbón, o líquido de gas natural con etanol. Un codisolvente es 2-metil-tetrahidrofurano (MTHF) derivado de la biomasa. Véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 6.712.866.

10 En un aspecto, también se proporcionan métodos para la degradación enzimática de cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, que incluye una biomasa que comprende lípidos o una biomasa lignocelulósica, por ejemplo, para la producción de biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodiéseles) procedente de cualquier material orgánico, y también pueden comprender el uso de tratamiento ultrasónico del material biomásico; véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 6.333.181.

15 En un aspecto, los métodos de la invención para producir biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodiéseles) a partir de un sustrato celulósico comprenden proporcionar una mezcla de reacción en forma de una suspensión que comprende sustrato celulósico, una enzima de esta invención y un agente de fermentación (por ejemplo, en una vasija de reacción, tal como un biorreactor alimentado con sólidos semicontinualmente), y la mezcla de reacción se hace reaccionar en condiciones suficientes para iniciar y mantener una reacción de fermentación (como se describe, por ejemplo, en la Solicitud de Patente U.S. nº 20060014260). En un aspecto, los cálculos experimentales o teóricos pueden determinar una frecuencia de alimentación óptima. En un aspecto, las cantidades adicionales del sustrato celulósico y de la enzima se proporcionan a la vasija de reacción a un intervalo o intervalos según la frecuencia de alimentación optimizada.

20 Un procedimiento ejemplar para obtener biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodiéseles) de la invención se describe en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes U.S. nºs 20050069998; 20020164730; y en un aspecto comprende etapas de moler cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo biomasa que comprende lípidos o biomasa lignocelulósica (por ejemplo, hasta un tamaño de 15-30 mm), someter el producto obtenido a pretratamiento de explosión de vapor (por ejemplo, a una temperatura de 190-230°C) durante un tiempo entre 1 y 10 minutos en un reactor; recoger el material pretratado en un ciclón o producto de fabricación relacionado; y separar las fracciones líquidas y sólidas mediante filtración en una prensa de filtro, introduciendo la fracción sólida en un depósito de fermentación y añadiendo una o más enzimas de la invención, por ejemplo una celulasa y/o una enzima beta-glucosidasa (por ejemplo, disuelta en un amortiguador de citrato pH 4,8).

35 Otro procedimiento ejemplar para obtener biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodiéseles) de la invención que comprenden bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles usando enzimas de la invención comprende pretratar un material de partida que comprende cualquier biomasa, por ejemplo una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo una materia prima de biomasa que comprende lípidos o de biomasa lignocelulósica, que comprende al menos hemicelulosa y celulosa. En un aspecto, el material de partida comprende patatas, soja (colza), cebada, centeno, maíz, avena, trigo, remolacha o caña de azúcar, o un componente o residuo o subproducto de la producción de alimentos o de piensos. El material de partida ("materia prima") se hace reaccionar en condiciones que destruyen la estructura de fibra vegetal para efectuar al menos una hidrólisis parcial de la hemicelulosa y celulosa. Las condiciones destructivas pueden comprender, por ejemplo, someter el material de partida a una temperatura media de 180°C a 270°C a pH 0,5 a 2,5 durante un período de aproximadamente 5 segundos a 60 minutos; o una temperatura de 220°C a 270°C, a pH 0,5 a 2,5 durante un período de 5 segundos a 120 segundos, o equivalente. Esto genera una materia prima con una mayor accesibilidad para ser digerida por una enzima, por ejemplo una enzima celulasa de la invención. Patente U.S. nº 6.090.595.

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

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

Biodiéselos – usando enzimas de la invención para obtenerlos

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

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

- 15 La invención proporciona composiciones, que incluyen enzimas de la invención, y métodos, para procesar “grasa amarilla”, un término inicialmente acuñado por la industria de transformación de desperdicios de matadero. La grasa amarilla que se puede procesar utilizando las composiciones y métodos de la invención incluye grasa de aceites de freidura, por ejemplo, de colectores de grasa de restaurantes o freidoras profundas, o de diversos grados (por ejemplo, de calidad inferior) de sebo de las plantas de transformación de desperdicios de matadero. De esta manera, la invención también proporciona aceites, grasas, aceites de freidura, aceites vegetales, grasas de desecho de restaurantes, y procesa grados de sebo que comprenden al menos una enzima de esta invención.

La grasa amarilla procesada utilizando las composiciones de la invención, que incluyen enzimas, y métodos de la invención, se pueden utilizar para rociar en carreteras, por ejemplo, para el control de polvo, o para aditivos de alimento para animales o forrajes, o suplementos alimentarios.

- 25 En otro aspecto, las composiciones de la invención, que incluyen enzimas, y los métodos de la invención, se pueden utilizar para procesar lípidos, por ejemplo, grasas tales como grasas de desecho de restaurantes para obtener un biocombustible, por ejemplo, un combustible de biodiésel, por ejemplo, para coches, autobuses, camiones o botes. En un aspecto, el biodiésel obtenido utilizando una composición o método de la invención se puede generar a partir de cualquier fuente vegetal renovable, por ejemplo, a partir de sojas, y/o a partir de una grasa, tal como la “grasa amarilla”.

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

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

- 40 Procesamiento de residuos desecados de destilería

En otro aspecto, las enzimas (por ejemplo fosfolipasas) de la invención se pueden usar para tratar/procesar “solubles desecados de destilería (DDS)”, “granos desecados de destilería (DDG)”, “solubles de destilería condensados (CDS)”, “granos húmedos de destilería (DWG)”, y “granos desecados de destilería con solubles (DDGS)”; los granos desecados de destilería pueden ser un subproducto de cereal de un procedimiento de destilación, y pueden incluir solubles. Estos procedimientos pueden comprender moler en seco subproductos vegetales, por ejemplo para aplicación de piensos, por ejemplo para aves, bóvidos, ganado porcino y otros animales domésticos. De este modo, las enzimas de la invención se pueden usar para tratar/procesar granos, por ejemplo cereales, que son subproductos de cualquier procedimiento de destilación, incluyendo procedimientos que usan cualquier fuente de grano, por ejemplo las fuentes tradicionales de fabricantes de cerveza, o, como alternativa, de una planta productora de etanol (factoría, molino o similar). Las enzimas de la invención se pueden usar para tratar/procesar malta de destilerías; esta malta se puede usar subsiguientemente para una variedad de fines, por ejemplo como forraje para ganado, especialmente rumiantes; de este modo, la invención proporciona métodos para procesar forraje para ganado tales como rumiantes, y forraje procesado mediante enzimas que comprende fitasas.

- 55 Las enzimas de esta invención se pueden usar solas o con otras enzimas, para procesar “solubles desecados de destilería (DDS)”, “granos desecados de destilería (DDG)”, “solubles de destilería condensados (CDS)”, “granos húmedos de destilería (DWG)”, y “granos desecados de destilería con solubles (DDGS)”. Por ejemplo, las enzimas de esta invención se pueden usar en cualquier etapa de un procedimiento para producir un producto de alcohol como se ilustra en la Figura 12. Las enzimas de esta invención se pueden usar para incrementar la biodisponibilidad

de fósforo en cualquier biocombustible, o biocombustible potencial, incluyendo fósforo encontrado en “solubles desecados de destilería (DDS)”, “granos desecados de destilería (DDG)”, “solubles de destilería condensados (CDS)”, “granos húmedos de destilería (DWG)”, y “granos desecados de destilería con solubles (DDGS)” (véase, por ejemplo, C. Martinez Amezcua, 2004 Poultry Science 83:971-976).

5 Producción de bebidas alcohólicas o alcohol bebible

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

Formulaciones

15 La invención proporciona nuevas formulaciones que comprenden enzimas de esta invención, y formulaciones para fosfolipasas de la invención, incluyendo formulaciones que incluyen las nuevas enzimas de la invención. Las enzimas de la invención se pueden usar o formular solas o como mezcla de fosfolipasas de la invención, u otras fosfolipasas, u otras enzimas tales como xilanasas, celulasas, proteasas, lipasas, amilasas, o enzimas redox, tales como lacasas, peroxidadas, catalasas, oxidasas, o reductasas. Se pueden usar o formular en una forma sólida, tal como un polvo, una preparación liofilizada, un gránulo, un comprimido, una barra, un cristal, una cápsula, una pastilla, un pelete, o en forma líquida, tal como en una disolución acuosa, un aerosol, un gel, una pasta, una suspensión, una emulsión acuosa/oleosa, una crema, una cápsula, o en una suspensión vesicular o micelar. Las formulaciones de la invención pueden comprender cualquiera o una combinación de los siguientes ingredientes:

20 polioles tales como polietilenglicol, polialcohol vinílico, un glicerol, un azúcar tal como sacarosa, un sorbitol, una trehalosa, una glucosa, una fructosa, una maltosa, una manosa, un agente gelificante tal como goma guar, un carrageenano, un alginato, un dextrano, un derivado celulósico, una pectina, una sal tal como cloruro de sodio, sulfato de sodio, sulfato de amonio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de cinc, sulfato de cinc, una sal de un ácido graso y un derivado de ácido graso, un quelante metálico tal como EDTA, EGTA, un citrato de sodio, un agente antimicrobiano tal como un ácido graso o un derivado de ácido graso, un parabeno, un sorbato, un benzoato,

25 un compuesto modulador adicional para bloquear el impacto de una enzima tal como una proteasa, proteínas voluminosas tales como BSA, un hidrolizado de trigo, un compuesto de borato, un aminoácido o un péptido, un compuesto modulador del pH o de la temperatura apropiado, un emulsionante tal como un detergente no iónico y/o iónico, un agente redox tal como cistina/cisteína, una glutatona, una glutatona oxidada, un compuesto reducido o un compuesto antioxidante tal como ácido ascórbico, o un dispersante.

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

Otros usos para las fosfolipasas de la invención

Las fosfolipasas de la invención también se pueden usar para estudiar el sistema de señalización de fosfoinositida (PI); en el diagnóstico, pronóstico y desarrollo de tratamiento de trastornos bipolares (véase, por ejemplo, Pandey (2002) Neuropsychopharmacology 26:216-228); como antioxidantes; como fosfolípidos modificados; como agentes espumantes y de gelación; para generar lípidos angiogénicos para vascularizar tejidos; para identificar fosfolipasa, por ejemplo PLA, PLB, PLC, PLD y/o moduladores (agonistas o antagonistas) de patatina, por ejemplo inhibidores para uso como antineoplásicos, agentes antiinflamatorios y como agentes analgésicos. Se pueden usar para generar fosfolípidos ácidos para controlar el sabor amargo en alimentos y fármacos. Se pueden usar en la purificación de grasas. Se pueden usar para identificar inhibidores peptídicos para el tratamiento de enfermedades víricas, inflamatorias, alérgicas y cardiovasculares. Se pueden usar para obtener vacunas. Se pueden usar para obtener glicéridos de ácidos grasos poliinsaturados y fosfatidilgliceroles.

40

45

Las fosfolipasas de la invención, por ejemplo enzimas de PLC, se usan para generar inmunotoxinas y diversos compuestos terapéuticos para tratamientos contra el cáncer.

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

La siguiente Tabla 7 resume varios procedimientos y formulaciones ejemplares de la invención:

55

Tabla 7

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

Beneficios del desgomado de aceite mediante PLC

Producción de materia prima de jabón con un contenido mínimo de PL y enriquecida en ésteres de fosfato solubles en agua

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Aceite neutro reducido en goma mediante el uso de PLC

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Procedimiento para generar incremento de DAG en aceites vegetales (por ejemplo, 1,3-DAG)

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Beneficios de usar aceites vegetales con mayor contenido de DAG con otros aceites para beneficios de salud

Beneficio de producto ejemplar

Investigar procedimiento de desgomado que no deja actividad de PLC en el aceite

Realización alternativa del procedimiento de desgomado/mejora reguladora

Investigar procedimiento de desgomado que no deja proteína PLC detectable en el aceite

Realización alternativa del procedimiento de desgomado/mejora reguladora

Uso de una enzima para producir DAG a partir de una masa de goma de lecitina

Beneficio de producto ejemplar

Uso de PLC con aceites de especialidad (enriquecidos con PA, PI)

Beneficio de producto ejemplar

Uso de enzimas específicas de PA/PI (por ejemplo específicas de 596ES2/PI)

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Uso de enzimas específicas de PA/PI (por ejemplo, específicas de 596ES2/PI) + enzimas específicas de PC/PE; impacto de orden de adición

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Procedimiento discontinuo o continuo

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Uso de goma tratada con PLC resuspendida para operaciones adicionales de desgomado de aceite

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Balance másico para DAG, FFA, P, metales, aceite neutro en goma

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Miscelánea

Adición de PLC a pepitas de oleaginosas en escamas antes de la extrusión

Realización alternativa del procedimiento

Ensayo de desgomado a pequeña escala

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Uso de otras enzimas para reducir la masa de goma (por ejemplo enzima PYROLASE™, clorofilasa, peroxidasa, lipasa, lacasa, manasa, proteasa, lactasa, amilasa, etc., o sus combinaciones)

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Uso de compuesto para facilitar mejor la separación de aceite/goma

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Goma endurecida procedente de aceite tratado con PLC

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Variantes glucosiladas/desglucosiladas de fosfolipasa

Realización alternativa del procedimiento de desgomado

Formulaciones ejemplares de la invención

Fin

Formulación líquida ejemplar para determinar la estabilidad

Uso de compuestos para incrementar la estabilidad de PLC a diferentes intervalos de pH y temp. (polioles, sales, metales...)

Uso de un sistema de suministro hidrófobo para PLC (liposomas, enzima hidratada en gotitas de aceite refinado)

Formulación sólida para estabilidad

Uso de diferentes sistemas portadores de PLC, fosfolipasa (resinas de inmovilización, matrices porosas, geles, gránulos, polvos, comprimidos, vesículas/micelas, encapsulados, líquidos estructurados, etc.) para estabilizar fosfolipasa y coenzimas

Uso de materiales residuales de desgomado (componentes de goma, vainas de semillas) para la formulación de PLC

Formulación y procedimientos ejemplares para incrementar la actividad

Uso de sustancia química o enzima para ayudar a dispersar mejor la enzima en aceite (por ejemplo, matriz efervescente, etc.)

Reuso de gomas/enzima para reacciones de desgomado adicionales

Uso de formulaciones para potenciar la segregación o captura enzimática de PLCs para la hidrólisis

Uso de múltiples formulaciones para acomodar PLCs con diferentes especificidades por PL

Uso de múltiples formulaciones para prevenir la inactivación de una PLC por un componente en la prep de otra PLC con una especificidad diferente por el sustrato

Uso de múltiples formulaciones para prevenir la inactivación de una PLC por un componente en la prep de otra enzima (hidrolasa, oxidasa)

Uso de adiciones intermitentes de sustancia cáustica como en formulación de adición de sustancia cáustica de liberación con el tiempo

Actividad inactivante y modulante de enzimas mediante glucosilación

Esta invención proporciona métodos que comprenden el uso de tecnología recombinante para obtener y expresar enzimas u otras proteínas con actividad biológica, por ejemplo enzimas nocivas o tóxicas, (en los que las enzimas u otras proteínas no están normalmente glucosiladas) en una forma inactiva o menos activa, pero reactivable. El método comprende añadir uno o más sitios de glucosilación (por ejemplo, glucosilación enlazada mediante N o enlazada mediante O) en las enzimas u otras proteínas con actividad biológica (por ejemplo, una enzima de la presente invención) manipulando una secuencia codificante que incorpora el nuevo sitio o sitios de glucosilación; expresando las secuencias codificantes variantes en células eucariotas, o en un sistema manipulado mediante

Estabilización de la enzima para la producción máxima de DAG, posiblemente para alterar la especificidad del sustrato o dirigir la formación de producto hacia el tipo 1,3-DAG

Estabilización de la enzima para la producción máxima de DAG, posiblemente para alterar la especificidad del sustrato o dirigir la formación de producto hacia el tipo 1,3-DAG

Estabilización de la enzima o enzimas y facilidad de separación de la enzima a partir del aceite o fase de goma tras el desgomado; reciclabilidad de la preparación enzimática; separación física de la fase enzimática durante el procesamiento del aceite; ataque de PI/PA por PLC

Reducción de costes de ingrediente de la formulación, mejor miscibilidad de la enzima con aceite, termoestabilización de la enzima

Tiempo de reacción más rápido/procedimiento de desgomado/reducción de uso de sustancias químicas

Reciclabilidad de la enzima

Tiempo de reacción más rápido/procedimiento de desgomado/reducción de uso de sustancias químicas

Versatilidad del procedimiento; diferentes enzimas pueden requerir diferentes formulaciones o se pueden añadir en diferentes etapas en el procedimiento

Protección de las actividades de PLC en una realización de formato multienzimático

Protección de la actividad de PLC en una realización de formato multienzimático

Protección de la enzima frente a la desnaturalización inducida por mezclamiento, ahorros de energía

ingeniería o *in vitro* equivalente capaz de una glucosilación post-traducciona. Por ejemplo, la secuencia de 3 aminoácidos NXS/T es el sitio para la glucosilación en células eucariotas, pero las células procariotas no lo hacen. De este modo, la invención comprende añadir al menos una secuencia de 3 aminoácidos NXS/T a la proteína, de manera que su actividad disminuya o se inactive debido a la glucosilación post-traducciona.

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

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

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

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

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

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

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

50 Una enzima cuya actividad fue perjudicial para la célula hospedante se hizo inactiva debido a la glucosilación. Debido a que era inactiva, se pudo acumular en niveles mucho mayores en las células hospedantes eucariotas. Debido a que ya no era activa, ya no pudo ser capaz de ejercer sus efectos negativos. La inactivación de la enzima tóxica fue temporal debido a la desglucosilación de la enzima usando EndoH o PNGasa F, que dio como resultado una restauración completa de la actividad normal de la enzima. Se acumuló una gran cantidad de la enzima glucosilada, inactiva, en el medio, sugiriendo que fue bien tolerada por el hospedante como forma inactiva.
55

Se entiende que la anterior descripción detallada y los ejemplos que se acompañan son meramente ilustrativos, y no se deben tomar como limitaciones en el alcance de la materia. Varios cambios y modificaciones a las realizaciones descritas serán aparentes para aquellos expertos en la técnica. Tales modificaciones y cambios, incluyendo sin

limitación aquellos referentes a los métodos de uso proporcionados aquí, se pueden hacer sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Las patentes, publicaciones de patente, y otras publicaciones aquí referidas se incorporan como referencia.

5 La invención se describirá adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos; sin embargo, se entenderá que la invención no está limitada a tales ejemplos.

EJEMPLOS

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

10 Este ejemplo describe un programa ejemplar de identificación de secuencias para determinar si un ácido nucleico está dentro del alcance de la invención. Se usa un programa BLAST 2.2.2 de NCBI, con opciones por defecto de blastp. Se usaron todos los valores por defecto excepto para el ajuste del filtro por defecto (es decir, todos los parámetros se ajustaron por defecto excepto el filtrado, que se ajustó a OFF); en su lugar se usa un ajuste "-F F", que inhabilita el filtrado. El uso del filtrado por defecto da a menudo como resultado violaciones de Karlin-Altschul debido a la longitud corta de secuencia. Los valores por defecto usados en este ejemplo:

"Filtro para baja complejidad: ON

15 > Tamaño de palabra: 3

> Matriz: Blosum62

> Costes de espacio: Existencia: 11

> Extensión: 1"

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

<<README.bts.txt>>

> argumentos de blastall:

> -p Nombre del programa [String]

> -d Base de datos [String]

> defecto = nr

> -i Archivo de consulta [File In]

> defecto = stdin

> -e Valor de expectativa (E) [Real]

> defecto = 10,0

> -m opciones de vista de alineamiento:

>0 = por pares,

> 1 = anclado a consulta que muestra identidades,

> 2 = anclado a consulta que no muestra identidades,

25 > 3 = anclado a consulta plana, muestra identidades,

> 4 = anclado a consulta plana, sin identidades,

> 5 = anclado a consulta, sin identidades y extremos romos,

> 6 = anclado a consulta plana, sin identidades y extremos romos,

> 7 = salida XML Blast,

> 8 = tabular,

30 > 9 = tabular con líneas de comentario [Número entero]

> defecto = 0

> -o Archivo de salida de informe BLAST [salida de archivo] Opcional

> defecto = stdout

> -F Secuencia de consulta de filtro (DUST con blastn, SEG con otros) [String]

35 > defecto = T

> -G Coste para abrir un salto (cero invoca comportamiento por defecto) [Numero entero]

> defecto = 0

ES 2 590 037 T3

- > -E Coste para extender un salto (cero invoca comportamiento por defecto) [Número entero]
- > defecto = 0
- > -X X Valor de caída para alineamiento con saltos (en bits) (cero invoca comportamiento por defecto) [Número entero]
- 5 > defecto = 0
- > -I Muestra GI's en deflines [T/F]
- > defecto = F
- > -q Penalización para un desemparejamiento nucleotídico (sólo blastn) [Número entero]
- > defecto = -3
- 10 > -r Premio para un emparejamiento nucleotídico (sólo blastn) [Número entero]
- > defecto = 1
- > -v Número de secuencias de bases de datos para mostrar descripciones de una línea para (V) [Número entero]
- > defecto = 500
- 15 > -b Número de secuencias de bases de datos para mostrar alineamientos para (B) [Número entero]
- > defecto = 250
- > -f Umbral para extender resultados, defecto si cero [Número entero]
- > defecto = 0
- > -g Llevar a cabo alineamiento con saltos (no disponible con tblastx) [T/F]
- 20 > defecto = T
- > -Q Código genético de búsqueda a usar [Número entero]
- > defecto = 1
- > -D Código genético DB (para tblast[nx] sólo) [Número entero]
- > defecto = 1
- 25 > -a Número de procesadores a usar [Número entero]
- > defecto = 1
- > -O Archivo SeqAlign [Salida de archivo] Opcional
- > -J Cree la búsqueda defline [T/F]
- > defecto = F
- 30 > -M Matriz [String]
- > defecto = BLOSUM62
- > -W Tamaño de palabra, defecto si es cero [Número entero]
- > defecto = 0
- > -z Longitud efectiva de la base de datos (útese cero para el tamaño real) [String]
- 35 > defecto = 0
- > -K Número de mejores resultados de una región a mantener (defecto off by, si se usa se recomienda un valor de 100) [Número entero]
- > defecto = 0
- > -P 0 para múltiples resultados 1-pasada, 1 para un solo resultado 1-pasada, 2 para 2-pasada
- 40 > [Número entero]
- > defecto = 0
- > -Y Longitud efectiva del espacio de búsqueda (útese cero para el tamaño real)
- > [Real]
- > defecto = 0
- 45 > -S Hebras de consulta para buscar frente a base de datos (para blast[nx], y tblastx). 3 es ambos, 1 es parte superior, 2 es parte inferior [Número entero]
- > defecto = 3
- > -T Produce salida HTML [T/F]
- > defecto = F
- 50 > -1 Búsqueda restringida de base de datos para listar GI's [String] Opcional
- > -U Usar filtrado de letra minúscula de secuencia FASTA [T/F] Opcional
- > defecto = F
- > -y Caída (X) para extensiones blast en bits (0.0 invoca comportamiento por defecto) [Real]
- > defecto = 0.0
- 55 > -Z Valor de caída X para alineamiento con saltos final (en bits) [Número entero]
- > defecto = 0
- > -R archivo de punto de comprobación PSI-TBLASTN [File In] Opcional
- > -n búsqueda MegaBlast [T/F]
- > defecto = F
- 60 > -L Localización en la secuencia de consulta [String] Opcional
- > -A Tamaño de ventana de múltiples resultados (cero para algoritmo de un solo resultado) [Número entero]
- > defecto = 40

EJEMPLO 2: Modificaciones a una enzima PLC (ePLC)

Este ejemplo describe los protocolos ejemplares para obtener las enzimas PLC de esta invención, incluyendo las enzimas PI-PLC de esta invención. Este ejemplo describe las enzimas que se pueden utilizar para practicar esta invención, por ejemplo, utilizadas en combinación con las enzimas PLC de esta invención (por ejemplo, una enzima que tiene una secuencia según se establece en la SEQ ID NO: 8, o según se describe en las Tablas 12 a 15). Las enzimas que se pueden utilizar para practicar esta invención, por ejemplo, en combinaciones o mezclas que comprenden las enzimas PLC de esta invención, incluyen cualquier enzima fosfolipasa, incluyendo una enzima que tiene una secuencia según se establece en la Tabla 8 o Tabla 9, o según se describe en WO 2008/036863. En realizaciones alternativas, las enzimas que se pueden utilizar para practicar esta invención incluyen polipéptidos que tienen una secuencia según se establece en la SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 4, y variantes de los mismos según se describe en las Tablas 8 y 9, debajo.

La enzima fosfolipasa C que tiene una secuencia como se expone en SEQ ID NO:2 (codificada por ejemplo mediante SEQ ID NO:1) es una subsecuencia enzimáticamente activa de la secuencia más larga SEQ ID NO:4 (codificada por ejemplo mediante SEQ ID NO:3). SEQ ID NO:4 tiene una secuencia líder de restos 1 a 37 (en negrita) de SEQ ID NO:2. SEQ ID NO:4, como se codifica mediante SEQ ID NO:3, se usó como un molde para la modificación posterior usando tecnología GSSM. Las posiciones están numeradas partiendo de la metionina N-terminal. Las mutaciones están subrayadas y en negrita (numeradas aquí como N100D, N168S y N171D).

MKKKVLALAA MVALAAPVQS VVFAQTNNSE SPAPILRWSA EDKHNEGINS
 HLWIVNRAID IMSRNTTIVN PNETALLNEW RADLENGIYS ADYENPYDD
 STYASHFYDP DTGTTYIPFA KHAKETGAKY FNLAGQAYQN QDMQQAFFYL
 GLSLHYLGDV NQPMHAASFT **DL**SYPMGFHS KYENFVDTIK NNYIVSDSNG
 YWNWKGANPE DWIEGAAVAA QDYPGVVND TTKDWFVKAA VSQEYADKWR
 AEVTPVTGKR LMEAQRVTAG YIHLWFDTYV NR (SEQ ID NO:4)

WSA EDKHNEGINS
 HLWIVNRAID IMSRNTTIVN PNETALLNEW RADLENGIYS ADYENPYDD
 STYASHFYDP DTGTTYIPFA KHAKETGAKY FNLAGQAYQN QDMQQAFFYL
 GLSLHYLGDV NQPMHAASFT **DL**SYPMGFHS KYENFVDTIK NNYIVSDSNG
 YWNWKGANPE DWIEGAAVAA QDYPGVVND TTKDWFVKAA VSQEYADKWR
 AEVTPVTGKR LMEAQRVTAG YIHLWFDTYV NR (SEQ ID NO:2)

20

ATGAAAAAGAAAGTATTAGCACTAGCAGCTATGGTTGCTTTAGCTGCCG
CAGTTCAAAGTGTAGTATTTGCACAAACAAATAATAGTGAAAGTCCTGC
ACCGATTTTAAGATGGTCAGCTGAGGATAAGCATAATGAGGGGATTAAC
 TCTCATTGTGGATTGTAATCGTGCAATTGACATCATGTCTCGTAATA
 CAACGATTGTGAATCCGAATGAACTGCATTATTAATGAGTGCCGTGC
 TGATTTAGAAAATGGTATTTATCTGCTGATTACGAGAATCCTTATTAT
 GATGATAGTACATATGCTTCTCACTTTTATGATCCGGATACTGGAACAA

ES 2 590 037 T3

CATATATTCCTTTTTCGAAAACATGCAAAAAGAAACAGGCGCAAAAATATTT
TAACCTTGCTGGTCAAGCATAACAAAATCAAGATATGCAGCAAGCATTC
TTCTACTTAGGATTATCGCTTCATTATTTAGGAGATGTGAATCAGCCAA
TGCATGCAGCATCTTTTACGGATCTTTCTTATCCAATGGGTTTCCATTC
TAAATACGAAAATTTTGTGATACAATAAAAAATAACTATATTTGTTTCA
GATAGCAATGGATATTGGAATTGGAAGGAGCAAACCCAGAAGATTGGA
TTGAAGGAGCAGCGGTAGCAGCTAAACAAGATTATCCTGGCGTTGTGAA
CGATACGACAAAAGATTGGTTTGTAAAAGCAGCCGTATCTCAAGAATAT
GCAGATAAATGGCGTGCAGGAAAGTAACACCGGTGACAGGAAAGCGTTTAA
TGGAAAGCGCAGCGCTTACAGCTGGTTATATTCATTTGTGGTTTGATAC
GTATGTAAATCGCTAA (SEQ ID NO:3)

TGGTCAGCTGAGGATAAGCATAATGAGGGATTAACTCTCATTTGTGGA
TTGTAAATCGTGCAATTGACATCATGTCTCGTAATACAACGATTGTGAA
TCCGAATGAAACTGCATTATTAATGAGTGGCGTGCTGATTTAGAAAAT
GGTATTTATTCTGCTGATTACGAGAATCCTTATTATGATGATAGTACAT
ATGCTTCTCACTTTTATGATCCGGATACTGGAACAACATATATTCCTTT
TGCGAAACATGCAAAAAGAAACAGGCGCAAAAATATTTTAACTTGCTGGT
CAAGCATAACAAAATCAAGATATGCAGCAAGCATTCTTCTACTTAGGAT
TATCGCTTCATTATTTAGGAGATGTGAATCAGCCAATGCATGCAGCATC
TTTTACGGATCTTTCTTATCCAATGGGTTTCCATTCTAAATACGAAAAT
TTTGTGATACAATAAAAAATAACTATATTTGTTTCAGATAGCAATGGAT
ATTGGAATTGGAAGGAGCAAACCCAGAAGATTGGATTGAAGGAGCAGC
GGTAGCAGCTAAACAAGATTATCCTGGCGTTGTGAACGATACGACAAAA
GATTGGTTTGTAAAAGCAGCCGTATCTCAAGAATATGCAGATAAATGGC
GTGCGGAAGTAACACCGGTGACAGGAAAGCGTTTAAATGGAAGCGCAGCG
CGTTACAGCTGGTTATATTCATTTGTGGTTTGATACGTATGTAAATCGC
TAA (SEQ ID NO:1)

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

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

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

Los patrones y las muestras se prepararon como sigue:

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

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

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

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

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

Añáñense 900 μ l de detergente para RMN, y después añáñense 100 ul de D₂O a cada muestra.

10 Mézclense las muestras a conciencia sometiendo a vórtice y agitando en termomezcladora Eppendorf, a 30-37°C y 14000 rpm durante 30 minutos

Centrifúguese a 13.000 RPM durante 10 minutos

Retírese con cuidado la capa superior oleosa

Añáñense 750 μ l de hexano a cada muestra y sométase a vórtice suavemente*

15 Centrifúguese a 13.000 RPM durante 10 minutos

Elimínense cuidadosamente 600 μ l de la capa acuosa inferior y transfíranse a un nuevo tubo. Añáñense 25 μ l de patrón interno, y mézclase bien

Transfíranse 500 μ l a un tubo de RMN de 5 mm

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

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

Ajustes de HPLC:

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

Temperatura: 40°C

Caudal: 2 ml/min.

Velocidad de inyección: 20 ul

Fase móvil A: hexano

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

Gradiente de elución:

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

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

La Tabla 8 describe secuencias que se pueden usar para practicar esta invención, por ejemplo en combinación con polipéptidos de esta invención (véñase, por ejemplo, las Tablas 12 a 15), por ejemplo como mezclas o combinaciones de enzimas.

40 Basándose en datos de RMN y de HPLC, se seleccionaron las mutaciones mostradas en la Tabla 8 más abajo. La Tabla 8, más abajo, indica el aminoácido de partida, el número de posición del cambio de aminoácido, y el

5 aminoácido cambiado (SEQ ID NO:4). La Tabla 8 también indica el codón original, el codón de sustitución y otros codones para el mismo cambio de aminoácido. Por ejemplo, la segunda fila, "E41A", indica que el aminoácido en la posición 41 fue originalmente "E" (ácido glutámico), pero se cambió a "A" (alanina). El codón original para el cambio E41A fue "GAG", pero se cambió a "GCA". Sin embargo, también se pudieron haber usado los codones "GCG", "GCC" o "GCT". Las variantes de codones como se exponen en la Tabla 8 que produjeron variantes (de SEQ ID NO:4) con la mejor variación o "mejora" con respecto al "tipo salvaje" (SEQ ID NO:4) para la hidrólisis de PA. La invención proporciona ácidos nucleicos, y los polinucleótidos que los codifican, que comprenden una, varias o todas las variaciones, o el equivalente de todas las variaciones, expuestas en la Tabla 8.

10 En la Figura 10, se da la fracción en peso de la especie de fosfolípido (PL) individual con respecto al PL total que queda tras la reacción, reflejando la especificidad de los mutantes por la especie particular. Aquí, las especies fueron ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina (PC). "TIP" se refiere al patrón interno de RMN. El "DAG liberado" se midió mediante HPLC, y refleja valores relativos entre muestras y controles de 1,3-DAG y 1,2-DAG totales. El control positivo fue una muestra pura de mutante E41A descrito previamente en Tan et al., Biochemistry 37:4275-4279 (1998). Los resultados indican que los mutantes liberan bien DAG y tienen buena actividad sobre diversas especies, incluyendo fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), comparable o mejor que el molde (SEQ ID NO:4). Por ejemplo, D100L y D100M muestran actividad particular sobre PA. Q265R muestra actividad particular sobre PI. Estas mutaciones se pueden combinar para proporcionar enzimas que tienen actividades deseadas sobre diversos sustratos.

Tabla 8: Resultados de GSSM

Resultados de GSSM para PLC	Codón original	Cambiado a	Otros codones que codifican el mismo AA "cambiado a"	AA original	AA cambiado a	Localización de mutación del codón
E41A	GAG	GCA	GCG, GCC, GCT	E	A	41
E41W	GAG	TGG	-	E	W	41
E41F	GAG	TTC	TTT	E	F	41
E41Y	GAG	TAC	TAT	E	Y	41
E41R	GAG	CGT	CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	E	R	41
E94R	GAG	CGG	CGC, CGA, CGT, AGA, AGG	E	R	94
D100L	GAT	TTG	CTC, TTA, CTT, CTA, CTG	D	L	100
D100M	GAT	ATG	-	D	M	100
D100Y	GAT	TAT	TAC	D	Y	100
D100F	GAT	TTT	TTC	D	F	100
D100W	GAT	TGG	-	D	W	100
A104L	GCT	CTT	CTC, TTA, TTG, CTA, CTG	A	L	104
D111R	GAT	AGG	CGC, CGA, CGT, AGA, CGG	D	R	111
T112R	ACT	CGG	CGC, CGA, CGT, AGA, AGG	T	R	112
Y116W	TAT	TGG	-	Y	W	116

Resultados de GSSM para PLC	Codón original	Cambiado a	Otros codones que codifican el mismo AA "cambiado a"	AA original	AA cambiado a	Localización de mutación del codón
I117W	ATT	TGG	-	I	W	117
P118W	CCT	TGG	-	P	W	118
E125K	GAA	AAG	AAA	E	K	125
S168N	TCT	AAC	AAT	N	S	168
D171V	GAT	GTG	GTT, GTC, GTA	D	V	171
D171E	GAT	GAG	GAA	D	E	171
M176W	ATG	TGG	-	M	W	176
D230H	GAT	CAT	CAC	D	H	230
D230R	GAT	CGT	CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	D	R	230
D234W	GAT	TGG	-	D	W	234
D234V	GAT	GTG	GTT, GTC, GTA	D	V	234
D234G	GAT	GGT	GGC, GGA, GGG	D	G	234
D234R	GAT	CGG	CGC, CGA, CGT, AGA, AGG	D	R	234
D234K	GAT	AAG	AAA	D	K	234
Q265R	CAG	CGT	CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Q	R	265

5 En realizaciones alternativas, la invención proporciona combinaciones (mezclas) de enzimas PLC, o los ácidos nucleicos que las codifican, que comprenden la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 3 (que codifica el polipéptido SEQ ID NO: 4) y/o la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO:1 (que codifica el polipéptido SEQ ID NO: 2); o combinaciones (mezclas) de enzimas PLC que comprenden la SEQ ID NO: 2 y/o la SEQ ID NO: 4.

10 En realizaciones alternativas, la invención proporciona combinaciones (mezclas) de enzimas PLC, o los ácidos nucleicos que las codifican, que comprenden la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 3 (que codifica el polipéptido SEQ ID NO: 4) y/o la secuencia de ácidos nucleicos SEQ ID NO: 1 (que codifica el polipéptido SEQ ID NO: 2) que tiene una, dos, o más o todas las (mutaciones) de ácidos nucleicos que codifican las mutaciones de aminoácidos listadas anteriormente en la Tabla 8, incluyendo por ejemplo los cambios de codones aquí descritos. En realizaciones alternativas, la invención proporciona combinaciones (mezclas) de enzimas PLC codificadas mediante estos ácidos nucleicos, por ejemplo, combinaciones (mezclas) de enzimas PLC codificadas mediante una, varias o todas las variaciones de la secuencia de ácidos nucleicos de SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 1, según se describe en la Tabla 8.

15 Después de que se cribaron los resultados de GSSM y se seleccionaron los resultados más importantes (véase Tabla 8, más arriba), se realizaron ensayos de caracterización adicionales sobre placas de yema de huevo a fin de estrechar el número de mutantes de GSSM individuales llevados adelante para la combinación usando tecnología GeneReassembly. La Tabla 10 muestra los datos del ensayo de yema de huevo (ensayo de yema de huevo descrito más abajo), junto con los resultados de ensayos de aceite y determinación de actividad residual de tolerancia
 20 térmica. La Figura 11 ilustra los mutantes de GSSM individuales que se seleccionaron para la inclusión en el procedimiento de GeneReassembly. GeneReassembly se llevó a cabo como se describió previamente.

La Tabla 9, más abajo, enumera 288 secuencias polipeptídicas que se pueden usar para la práctica de la invención, por ejemplo en combinación con polipéptidos de esta invención (véanse, por ejemplo, las Tablas 12 a 15), por ejemplo como mezclas o combinaciones de enzimas. Las secuencias de la Tabla 9 se crearon mediante combinación de GeneReassembly de los mutantes de GSSM individuales seleccionados. Todos son variantes de la secuencia de aminoácidos de partida SEQ ID NO:4 (la secuencia de “tipo salvaje” o “WT”).

5

Para ayudar a leer la Tabla 9, por ejemplo, para la fosfolipasa caracterizada como fosfolipasa 1 “evolucionada” (segunda fila de la tabla):

- el resto de aminoácido de tipo salvaje “E”, o ácido glutámico (glu) en la posición 41 del resto (de SEQ ID NO:4), se modifica a un “Y”, o resto de tirosina (tyr);
- 10 - el resto de aminoácido de tipo salvaje “N”, o asparagina (asp) en la posición 100 del resto (de SEQ ID NO:4), se modifica a un “M”, o resto de metionina (met);
- el resto de aminoácido de tipo salvaje “N”, o asparagina (asp) en la posición 168 del resto (de SEQ ID NO:4), se modifica a un “S”, o resto de serina (ser);
- 15 - el resto de aminoácido de tipo salvaje “N”, o asparagina (asp) en la posición 171 del resto (de SEQ ID NO:4), se mantiene como un “N”; y
- el resto de aminoácido de tipo salvaje “M”, o metionina (met) en la posición 176 del resto (de SEQ ID NO:4), se mantiene como un “M”.

Tabla 9: Biblioteca de fosfolipasas que resulta de la combinación de GeneReassembly de mutantes de GSSM individuales

Fosfolipasa “evolucionada”	E41	N100	N168	N171	M176
1	Y	M	S	N	M
2	F	W	S	E	M
3	A	M	N	E	W
4	Y	F	S	E	M
5	Y	Y	S	N	M
6	R	F	N	E	M
7	E	Y	N	E	M
8	E	F	N	N	W
9	A	W	S	E	M
10	Y	Y	S	N	W
11	E	L	S	N	W
12	A	F	N	N	M
13	W	M	N	N	M
14	W	Y	S	E	M
15	R	L	N	E	W
16	W	W	S	E	W
17	W	N	S	N	M
18	W	L	N	E	M
19	R	N	N	E	M
20	F	N	N	N	W

ES 2 590 037 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
21	Y	N	S	E	M
22	R	N	S	N	W
23	F	Y	S	N	W
24	F	L	N	E	W
25	A	N	N	E	M
26	A	W	N	N	M
27	W	M	N	E	W
28	F	L	S	E	W
29	Y	F	S	N	M
30	F	F	N	N	M
31	E	W	N	E	M
32	E	W	N	N	W
33	E	W	S	E	M
34	E	Y	S	N	M
35	E	N	S	N	M
36	E	L	N	E	W
37	Y	M	N	E	M
38	F	N	S	N	W
39	W	N	N	E	W
40	E	M	S	N	M
41	Y	N	S	N	M
42	Y	Y	N	E	M
43	Y	L	N	E	M
44	F	M	N	N	W
45	F	N	S	E	M
46	F	M	S	N	W
47	E	F	S	N	W
48	W	Y	N	E	W
49	F	F	N	E	M
50	R	M	S	N	W
51	A	N	N	E	w
52	R	W	S	N	M
53	R	L	S	N	M
54	R	W	N	E	M

ES 2 590 037 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
55	F	W	N	N	M
56	E	L	N	N	W
57	E	L	S	E	M
58	A	Y	S	N	W
59	E	Y	S	N	W
60	W	N	N	E	M
61	W	N	N	N	W
62	A	F	S	N	M
63	Y	M	S	E	W
64	R	F	S	N	M
65	A	M	N	N	M
66	F	N	N	E	M
67	E	M	N	E	M
68	E	Y	S	E	M
69	E	F	S	E	M
70	E	W	S	N	M
71	F	W	S	N	W
72	E	W	N	E	W
73	Y	L	N	N	W
74	Y	N	S	N	W
75	A	Y	S	E	W
76	E	F	S	N	M
77	W	L	S	N	M
78	Y	N	N	E	M
79	E	F	N	E	M
80	W	N	S	E	M
81	E	M	S	E	M
82	W	N	S	N	W
83	E	W	S	N	W
84	Y	M	N	E	W
85	E	Y	N	N	W
86	F	M	N	E	W
87	R	L	S	E	W
88	W	F	S	N	M

ES 2 590 037 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
89	E	L	S	N	M
90	E	L	N	E	M
91	Y	F	N	N	W
92	Y	L	S	E	M
93	A	N	S	N	W
94	E	N	N	N	W
95	E	M	S	N	W
96	R	N	N	E	W
97	E	M	N	E	W
98	F	W	S	E	W
99	W	W	N	N	M
100	W	N	N	N	M
101	E	N	S	E	W
102	R	W	S	E	W
103	A	W	S	E	W
104	A	Y	S	E	M
105	F	Y	S	E	W
106	A	Y	N	N	W
107	R	N	S	N	M
108	F	F	N	N	W
109	Y	N	N	E	W
110	E	W	S	E	W
111	R	N	S	E	M
112	E	L	N	N	M
113	E	N	S	N	W
114	R	W	S	N	W
115	F	W	N	E	M
116	Y	Y	N	E	W
117	F	Y	N	N	W
118	W	Y	S	N	W
119	A	N	S	N	M
120	A	L	S	N	W
121	E	Y	N	E	W
122	E	Y	S	E	W

ES 2 590 037 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
123	W	N	S	E	W
124	E	M	N	N	M
125	E	N	N	E	M
126	Y	W	N	E	W
127	A	W	N	N	W
128	Y	Y	S	E	M
129	W	Y	N	N	W
130	F	Y	N	E	M
131	A	N	S	E	M
132	A	L	S	E	W
133	E	F	N	E	W
134	R	N	S	E	W
135	F	N	S	E	W
136	E	W	N	N	M
137	E	N	N	E	W
138	W	W	N	E	W
139	Y	W	S	N	W
140	W	Y	N	E	M
141	R	Y	S	N	W
142	F	Y	S	N	M
143	Y	F	S	N	W
144	R	L	N	E	M
145	F	N	N	E	W
146	Y	N	S	E	W
147	R	N	N	N	M
148	E	Y	N	N	M
149	R	W	S	E	M
150	Y	W	N	N	W
151	A	W	S	N	W
152	R	Y	S	E	M
153	R	Y	N	E	M
154	W	Y	S	E	W
155	A	Y	N	E	W
156	Y	M	N	N	W

ES 2 590 037 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
157	Y	F	N	N	M
158	A	N	S	E	W
159	Y	N	N	N	M
160	E	F	N	N	M
161	Y	W	S	E	M
162	Y	W	N	E	M
163	W	W	N	N	W
164	F	Y	N	E	W
165	W	Y	S	N	M
166	A	Y	N	E	M
167	F	F	S	E	W
168	W	L	S	E	M
169	Y	Y	S	E	W
170	E	L	S	E	W
171	F	N	N	N	M
172	E	N	N	N	M
173	W	W	S	E	M
174	A	W	N	E	M
175	R	Y	N	N	W
176	A	Y	S	N	M
177	R	Y	S	N	M
178	R	Y	S	E	W
179	R	M	N	E	W
180	W	F	N	E	M
181	E	F	S	E	W
182	E	M	S	E	W
183	A	N	N	N	M
184	E	N	S	E	M
185	F	W	N	N	W
186	F	W	S	N	M
187	R	Y	N	E	W
188	Y	Y	N	N	W
189	F	Y	S	E	M
190	F	N	S	N	M

ES 2 590 037 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
191	R	F	S	E	W
192	F	L	S	N	W
193	W	Y	N	N	M
194	A	L	N	N	M
195	F	L	N	N	M
196	A	F	S	E	W
197	W	F	S	E	W
198	A	F	N	E	W
199	R	L	S	N	W
200	W	L	N	E	W
201	Y	L	S	N	W
202	R	M	N	E	M
203	A	M	S	E	W
204	Y	W	S	N	M
205	R	Y	N	N	M
206	Y	M	N	N	M
207	W	M	N	N	W
208	F	F	S	E	M
209	Y	F	S	E	W
210	W	F	S	E	M
211	W	L	S	N	W
212	R	L	N	N	W
213	W	L	N	N	W
214	W	M	S	N	W
215	W	M	S	E	W
216	R	W	N	E	W
217	R	L	N	N	M
218	R	F	N	N	M
219	A	N	N	N	W
220	Y	F	N	E	M
221	W	F	N	N	W
222	R	F	S	E	M
223	F	L	S	N	M
224	F	L	S	E	M

ES 2 590 037 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
225	A	M	S	E	M
226	A	M	S	N	M
227	R	M	S	E	M
228	R	W	N	N	W
229	A	Y	N	N	M
230	Y	W	N	N	M
231	E	M	N	N	W
232	A	F	S	E	M
233	W	F	N	E	W
234	W	F	S	N	W
235	A	L	S	E	M
236	Y	L	N	E	W
237	F	M	S	E	M
238	W	M	S	E	M
239	F	M	S	E	W
240	Y	W	S	E	W
241	W	F	N	N	M
242	W	L	N	N	M
243	R	M	N	N	W
244	R	F	N	N	W
245	A	F	N	N	W
246	F	F	N	E	W
247	A	L	N	E	W
248	Y	L	S	N	M
249	F	M	S	N	M
250	Y	M	S	E	M
251	F	M	N	E	M
252	F	W	N	E	W
253	Y	L	N	N	M
254	R	W	N	N	M
255	Y	N	N	N	W
256	R	F	S	N	W
257	A	F	S	N	W
258	A	F	N	E	M

ES 2 590 037 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
259	A	L	N	N	W
260	A	L	N	E	M
261	R	M	S	E	W
262	W	M	S	N	M
263	R	M	S	N	M
264	A	W	S	N	M
265	R	M	N	N	M
266	F	Y	N	N	M
267	A	M	N	N	W
268	F	F	S	N	M
269	Y	F	N	E	W
270	F	L	N	E	M
271	Y	L	S	E	W
272	F	L	N	N	W
273	Y	M	S	N	W
274	A	M	N	E	M
275	A	W	N	E	W
276	W	W	S	N	W
277	F	M	N	N	M
278	Y	Y	N	N	M
279	R	N	N	N	W
280	F	F	S	N	W
281	R	F	N	E	W
282	A	L	S	N	M
283	W	L	S	E	W
284	R	L	S	E	M
285	W	M	N	E	M
286	A	M	S	N	W
287	W	W	N	E	M
288	W	W	S	N	M

La Tabla 10 resume los resultados de ensayos que analizan diversa actividad enzimática, y el comportamiento del sistema de expresión, de enzimas ejemplares (y en el caso del sistema de expresión de *Pichia pastoris* – la actividad de expresión de los ácidos nucleicos que las codifican), siendo todos los polipéptidos de la invención variantes de secuencia de la secuencia de fosfolipasa de partida SEQ ID NO:4 (codificada, por ejemplo, por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO:3).

5

Tabla 10: ANÁLISIS DE ACTIVIDAD Y SUMARIO

Mutantes GSSM de PLC	# de resto de aminoácido del mutante de GSSM	Cambio de aminoácido GSSM	Ensayo de aceite	Expresión de <i>Pichia pastoris</i>	Actividad Residual Porcentaje de tolerancia térmica	
			% de hidrólisis de PA a 24 h	Actividad en placas de yema de huevo	Proteína expresada en <i>E. coli</i>	Proteína expresada en <i>Pichia pastoris</i>
Aceite bruto			0			
E41E	41	Tipo salvaje	20	Activa	81%	100%
E41A	41	A	29	Activa	83%	99%
E41W	41	w	31	Activa	94%	N/A
E41F	41	F	68	Inactiva	80%	N/A
E41Y	41	Y	69	Inactiva	89%	N/A
E41R	41	R	66	Activa	78%	104%
E94R	94	R	23	Activa	N/A	N/A
D100L	100	L	45	Activa	N/A	87%
D100M	100	M	48	Activa	N/A	104%
D100Y	100	Y	57	Activa	N/A	105%
D100F	100	F	59	Activa	43%	92%
D100W	100	W	61	Activa	N/A	91%
A104L	104	L	26	Activa	115%	86%
D111R	111	R	27	Activa	N/A	99%
T112R	112	R	23	Activa	107%	92%
Y116W	116	w	23	Activa	118%	102%
I117W	117	W	15	Activa	109%	102%
P118W	118	w	17	Activa	N/A	N/A
E125K	125	K	15	Activa	99%	86%
D171V	171	V	29	Activa	N/A	106%
D171E	171	E	44	Activa	N/A	110%
M176W	176	W	42	Activa	101%	101%
D230H	230	H	21	Activa	N/A	97%
D230R	230	R	14	Activa	107%	104%
D234W	234	W	10	Activa	101%	98%
D234V	234	V	0	Activa	109%	102%
D234G	234	G	3	Activa	109%	114%
D234R	234	R	27	Activa	114%	90%
D234K	234	K	23	Activa	N/A	101%

Mutantes GSSM de PLC	# de resto de aminoácido del mutante de GSSM	Cambio de aminoácido GSSM	Ensayo de aceite	Expresión de <i>Pichia pastoris</i>	Actividad Residual Porcentaje de tolerancia térmica	
			% de hidrólisis de PA a 24 h	Actividad en placas de yema de huevo	Proteína expresada en <i>E. coli</i>	Proteína expresada en <i>Pichia pastoris</i>
Q265R	265	R	0	Inactiva	N/A	N/A
E41A NNN	41, 100, 168, 171	A, N, N, N	72		63%	
E41A NKN	41, 100, 168, 171	A, N, K, N	75		65%	
E41A NRN	41, 100, 168, 171	A, N, R, N	79		75%	
E41A NSN	41, 100, 168, 171	A, N, S, N	72		85%	

Ensayo de yema de huevo

El ensayo de yema de huevo se realiza como sigue:

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

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

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

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

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

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

- 20 En realizaciones alternativas, la invención proporciona combinaciones o mezclas de enzimas de la invención y enzimas según se describe en el Ejemplo 2, incluyendo por ejemplo todas las variantes de enzimas citadas en la Tabla 8 y en la Tabla 9, y en WO 2008/036863.

EJEMPLO 3: Elaboración de las enzimas ejemplares de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) de la invención

- 25 Este ejemplo describe las enzimas ejemplares de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC) de la invención, incluyendo el polipéptido que tiene la secuencia según se establece en la SEQ ID NO: 8, y los polipéptidos que tienen una actividad de PI-PLC según se describe en las Tablas 12 a 15; y los métodos ejemplares para obtenerlas y utilizarlas, y ensayos para determinar su actividad de fosfolipasa.

En realizaciones alternativas, la invención proporciona polipéptidos que tienen una actividad de enzima PI-PLC. En algunas realizaciones, estos polipéptidos se construyeron mediante los siguientes métodos:

- 30 Para esta serie de realizaciones, el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 (codificada por ejemplo, mediante la SEQ ID NO: 5) se seleccionó como la secuencia "precursora" o "de tipo salvaje" para la modificación (o "evolución") adicional; en particular, se utilizó la subsecuencia subrayada (véase debajo) de SEQ ID NO: 6 (o SEQ ID NO: 5) con la adición de una Metionina (por ejemplo **MASSINV...**) de partida, como la secuencia "precursora" o de partida para "evolución" o cambios de secuencia para

obtener variantes de enzima. Nótese que la secuencia “precursora” o de partida para “evolución” carece de los primeros 30 aminoácidos, que incluye la secuencia señal (cursivas), o

MNNKKFILKLFICSMVLSAFVF, codificada por ejemplo mediante:

*ATGAACAATAAGAAGTTTATTTTGAAGTTATTCATATGTAGTATGGTACTTAGCGCCT
TTGTATTT*

- 5 La secuencia “precursora” o de partida para “evolución” también carece de un sitio de **escisión previsto (cursivas en negritas) GCTTTC (ácido nucleico) o AF (residuos de aminoácidos)**.

La “evolución” (cambio de secuencia, o “mutación”) se realizó utilizando la “Mutagénesis de Saturación del Sitio Génico” (GSSM) y el GeneReassembly (véase anteriormente para la descripción de GSSM y GeneReassembly) sobre la SEQ ID NO: 5 utilizando las secuencias subrayadas, debajo, con la adición de ácido nucleico que codifica una “M” o metionina de partida (por ejemplo, para la secuencia de aminoácidos codificada, **MASSINV...**), como la secuencia precursora o de partida para “evolución”:

SEQ ID NO: 5:

*ATGAACAATAAGAAGTTTATTTTGAAGTTATTCATATGTAGTATGGTACTTAGCGCCTT
GTATTTGCTTTC* AAATGATAAGAAAACCGTTGCAGCTAGCTCTATTAATGTGCTTGAA
AATTGGTCTAGATGGATGAAACCTATAAATGATGACATACCGTTAGCACGAATTTCA
ATCCAGGAACACATGATAGTGGAACGTTCAAGTTGCAAAATCCGATAAAGCAAGT
GTGGGAATGACGCAAGAATATGATTTTCGTTATCAAATGGATCATGGAGCTAGAA
TTTTGATATAAGAGGGCGTTTAAACAGATGATAAATACGATAGTTCTTCATCATGGGC
CATTATATCTTTATGTAACACTGCACGAATTTATAAACGAAGCGAAAACAATTTTTAA
AAGATAATCCAAGTGAAACGATTATTATGTCTTTAAAAAAGAGTATGAGGATATG
AAAGGGGCGGAAAGCTCATTTAGTAGTACGTTTGAGAAAAATTATTTTCGTGATCCA
ATCTTTTTAAAAACAGAAGGGAATATAAAGCTTGGAGATGCTCGTGGGAAAATTGT
ATTACTAAAAAGATATAGTGGTAGTAATGAATCTGGGGGATATAATAATTTCTATTG
GCCAGACAATGAGACGTTTACCTCAACTATAAATCAAATGTAATGTAACAGTAC
AAGATAAATATAAAGTGAGTTATGATGAGAAAATAAACGCTATTAAGATACATTA
AATGAAACGATTAACAATAGTGAAGATGTTAATCATCTATATTAATTTTACAAGC

TTGTCTTCTGGTGGTACAGCATGGAATAGTCCATATTATTATGCGTCCTACATAAATC
CTGAAATGCAAATTATATGAAGCAAAGAATCCTACGAGAGTGGGCTGGATAATA
CAAGATTATATAAATGAAAAATGGTCACCATTACTTTATCAAGAAGTTATAAGAGC
GAATAAGTCACTTGTAATAATAG

- 15 SEQ ID NO: 6:

MNNKKFILKLFICSMVLSAFVFAF NDKKTVAASSINVLENWSRWMKPINDDIPLARISIPG
THDSGTFKLQNPQVWGMTQEYDFRYQMDHGARIFDIRGRLTDDNTIVLHHGPLYLY
VTLHEFINEAKQFLKDNPSETIIMSLKKEYEDMKGAESSFSSTFEKNYFRDPIFLKTEGNI
KLGDARGKIVLLKRYSGSNESGGYNNFYWPDNETFTSTINQNVNVTVQDKYKVSYDEK
INAIKDTLNETINNSEDVNHLYNFTSLSSGGTAWNSPYYYYASYINPEIANYMKQKNPTR
VGWIIQDYINEKWSPLLYQEVIRANKSLVK

De esta manera, la secuencia de partida para GSSM fue un ácido nucleico que codifica:

MASSINVLENWSRWMKPINDDIPLARISIPGTHDSGTFKLQNPQVWGMTQEYDFRYQ
MDHGARIFDIRGRLTDDNTIVLHHGPLYLYVTLHEFINEAKQFLKDNPSETIIMSLKKEYE
DMKGAESSFSSTFEKNYFRDPIFLKTEGNIKLGDARGKIVLLKRYSGSNESGGYNNFYWP
DNETFTSTINQNVNVTVQDKYKVSYDEKINAIKDTLNETINNSEDVNHLYNFTSLSSGG
TAWNSPYYYYASYINPEIANYMKQKNPTRVGWIIQDYINEKWSPLLYQEVIRANKSLVK

- 20 Las variantes de ácido nucleico “evolucionadas” (las nuevas secuencias de ácidos nucleicos hechas sometiendo la SEQ ID NO: 5 a GSSM) se sub-clonaron para la expresión en ya sea *E. coli* (para la fase de GSSM) o en *P. fluorescens* (para la fase de GeneReassembly).

La GSSM se realizó según se describe en por ejemplo las Patentes U.S. n^{os} 6.171.820; 6.238.884 (véase también la explicación proporcionada aquí). Véase también WO 2008/036863.

- 25 Las nuevas secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos “variantes” o “evolucionadas” resultantes se ensayaron utilizando un ensayo de alto rendimiento como sigue:

SOP para Ensayo de Estabilidad Térmica de Alto Rendimiento

5 Los cribados de GSSM utilizaron el hospedante de *E. coli*, XL1Blue (Stratagene, San Diego, CA), con el vector pASK (IBA GmbH, Göttingen, Alemania). Los cribados del GeneReassembly utilizaron el hospedante *Pseudomonas fluorescens* (Dow Global Technologies Inc., Publicación de Solicitud de Patente U.S. 20050130160, Publicación de Solicitud de Patente U.S. 20050186666 y Publicación de Solicitud de Patente U.S. 20060110747) con el vector pDOW1169 (Dow Global Technologies Inc., Publicación de Solicitud de Patente U.S. 20080058262) y se seleccionaron mediante cultivo en medio mínimo M9 (Dow Global Technologies Inc., Publicación de Solicitud de Patente U.S. 20050186666).

Placas maestras

- 10 1. Las Placas Maestras se crearon mediante variantes de GeneReassembly o GSSM de cosecha de colonias en una placa de 384 pocillos que contenía 50 µl de medio por pocillo.
- a. El medio utilizado para cultivar las variantes de GSSM fue LB y las variantes de GeneReassembly utilizaron M9 (-uracilo).
- 15 2. Las placas maestras se cultivaron toda la noche a 30°C en una incubadora humidificada. Seguido de la adición de glicerol al 20% antes de almacenar las placas a -80°C.

Placas de Expresión

1. Las Placas Maestras se descongelaron a temperatura ambiente o 30°C antes de la replicación.
2. Las Placas Maestras se replicaron utilizando una herramienta de espigas para 384 pocillos para inocular las Placas de Expresión que contenían 60 µl de medio. Se utilizó el mismo medio para las Placas de Expresión que aquel de las Placas Maestras.
- 20 3. Las Placas de Expresión se cultivaron toda la noche (aproximadamente 16 horas) a 30°C en una incubadora humidificada.
4. Las Placas de Expresión para el cribado de GSSM se indujeron con 200 ng/ml de tetraciclina anhidra (AHT) y las placas de GeneReassembly se indujeron a una concentración final de IPTG 0,3 mM.
- 25 5. Las Placas de Expresión se cultivaron toda la noche a 30°C en una incubadora humidificada.
6. Las Placas de Expresión posteriormente se almacenaron a -20°C hasta que se congelaron, usualmente toda la noche, para lisar las células hospedantes.
7. Antes de realizar el ensayo de las Placas de Expresión, se descongelaron a temperatura ambiente o 30°C.

Cribado de Tolerancia Térmica Robótico

- 30 1. El robot se programó para transferir 10 µl de las Placas de Expresión a una Placa RT de Ensayo y a una Placa Térmica de Ensayo.
2. La Placa RT de Ensayo permaneció a temperatura ambiente mientras que la Placa Térmica de Ensayo se incubó a temperatura elevada durante 1 hora. Durante el tratamiento con calor, las Placas Térmicas de Ensayo se cubrieron con un techo de espuma. Las temperaturas para el tratamiento térmico se listan en la siguiente Tabla 11:

35 Tabla 11. Temperaturas para los cribados robóticos primarios y secundarios.

Cribado	Tratamiento de Temperatura de las Variantes de GSSM	Tratamiento de Temperatura de las Variantes de GeneReassembly
Primario	50°C, 55°C	65°C
Secundario	57°C, 60°C	70°C

3. Después del tratamiento térmico, se añadieron del 40 µl del sustrato, fosfato metilumbeliferil mio-inositol (MUPI), utilizando un titertek. El sustrato se preparó a una concentración de 3 mM de modo que la concentración final en las Placas de Ensayo fuese 2,5 mM.
- 40 4. Las Placas de Ensayo se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Posteriormente, la fluorescencia se midió como unidades de fluorescencia relativa (RFU) en un lector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una emisión de 465 nm.

Cálculo del % de Actividad Residual

1. Cada placa de Ensayo contenía 12 controles positivos y 12 controles negativos. Los controles positivos contenían la enzima de tipo salvaje y los controles negativos contenían el vector solodentro del organismo hospedante.
- 5 2. La fluorescencia de los controles negativos se promedió para cada placa de 384 pocillos y se restó de la fluorescencia de las variantes GSSM o de GeneReassembly para las Placas RT de Ensayo y las Placas Térmicas de Ensayo.
3. Cada pocillo de la Placa Térmica de Ensayo se dividió entonces entre el pocillo correspondiente de la Placa RT de Ensayo para obtener un porcentaje de actividad residual (%RA) para cada variante.
- 10 4. El %RA se utilizó para clasificar las variantes más térmicamente tolerantes del cribado robótico de alto rendimiento. Estos aciertos se confirmaron en ensayos adicionales

Cribado Secundario

- 15 1. La tolerancia térmica mejorada se confirmó utilizando cribados secundarios sobre los aciertos seleccionados. Los aciertos se transfirieron mediante selección ventajosa desde las Placas Maestras del cribado primario hacia nuevas Placas Maestras y se sometieron a ensayo a las temperaturas elevadas listadas en la Tabla 11. El protocolo de ensayo fue el mismo que el protocolo anteriormente detallado para el cribado primario.

Tabla 12: Resume las secuencias y el porcentaje (%) de actividad residual de las variantes de GSSM termotolerantes superiores seleccionadas para la construcción de la biblioteca de GeneReassembly.

Sitio de AA	AA Original	AA Nuevo	% de Actividad Residual		
			55°C	57°C	60°C
105	D	G	81,0%	58,8%	3,5%
175	N	P	119,9%	75,7%	2,1%
176	N	F	136,7%	103,8%	10,1%
176	N	L	102,2%	97,2%	9,8%
176	N	W	131,9%	61,7%	3,2%
176	N	Y	180,0%	106,0%	4,1%
191	Q	G	124,6%	77,6%	2,3%
205	Y	L	174,3%	114,2%	0,0%
244	N	T	174,6%	95,7%	5,0%
252	Y	L	148,4%	62,0%	22,2%
252	Y	R	149,3%	187,2%	15,4%
276	Y	F	161,6%	112,1%	1,1%
282	S	C	161,6%	116,4%	8,9%
282	S	H	256,8%	142,0%	0,7%
282	S	L	143,6%	97,8%	0,1%
282	S	P	147,6%	96,8%	1,0%
282	S	R	101,6%	72,5%	4,9%
284	L	F	85,9%	72%	0%
291	R	N	86,4%	75,5%	5,6%

ES 2 590 037 T3

5 Los mutantes de punto y los datos asociados para la Tabla 12 se muestran inmediatamente debajo como la Tabla 13. Nótese, en la Tabla 13, que la numeración de las posiciones de aminoácidos comienza con la Metionina de partida añadida (por ejemplo el aminoácido "M" es la posición 1, el aminoácido "A" es la posición 2, el aminoácido "S" es la posición 3, el aminoácido "S" es la posición 4, el aminoácido "I" es la posición 5, el aminoácido "N" es la posición 6, etc.). Esto es importante para dejar claro que: para las variantes de SEQ ID NO: 6, la numeración de los cambios de aminoácidos comienza con el aminoácido 31 de SEQ ID NO: 6, en la que el aminoácido 31 ("A") se reemplaza por metionina ("M").

Tabla 13							
Posición del Aminoácido	Aminoácido Original	Aminoácido Nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	placa RT (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFUs)
5	I	R	109,5%	-72,4%	-27,7%	-83,3%	119213
10	N	P	142,6%	-97,8%	-167,1%	-149,5%	47737
12	S	C	98,6%	37,8%	19,6%	-1,6%	3926817
17	P	R	105,9%	70,7%	50,6%	0,6%	2834413
20	D	R	168,8%	56,2%	9,5%	-37,7%	243024
22	I	R	164,2%	-56,3%	-8,8%	-67,9%	501992
30	P	Q	69,1%	134,8%	119,4%	56,4%	-98428
31	G	L	59,7%	321,6%	52,3%	66,5%	-89982
32	T	R	112,1%	234,3%	158,3%	141,4%	-32840
32	T	P	-12,9%	-39,0%	5,5%	56,1%	506296
32	T	N	-41,5%	25,5%	-6,8%	15,2%	215696
34	D	G	111,4%	105,7%	112,3%	17,0%	292094
34	D	V	98,0%	-39,1%	19,5%	-8,2%	623943
34	D	S	108,0%	118,4%	67,9%	-18,3%	400778
48	W	C		0,7%	-88%	48%	279831
52	Q	G	-19,0%	-31,2%	45,1%	-11,0%	440078
52	Q	L	-24,5%	-18,9%	-17,5%	-15,0%	243731
52	Q	R	-13,8%	-103,8%	-45,8%	-357,5%	64939
56	F	P	-19,0%	-41,0%	-17,8%	-14,6%	528700
57	R	P		36,5%	-5%	6%	673072
57	R	H	196,2%	54,8%	11,4%	-2,7%	1766819
57	R	W		94,5%	32%	-4%	888544
58	Y	G		87,4%	8%	0%	2203075
59	Q	P		125,1%	-1003%	211%	30707
64	A	P		-17,1%	-38%	21%	298218
67	F	A		-84,1%	-167%	-46%	132639

ES 2 590 037 T3

Tabla 13							
Posición del Aminoácido	Aminoácido Original	Aminoácido Nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	placa RT (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFUs)
68	D	G		859,6%	2454%	113%	-5565
69	I	R	550,5%	219,2%	283,9%	123,1%	-39813
69	I	S		-26,7%	4%	-2%	837975
79	I	R	111,4%	216,0%	308,4%	539,6%	-47241
79	I	C		-9,4%	18%	19%	901719
79	I	S		242,7%	-642%	-145%	-33068
103	L	E		391,0%	-504%	492%	26863
103	L	G	312,7%	333,5%	394,9%	317,6%	-14442
103	L	R		135,6%	279%	238%	-42440
103	L	A		13,2%	-7%	38%	520801
103	L	S	105,0%	48,7%	-162,4%	-90,0%	53552
103	L	N		-331,1%	-381%	-229%	51581
104	K	P		-1319,4%	1845%	4021%	-7815
105	D	G	106,9%	81,0%	58,8%	3,5%	1739646
107	P	H		30,7%	7%	-3%	2397754
107	P	R		21,4%	4%	-3%	3155286
107	P	L	65,8%	55,2%	34,4%	-4,7%	447512
108	S	G	95,5%	65,1%	49,6%	-4,3%	307147
110	T	F		-10,5%	-7%	2%	875451
110	T	K	126,1%	52,7%	18,9%	-49,3%	134884
112	I	A		-23,7%	-20%	-4%	453446
112	I	K	55,2%	95,2%	15,4%	-46,1%	59053
115	L	E		-102,6%	-89%	103%	48860
115	L	N		-12,4%	-15%	-10%	1025328
115	L	S	-5,3%	-8,9%	-10,3%	-10,1%	556124
115	L	G	-21,1%	-36,4%	-10,3%	-41,2%	644336
115	L	R		106,0%	-28%	-215%	-55337
116	K	T		18,1%	7%	18%	230855
116	K	V	45,1%	-4,6%	-19,7%	-14,4%	235560
116	K	L	78,8%	-0,9%	-37,9%	-19,2%	343119

ES 2 590 037 T3

Tabla 13							
Posición del Aminoácido	Aminoácido Original	Aminoácido Nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	placa RT (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFUs)
116	K	P	97,5%	16,1%	-20,9%	-32,3%	182525
116	K	C		-26,1%	-64%	-81%	226865
116	K	F		-560,3%	-780%	-126%	49518
116	K	Y		-245,0%	-488%	-141%	39189
117	K	G		10,2%	-26%	-21%	387561
117	K	S		-31,6%	-25%	-23%	548036
118	E	K		167,4%	409%	163%	-44595
118	E	Y		106,8%	-57%	40%	132171
118	E	G	45,4%	-7,5%	-11,7%	-10,8%	408480
118	E	P	100,9%	-77,5%	-82,4%	-11,7%	227778
118	E	W		-140,1%	-30%	-49%	115308
118	E	A		-61,4%	-217%	-58%	106520
118	E	V		-112,9%	57%	-89%	54418
118	E	S	-111,6%	-294,0%	-83,6%	-172,0%	84511
118	E	L	-615,3%	-772,3%	-540,2%	-764,3%	6410
127	S	G		167,2%	24%	-2%	2332741
129	F	S	-103,1%	-140,8%	-135,6%	-138,6%	38893
129	F	K		166,2%	46%	-224%	-32568
130	S	A		209,1%	13%	-3%	2817649
133	F	S		-96,6%	245%	124%	68055
134	E	G		-11,5%	-6%	-6%	1437969
134	E	P	-50,2%	-179,6%	-112,4%	-71,5%	107620
136	N	P		-7,0%	-9%	-7%	967546
139	R	S		95,2%	9%	7%	3316801
139	R	M		65,5%	3%	-2%	3452962
139	R	P		176,0%	53%	-3%	2170436
140	D	T		7,5%	-4%	0%	3067537
141	P	L		12,2%	-3%	-1%	3026938
142	I	P	105,3%	42,2%	15,3%	-4,4%	1571795
142	I	R		-9,6%	-5%	-5%	2239061

ES 2 590 037 T3

Tabla 13							
Posición del Aminoácido	Aminoácido Original	Aminoácido Nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	placa RT (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFUs)
142	I	G		-2,2%	-7%	-7%	1821775
143	F	G		84,3%	-10%	14%	547682
143	F	V	7,9%	-5,3%	-3,4%	-3,4%	2475003
143	F	S	27,1%	-10,3%	-12,1%	-11,6%	492372
143	F	T		7,0%	-22%	-15%	1395343
144	L	R		-3,1%	-8%	3%	3104379
144	L	P		7,8%	-2%	0%	1673141
151	K	T		112,2%	6%	0%	3537421
153	G	M		103,8%	1%	-7%	2086156
153	G	V		97,6%	-8%	-13%	1534593
154	D	R		-4,6%	-3%	-3%	1464648
155	A	R	101,5%	149,6%	225,5%	159,3%	-37404
155	A	P		505,6%	86%	111%	-84103
159	I	T	80,3%	9,4%	-3,2%	-4,9%	1414669
160	V	R		-72,5%	-8%	-88%	360024
162	L	S	77,9%	-1,3%	-0,7%	9,5%	653562
162	L	F		126,7%	11%	5%	2305681
162	L	G	84,3%	14,3%	-14,4%	-24,4%	822742
162	L	E	-8,9%	-25,7%	-27,5%	-99,2%	255160
162	L	D		-252,6%	-180%	-107%	41739
162	L	R	8,6%	10,3%	-856,1%	-184,2%	-45546
163	K	E		-6,9%	-10%	10%	1257238
163	K	W		-6,8%	-25%	-11%	935455
164	R	L		684,4%	2692%	890%	-11232
164	R	T		-267,9%	-259%	-276%	35611
165	Y	E	4,2%	-3,1%	-3,5%	-3,1%	1330418
165	Y	S	-0,6%	-4,5%	-5,0%	-4,5%	1204269
165	Y	D		-9,9%	-26%	-8%	849532
165	Y	G	-	-21,0%	-9%	-12%	703657
174	Y	R	-27,9%	-10,0%	-12,8%	-11,4%	478910

ES 2 590 037 T3

Tabla 13							
Posición del Aminoácido	Aminoácido Original	Aminoácido Nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	placa RT (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFUs)
175	N	P	186,8%	119,9%	75,7%	2,1%	3423684
176	N	F	151,7%	136,7%	103,8%	10,1%	3166873
176	N	L	159,0%	102,2%	97,2%	9,8%	1973048
176	N	Y	215,1%	180,0%	106,0%	4,1%	2686812
176	N	W	153,3%	131,9%	61,7%	3,2%	3375824
179	W	V		654,7%	-2109%	736%	21624
179	W	L		211,2%	-87%	-107%	66095
187	S	V		81,7%	20%	9%	3668103
191	Q	G	141,5%	124,6%	77,6%	2,3%	4030462
193	V	L	229,3%	177,3%	85,1%	-0,3%	2339956
196	T	P	253,8%	195,0%	122,7%	363,7%	-81049
197	V	R	84,1%	159,2%	43,9%	67,0%	-67056
201	Y	R		97,6%	244%	571 %	-94821
201	Y	A		105,4%	168%	262%	-79800
201	Y	L	114,7%	108,5%	94,5%	111,0%	-69345
201	Y	P		99,5%	87%	109%	-77061
201	Y	Q	103,9%	100,2%	114,2%	100,9%	-78259
201	Y	E	98,4%	196,7%	94,8%	22,0%	-75564
201	Y	S	93,7%	276,0%	-294,6%	-67,2%	-89008
201	Y	H		-469,7%	-450%	-233%	38056
205	Y	L	176,2%	174,3%	114,2%	-0,4%	6193145
206	D	C		68,6%	7%	2%	2578407
208	K	S		-95,6%	-56%	-50%	101991
215	T	L	241,1%	100,4%	42,5%	-2,6%	2276174
216	L	A		2,1%	-22%	9%	739181
222	N	P		-1,8%	-27%	16%	605972
238	S	G	188,7%	120,1%	64,7%	-8,5%	1960910
244	N	T	147,2%	174,6%	95,7%	5,0%	3312364
244	N	S	144,6%	234,0%	148,4%	1,1%	2624829
252	Y	L	131,0%	148,4%	62,0%	22,2%	6033264

ES 2 590 037 T3

Tabla 13							
Posición del Aminoácido	Aminoácido Original	Aminoácido Nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	placa RT (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFUs)
252	Y	R	220,0%	149,3%	187,2%	15,4%	3753916
252	Y	I		96,9%	41,4%	3,9%	10341043
261	M	I	129,8%	117,8%	90,7%	-1,0%	3413811
268	R	S		-22,2%	-19%	-23%	353376
268	R	L		-513,9%	-333%	-149%	49591
272	I	S	163,2%	519,8%	300,9%	1188,1%	-42385
272	I	R	4,9%	485,2%	277,9%	404,0%	-76173
272	I	G		20,2%	161%	102%	-85289
272	I	E	199,6%	142,4%	163,1%	97,2%	-65592
272	I	N		-91,2%	-208%	-77%	99735
272	I	P	92,7%	-130,0%	-142,8%	-113,3%	73365
276	Y	F	193,7%	161,6%	112,1%	1,1%	2536481
282	S	C	153,5%	161,6%	116,4%	8,9%	1804086
282	S	R	108,4%	101,6%	72,5%	4,9%	3108844
282	S	P	158,8%	147,6%	96,8%	1,0%	3082327
282	S	H	193,9%	256,8%	142,0%	0,7%	1966076
282	S	L	164,4%	143,6%	97,8%	0,1%	2208563
282	S	E	159,0%	199,7%	77,4%	-1,0%	2499129
282	S	W		116,8%	6%	-3%	2625324
282	S	K	180,0%	181,2%	93,1%	-5,0%	1412699
282	S	F	144,9%	113,1%	28,7%	-5,1%	1668567
284	L	F		85,9%	72%	-1%	3744515
287	Q	L	106,5%	68,1%	34,0%	-7,2%	2032181
291	R	N	143,8%	86,4%	75,5%	5,6%	3463258
296	L	E		-169,4%	20%	31%	188612
Control negativo				103,5%	130%	182%	-60543
Control negativo			161,4%	136,6%	156,0%	157,1%	-47900
Control negativo				450,3%	69%	156%	-63840
Control negativo				125,1%	267%	137%	-67530
Control negativo			483,8%	140,8%	138,9%	135,3%	-33533

Tabla 13							
Posición del Aminoácido	Aminoácido Original	Aminoácido Nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	placa RT (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFUs)
Control negativo			508,5%	123,0%	138,5%	116,6%	44840
Control negativo				104,3%	119%	114%	-58308
Control negativo			150,3%	96,9%	96,4%	89,8%	-57605
Control positivo				106,8%	12%	6%	3745053
Control positivo				122,1%	3%	6%	2931573
Control positivo				106,6%	8%	6%	3418796
Control positivo			92,3%	70,7%	55,1%	3,9%	5793014
Control positivo				55,1%	7%	2%	3312736
Control positivo			153,4%	89,3%	51,6%	1,3%	4765881
Control positivo			132,9%	70,0%	34,0%	0,4%	5520616
Control positivo			154,3%	80,7%	17,6%	-0,7%	4018936

5 El GeneReassembly se realizó sobre los ácidos nucleicos según se describe aquí utilizando los mutantes termoestables superiores de la fase de GSSM; y las condiciones de ensayo para las variantes del GeneReassembly descritas anteriormente en la sección titulada “SOP para Ensayo de Estabilidad Térmica de Alto Rendimiento”, de este ejemplo, anteriormente. (Para reiterar: se eliminaron los ácidos nucleicos que codifican los treinta y uno (31) aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 (codificada por ejemplo por SEQ ID NO: 5) y se añadieron unos nucleótidos que codifican una metionina de partida para el ácido nucleico que “evoluciona” en la GSSM y el GeneReassembly). La mejor combinación de variantes de enzima después del GeneReassembly (en los mutantes termoestables de la fase de GSSM) se establece en la Tabla 14, debajo. La invención proporciona enzimas, y los ácidos nucleicos que las codifican, que comprenden cualquiera, varios o todos los cambios de aminoácidos descritos en la Tabla 14. Por ejemplo, de la primera fila de la tabla 14, una enzima ejemplar de la invención es una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos según se establece en la SEQ ID NO: 6, pero con cambios de aminoácidos como sigue: N176F, Q191G, Y205L, N244T, Y252R, Y276F, S282H, L284F y/o R291N.

Los datos de actividad para estas enzimas ejemplares de la invención se establecen en la Tabla 15, debajo.

Tabla 14- mejor combinación de variantes de enzima después del GeneReassembly													
ID	Cambio de Aminoácido												
	N175	N176		Q191	Y205		N244	Y252		Y276	S282	L284	R291
A1		F		G	L		T	R		F	H	F	N
B1	P	Y	Y178H	G	L		T	R		F	H		N
3	P	Y		G	L		T	R		F	H	F	N
4	P	L		G	L		T	R		F	L	F	N
5		f		G			T	R		F	H		N
6	P	Y		G	L			R	M261I	F	R		N
8	P	Y		G	L		T	R		F	R		N
B2	P	F		G	L	4	T	L		F	H		N

ES 2 590 037 T3

11		F		G			T	R		F	H		N
12		Y		G	L		T			F	H	F	N
14	P	F		G	L		T	R		F	L	F	N
G2		F		G	L		T	R	M261I	F	H		N
17	P	Y		G	L		T	R		F	L	F	N
18		F		G			T	R		F	H	F	
20		F		G	L		T	R		F	H	F	N
21		L		G	L		T	L		F	H	F	
22	P	Y		G	L		T			F	H		N
23		F		G			T	R		F	R	F	
24	P	Y		G	L		T	L		F	R	F	
A4		F		G	L		T	L		F	R	F	
26		F		G	L		T	L		F	R		
27		Y		G	L		T	R		F	H	F	N
28	P			G	L			R		F	H	F	N
29	P	F		G	L		T	L		F	H	F	N
30	P	L			L		T	R		F	P	F	
32	P	W		G	L		T	R		F	R	F	
33	P	Y			L		T	R		F	H	F	N
34	P	Y		G			T	L		F	R	F	N
35		F	4	G	L		T	R		F	R	F	N
36	P	W		G	L		T	L		F	R		N
37		F		G	L		T	L		F	P		
39		F		G			T	L	F	L	H	F	N
40	P	Y		G			T	R	-	F	R	F	N
41		F		G	L		T			F	R	F	N
42	P	Y		G			T	R		F	R	F	N
43	P	Y		G	L			L			H	F	N
44	P	W		G	L		T	R		F	R	F	
45	P	Y		G			T	R				F	N
46	P	W		G	L		T	L		F	R		
47	P	Y		G	L			L		F	R	F	N
48	P	Y		G	L			L			H	F	
49	P			G			T	R		F	H		N
50		L		G	L		T	L		F	H		

ES 2 590 037 T3

51	P	F	-	G	L			R			H	F	N
52	P	Y		G			T	L		F	L	F	
53		Y		G	L	N210N		R		F	H	F	N
54		F		G	L			R			H		N
55	P	W		G	L			R		F	P	F	
57	P	Y		G	L		T	R			R	F	
58	P	F		G	L		T	L		F	H		
59	P	F			L		T	R		F	H		N
60	P	W		G	L		T	L		F	R	F	
61	P			G	L		T	L			H	F	N

Los datos para la variante del GeneReassembly son:

Tabla 15

Nombre	Actividad residual a 65C	Actividad residual a 70C	N175	N176	Q191	Y205	N244	Y252	Y276	S282	L284	R291	Mutación adicional
A1	106,24	37,14		F	G	L	T	R	F	H	F	N	
B1	111,5	23,4	P	Y	G	L	J	R	F	H		N	Y178H
3	106,77	25,48	P	Y	G	L	T	R	F	H	F	N	
4	105,4	15,89	P	L	G	L	T	R	F	L	F	N	
5	88,84	16,39		F	G		T	R	F	H		N	
6	100,71	20,78	P	Y	G	L		R	F	R		N	M261I
8	105,64	16,94	P	Y	G	L	T	R	F	R		N	t
B2	101,44	22,03	P	F	G	L	T	L	F	H		N	
11	93,96	22,8		F	G		T	R	F	H		N	
12	95,32	18,59		Y	G	L	T		F	H	F	N	
14	83,24	22,83	P	F	G	L	T	R	F	L	F	N	
G2	97,66	83,7		F	G	L	T	R	F	H		N	M261I
17	95,46	40,92	P	Y	G	L	T	R	F	L	F	N	
18	95,98	16,72		F	G		T	R	F	H	F		
20	93,48	28,26		F	G	L	T	R	F	H	F	N	
21	93,52	15,54		L	G	L	T	L	F	H	F		
22	82,46	17,4	P	Y	G	L	T		F	H		N	
23	86,13	17,28		F	G		T	R	F	R	F		
24	121,7	44	P	Y	G	L	T	L	F	R	F		
A4	148,28	35,27		F	G	L	T	L	F	R	F		

ES 2 590 037 T3

Nombre	Actividad residual a 65C	Actividad residual a 70C	N175	N176	Q191	Y205	N244	Y252	Y276	S282	L284	R291	Mutación adicional
26	108,03	18,92		F	G	L	T	L	F	R			
27	85,02	16,09		Y	G	L	T	R	F	H	F	N	
28	86,9	16,52	P		G	L		R	F	H	F	N	
29	157,32	22,71	P	F	G	L	T	L	F	H	F	N	
30	86,49	15,47	P	L		L	T	R	F	P	F		
32	112,42	18,88	P	W	G	L	T	R	F	R	F		
33	121,27	15,74	P	Y		L	T	R	F	H	F	N	
34	88,4	30,67	P	Y	G		T	L	F	R	F	N	
35	109,4	58,72		F	G	L	T	R	F	R	F	N	
36	90,24	18,57	P	W	G	L	T	L	F	R		N	
37	92,94	16		F	G	L	T	L	F	P			
39	104,51	19,07		F	G		T	L	F	H	F	N	
40	102,54	57,09	P	Y	G		T	R	F	R	F	N	
41	94,23	27,83		F	G	L	T		F	R	F	N	
42	112,91	16,34	P	Y	G		T	R	F	R	F	N	
43	168,76	15,56	P	Y	G	L		L		H	F	N	
44	254,08	28,87	P	W	G	L	T	R	F	R	F		
45	141,67	15,51	P	Y	G		T	R			F	N	
46	175,31	23,58	P	W	G	L	T	L	F	R			
47	172,6	35,64	P	Y	G	L		L	F	R	F	N	
48	109,25	15,12	P	Y	G	L		L		H	F		
49	95,01	15,33	P		G		T	R	F	H		N	
50	81,01	16,01		L	G	L	T	L	F	H			
51	109,05	15,06	P	F	G	L		R		H	F	N	
52	84,83	15,32	P	Y	G		T	L	F	L	F		
53	97,17	16,81		Y	G			R	F	H	F	N	N210N
54	127,34	15,05		F	G	L		R		H		N	
55	97,32	15,11	P	W	G	L		R	F	P	F		
57	149,08	19,49	P	Y	G	L	T	R		R	F		
58	106,56	17,47	P	F	G	L	T	L	F	H			
59	89,33	15,06	P	F		L	T	R	F	H		N	
60	89,94	17,85	P	W	G	L	T	L	F	R	F		
61	108,91	17,96	P		G	L	T	L		H	F	N	

Acierto del GeneReassembly Líder = "G2", o SEQ ID NO: 8 codificada mediante SEQ ID NO: 7

SEQ ID NO: 7:

ATGGCTAGCTCTATTAATGTGCTTGAAAATTGGTCTAGATGGATGAAACC
TATAAATGATGACATACCGTTAGCACGAATTTCAATTCCAGGAACACATG
ATAGTGGAACGTTCAAGTTGCAAAATCCGATAAAGCAAGTGTGGGGAATG
ACGCAAGAATATGATTTTCGTTATCAAATGGATCATGGAGCTAGAATTTT
TGATATAAGAGGGCGTTTAAACAGATGATAATACGATAGTTCTTCATCATG
GGCCATTATATCTTTATGTAACACTGCACGAATTTATAAACGAAGCGAAA
CAATTTTAAAAGATAATCCAAGTGAAACGATTATTATGTCTTTAAAAAA
AGAGTATGAGGATATGAAAGGGGCGGAAAGCTCATTTAGTAGTACGTTTG
AGAAAAATTATTTTCGTGATCCAATCTTTTAAAAACAGAAGGAAATATA
AAGCTTGAGATGCTCGTGGGAAAATTGTATTACTAAAAAGATATAGTGG
TAGTAATGAATCTGGGGGATATAATTTTTTCTATTGGCCAGACAATGAGA
CGTTTACCTCAACTATAAATGGTAATGTAAATGTAAACAGTACAAGATAAA
TATAAAGTGAGTTTGGATGAGAAAATAAACGCTATTAAGATACATTA
TGAAACGATTAACAATAGTGAAGATGTTAATCATCTATATATTAATTTTA
CAAGCTTGCTTCTGGTGGTACAGCATGGACGAGTCCATATTATTATGCG
TCCAGGATAAATCCTGAAATTGCAAATTATATTAAGCAAAAGAATCCTAC
GAGAGTGGGCTGGATAATACAAGATTTTATAAATGAAAAATGGCATCCAT
TACTTTATCAAGAAGTTATAAATGCGAATAAGTCACTTGTA
AAAATGA

5

SEQ ID NO: 8:

MASSINVLENWSRWMKPINDDIPLARISIPGTHDSGTFKLQNPQVWGMT
QEYDFRYQMDHGARIFDIRGRLTDDNTIVLHHGPLYLYVTLHEFINEAKQFLKDN
PSETIIMSLKKEYEDMKGAESSFSSTFEKNYFRDPIFLKTEGNIKLGDARGKIVLLK
RYSGSNESGGYNFFYWPDNETFTSTINGNVNVTVDKYKVSLEKINAIDTLNE
TINSEDEVNHLIYINFTSLSSGGTAWTSPYYYASRINPEIANYIKQKNPTRVGIWIIQD
FINEKWHPLLYQEVINANKSLVK

10 Datos del cribado de aceite: el cribado a pequeña escala para el contenido de fosfolípidos para los aciertos del GeneReassembly se resume en la tabla debajo. Los aceites se trataron (o no se trataron, en el caso del control) con enzima según se describe en el protocolo titulado "Procedimiento de aceite de pequeña escala", debajo. Posteriormente, se analizaron las muestras para el contenido de fosfolípidos utilizando RMN, utilizando el siguiente protocolo:

Procedimiento de aceite a pequeña escala

Objetivo: Examinar la actividad de ePLC y PI-PLC en el aceite de soja bruto en puntos de tiempo durante la reacción de la enzima.

15 Aceite:

Aceite de soja bruto

FFA: 0,24%

pH: 6,97

ES 2 590 037 T3

DAG: 0,27% 1,2 + 0,24% 1,3 = DAG total 0,51%

PLs: 0,21% PA, 0,43% PE, 0,25% PI, 0,44% PC (PLs totales 1,34%); Sin LPA, 0,01% LPE, Sin LPI, 0,02% LPC, Sin 1-LPLs; 0,01% A, Sin E, I o C; 661 ppm de fósforo total de los cuales 628,6 ppm son de PLs

CP: 742 ppm P, 73,8 ppm Ca, 69,8 ppm Mg, 0,0 ppm Fe

5 Enzimas:

Fosfolipasa 8 evolucionada (Ejemplo 2, Tabla 9) - 11,5 Unidades/mg

Requieranse 5,5 unidades x 15 muestras = 82,5 unidades totales/11,5 Unidades/mg ~ 7 mg

Pésense 12,1 mg x 11,5 U/mg = 139,15 Unidades resuspendidas en 120 ul Hepes 20 mM pH 7,4, ZnSO₄ 1 mM = 1,16 unidades/ul

10 Requieranse 5,5 unidades en 10 ul

5,5 unidades/(1,16 unidades/ul) - 4,7 ul + 5,3 ul = 10 ul Prepárese lote 94 ul de 1,16 Unidades/ul y 106 ul Hepes 20 mM pH 7,4, ZnSO₄ 1 mM. Añádanse 10 ul a la reacción

SEQ ID NO: 8 - 4,2 Unidades/mg

Requieranse 0,02 unidades x 15 muestras = 0,3 unidades totales/4,2 Unidades/mg ~ 1 mg

15 Pésense 4,2 mg x 4,2 U/mg = 17,64 Unidades resuspendidas en 120 ul Hepes 20 mM pH 7,4, ZnSO₄ 1 mM = 0,147 unidades/ul

Requieranse 0,02 unidades en 10 ul

0,02 unidades/(0,147 unidades/ul) = 0,14 ul + 9,86 ul = 10 ul

20 Prepárese lote 3 ul de 0,147 Unidades/ul y 197 ul Hepes 20 mM pH 7,4, ZnSO₄ 1 mM. Añádanse 10ul a la reacción

Condiciones de reacción:

Se repartió 1 ml de aceite en alícuotas en tubos de 2 ml utilizando una distri-man de Glison.

El aceite se precalentó a 60C agitando a 1400 rpm en un termomezcladora durante ~ 30 minutos antes de la adición de la enzima.

25 La enzima se añadió a cada muestra, posteriormente se sometió a un homogeneizador polytron durante 30 segundos y se incubó a 60C con agitación continua.

Las muestras se eliminaron en puntos de tiempo.

Inmediatamente después de la eliminación de las muestras en los puntos de tiempo, las muestras se prepararon para el análisis mediante RMN. La adición de detergente de RMN pH 10,5 debería detener la reacción de la enzima.

30 Preparación de reactivos, patrones, y muestras para la determinación de fosfolípidos y productos mediante RMN ³¹P:

Se utilizaron dos patrones ³¹P internos de TMP (2,2,6,6-tetrametilpiperidina)/tributilfosfato (TBP) o TMP/trimetilpsoraleno (TIP) a pH 10,5. El TIP es sumamente inmune del solapamiento espectral pero tiene un tiempo de relajación más largo (2,76 segundos) en comparación con 1,02 segundos para TBP. El TBP coincide con los valores T₁ de PC, PE y PI, mientras que TIP coincide más con PA. Los factores de saturación se han calculado a partir de los datos obtenidos con un retardo de reciclado normal de 1,74 segundos frente a un reciclado de 21,6 segundos utilizando un ángulo de punta de 58 grados para S/N óptima por tiempo unitario utilizando TIP. Éste es probablemente el método preferido. El TBP, aunque es más eficiente debido al T₁ más corto, tiene un desplazamiento químico intermedio entre PI y PC y es altamente dependiente de la temperatura y sufre solapamiento.

40 Esto proporciona las siguientes ventajas:

(i) un pH 10,5 separa limpiamente el LPI de la PE (éstos se solapan a pH 8,6, y 9,5),

(ii) los patrones internos TBP y TIP permiten reciclar más rápido retardos de RMN con una mejora de aproximadamente 2,8 en S/N por tiempo unitario,

(iii) proporciona una comprobación interna tanto de las referencias TBP/TIP 2 mM como de TMP 2 mM,

(iv) permite que se seleccionen diferentes condiciones de RMN con base en las necesidades (PL's o productos, por ejemplo).

Preparación de reactivos

- 5 1. Ácido desoxicólico al 5% (DOC): disuélvase 5,0 g de sal de Na del ácido desoxicólico en 100 ml de agua grado HPLC.
2. EDTA 50 mM/TRIS 112,5 mM: añádanse 1,46 g de ácido EDTA y 1,3624 g de base TRIS a 100 ml de agua grado HPLC.
- 10 3. Detergente 5:4 DOC/(EDTA/TRIS), pH 10,5: mézclense 50 ml de DOC Na y 40 ml de EDTA/TRIS. Añádase KOH en peletes hasta que el pH sea 10,5 (unos cuantos peletes). Este detergente contiene TRIS 50 mM para la amortiguación del pH.
4. En resumen, para obtener 900 ml de detergente: 25 g de DOC, 5,84 g de EDTA, 5,45 g de base Tris, 900 ml de H₂O, ajústese el pH a 10,5 utilizando peletes de KOH.
- 15 5. Patrón Interno TMP 50 mM y TBP 50 mM en isopropanol grado HPLC (IPA): prepárese primero TMP 100 mM (PM 140,08) y TBP 100 mM (PM 266,32) en IPA respectivamente, y posteriormente mézclense en la proporción de 1:1. Prepárese un lote reciente cada semana del análisis y almacénese a 4°C para mantener la estabilidad.

Preparación de patrones y muestras

20 6. disolución de calibración de PL: pésese con precisión (+/- 0,1 mg) aproximadamente 10 mg de lecitina de Avanti (PA 5,9%, PE 10,4%, PI 8,3%, PC 14,0%, LPC 0,5%) en un vial de 2 ml. Añádanse 40 µl del estándar interno TMP 50 mM/TBP 50 mM, 100 µl de D₂O, y 860 µl de Detergente, y mézclese a conciencia mediante sometimiento a un vórtice durante media hora, e introdúzcanse 500 µl de disolución acuosa transparente en un tubo de RMN de 5 mm estándar después de centrifugar durante un tiempo*. La concentración de TMP y TBP es 2000 µM y 2000 µM respectivamente; los pesos moleculares de PA, PE, PI, PC, y PLC son aproximadamente 697, 716, 857, 758, y 496 respectivamente, así para 10,0 mg/ml de lecitina de Avanti, PA es 0,846 mM, PE es 1,453 mM, PI es 0,968 mM, PC es 1,847 mM, y LPC 0,101 mM.

25 7. disolución de muestra de aceite de soja bruto: sométase a vórtice el aceite y pésese con precisión (+/- 0,2 mg) aproximadamente 100 mg de aceite en un vial de 2 ml. Añádanse 100 µl de D₂O, y 900 µl de Detergente y mézclese a conciencia mediante vórtice durante media hora. Después de centrifugar un tiempo, introdúzcanse 600 µl de disolución acuosa transparente en un vial* y añádanse 24 µl de patrón interno TMP 50mM/TBP 50 mM y mézclese a conciencia, posteriormente introdúzcanse 500 µl de disolución acuosa transparente en un tubo de RMN de 5 mm, estándar.

30 8. Disolución de muestra de aceite desgomado: sométase a vórtice el aceite y pésese con exactitud (+/- 0,2 mg) aproximadamente 250 mg de aceite en un vial de 2 ml. Añádanse 100 µl de D₂O y 900 µl de detergente, y mézclense a conciencia sometiendo a vórtice durante media hora. Después de centrifugar durante un tiempo, introdúzcanse 600 µl de disolución acuosa transparente en un vial* y añádanse 24 µl de patrón interno TMP 50 mM/TBP 50 mM y mézclese a conciencia, posteriormente introdúzcanse 500 µl de disolución acuosa transparente en un tubo de RMN de 5 mm estándar.

35 9. Disolución de muestra de goma: pésese aproximadamente 10 mg (+/- 0,1 mg) (no más de 11 mg) en un vial de 2 ml. Añádanse 40 µl de patrón interno TMP 50 mM/TBP 12,5 mM, 100 µl de D₂O y 860 µl de detergente, y mézclense a conciencia sometiendo a vórtice durante media hora, e introdúzcanse 500 µl de disolución acuosa transparente en un tubo de RMN de 5 mm estándar después de centrifugar durante un tiempo*.

40 *La disolución de la muestra se separa en dos capas después de centrifugar. Se usa una jeringuilla de aguja para transferir la capa inferior de la disolución acuosa transparente al tubo de RMN. Se debe tener cuidado de no alterar la capa superior.

45 10. Disolución de muestra de aceite de cáñola bruto: sométase a vórtice el aceite y pésese con exactitud (+/- 0,2 mg) aproximadamente 250 mg de aceite en un vial de 2 ml. Añádanse 100 µl de D₂O y 900 µl de detergente, y mézclense a conciencia sometiendo a vórtice durante media hora. Después de centrifugar durante un tiempo, introdúzcanse 600 µl de disolución acuosa transparente en un vial* y añádanse 24 µl de patrón interno TMP 50 mM/TBP 50 mM y mézclese a conciencia, posteriormente introdúzcanse 500 µl de disolución acuosa transparente en un tubo de RMN de 5 mm estándar.

50 11. Disolución de muestra de desechos de agua: proporciónese una estimación del % v del aceite en el desecho del agua. Sométase a vórtice el desecho de agua e introdúzcanse 0,5 ml en un vial de 2 ml y pésese con exactitud (aproximadamente 500 mg). Añádanse 100 µl de D₂O y aproximadamente 400 µl de

ES 2 590 037 T3

5 detergente para obtener 1 ml de disolución (excluyendo el aceite arrastrado en los desechos de agua), y mézclense a conciencia sometiéndolo a vórtice. Después de centrifugar durante un tiempo, introdúzcanse 600 μ l de disolución acuosa transparente en un vial* y añádanse 24 μ l de patrón interno TMP 50 mM/TBP 50 mM y mézclense a conciencia, posteriormente introdúzcanse 500 μ l de disolución acuosa transparente en un tubo de RMN de 5 mm estándar.

*La disolución de la muestra se separa en dos capas después de centrifugar. Se usa una jeringuilla de aguja para transferir la capa inferior de la disolución acuosa transparente al tubo de RMN. Se debe tener cuidado de no alterar la capa superior.

Colección de datos para la determinación mediante RMN ^{31}P de los fosfolípidos y productos

10 Los conjuntos de parámetros de datos se han configurado para la operación automatizada de ICONNMR™ (Bruker BioSpin Corporation, Fremont, CA) con un ángulo de punta de 58 grados codificado para la alta potencia predeterminada. Insértese la muestra en una sonda con comandos "ej"/"ij". Compruébese $\text{edte} = 300,0$. En TopSpin utilícese la operación "rpar" primero y léase en el conjunto de parámetros P31_TBP_TMP_std. Váyase a la ventana de adquisición con "acq" y sintonícese la sonda QNP tanto para ^{31}P como para ^1H utilizando el comando "wobb".

15 "ej" la muestra y posteriormente procédase con la automatización de IconNMR utilizando la misma tabla de parámetros. En la automatización, las muestras se someten al método de acceso de cola y corren a su vez con compensación de antemano. Los parámetros editables son NS y D1. Para el tiempo asignado NS = 512-2048 proporciona la S/N adecuada. Los factores de escalamiento para dar razón de los diferentes tiempos de relajación se han acumulado y se deberían comprobar en un experimento de la muestra de lecitina de Avanti con cualquier

20 muestra.

Tabla 16

Datos de cribado de aceite (contenido de fosfolípidos, pequeña escala) para los aciertos del GeneReassembly:

Aceite	Tratamiento de enzima	Aceite: Mezcla	Peso del aceite (mg)	PA(%)	PE(%)	PI(%)	PC(%)	PL Total (%)	LPA(%)
Aceite de soja bruto	PI-PLCA1	200mgs	210,8	0,24	0,42	0,07	0,40	1,13	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLCA1	200mgs	214,7	0,23	0,42	0,06	0,39	1,09	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC B1	200mgs	211,4	0,24	0,47	0,05	0,44	1,20	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC B1	200mgs	214,5	0,24	0,44	0,18	0,43	1,28	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC B2	200mgs	210,9	0,26	0,48	0,07	0,47	1,28	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC B2	200mgs	211,4	0,26	0,48	0,06	0,47	1,26	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC G2	200mgs	211,6	0,25	0,47	0,05	0,45	1,22	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC G2	200mgs	210	0,24	0,45	0,05	0,43	1,18	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC A4	200mgs	209,9	0,24	0,43	0,15	0,41	1,23	0,01
Aceite de soja bruto	PI-PLC A4	200mgs	208,5	0,25	0,46	0,10	0,43	1,24	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC WT(SEQ ID NO: 6)	200mgs	212	0,22	0,41	0,20	0,41	1,24	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC WT(SEQ ID NO: 6)	200mgs	209,4	0,24	0,46	0,16	0,43	1,29	0,02

ES 2 590 037 T3

Aceite	Tratamiento de enzima	Aceite: Mezcla	Peso del aceite (mg)	PA(%)	PE(%)	PI(%)	PC(%)	PL Total (%)	LPA(%)
Aceite de soja bruto	Sin enzima	200mgs	211,3	0,21	0,39	0,22	0,38	1,20	0,00
Aceite de soja bruto	Sin enzima	200mgs	209,9	0,26	0,44	0,26	0,41	1,37	0,00
Aceite de cáñola bruto	Sin enzima	200mgs	194,7	0,17	0,13	0,20	0,34	0,85	0,00
Aceite de cáñola bruto	Sin enzima	200mgs	194,9	0,17	0,14	0,21	0,34	0,85	0,00
Aceite de cáñola bruto	Sin enzima	200mgs	196,1	0,18	0,14	0,22	0,35	0,89	0,00

Tabla 17

Aceite	LPE(%)	LPI(%)	LPC(%)	1-LPA(%)	1-LPE(%)	1-LPI(%)	1-LPC(%)	A(%)	E(%)	I(%)	C(%)	P Total (ppm)	P Total de PLS (ppm)
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	644	478
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	646	462
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	725	510
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	640	535
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	729	540
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	755	534
Aceite de soja bruto	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	729	516
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	733	498
Aceite de soja bruto	0,02	0,01	0,03	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	701	515
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	700	522
Aceite de soja bruto	0,01	0,01	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	657	518
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	737	540
Aceite de soja bruto	0,01	0,02	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	608	499
Aceite de soja bruto	0,01	0,01	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,00	0,02	759	569
Aceite de cáñola bruto	0,02	0,02	0,04	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	480	348
Aceite de cáñola bruto	0,01	0,01	0,04	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	474	349
Aceite de cáñola bruto	0,01	0,01	0,04	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	484	365

Tabla 18 - DATOS PROMEDIADOS

Aceite	Tratamiento de enzima	PA(%)	PE(%)	PI(%)	PC(%)	PL Total (%)	LPA(%)	LPE(%)	LPI(%)	LPC(%)
Aceite de soja bruto	PI-PLCA1	0,24	0,42	0,06	0,39	1,11	0,00	0,01	0,00	0,02
Aceite de soja bruto	PI-PLC B1	0,24	0,45	0,12	0,43	1,24	0,00	0,01	0,00	0,02
Aceite de soja bruto	PI-PLC B2	0,26	0,48	0,06	0,47	1,27	0,00	0,01	0,00	0,02
Aceite de soja bruto	PI-PLC G2	0,24	0,46	0,05	0,44	1,20	0,00	0,01	0,00	0,03
Aceite de soja bruto	PI-PLC A4	0,24	0,45	0,13	0,42	1,24	0,01	0,01	0,00	0,02
Aceite de soja bruto	PI-PLC WT(SEQ ID NO: 6)	0,23	0,44	0,18	0,42	1,27	0,01	0,01	0,01	0,02
Aceite de soja bruto	Sin enzima	0,23	0,42	0,24	0,40	1,29	0,00	0,01	0,01	0,02
Aceite de cáñola bruto	Sin enzima	0,17	0,14	0,21	0,34	0,87	0,00	0,01	0,01	0,04

Tabla 19 - DATOS PROMEDIADOS

Aceite	1-LPA(%)	1-LPE(%)	1-LPI(%)	1-LPC(%)	A(%)	E(%)	I(%)	C(%)	P Total (ppm)	P Total de PLs (ppm)
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	645,40	470,17
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	682,44	522,47
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	741,94	536,72
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	730,76	506,92
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	700,48	518,82
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	697,17	528,75
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	683,32	533,87
Aceite de caríola bruto	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	479,51	354,10

ES 2 590 037 T3

Desgomado a gran escala con PI - PLC y ePLC o PI - PLC con PLC (SEQ ID NO: 2), con los resultados resumidos en las Tablas 20, 21 y 22, debajo. Los aceites se trataron (o no se trataron, en el caso del control) con enzima utilizando este "Procedimiento de Aceite a Gran Escala":

Procedimiento de Aceite a Gran Escala

- 5 Objetivo: Comparar la actividad de PLC, PI-PLC, PLCs "Evolucionadas" (o "ePLCs") del Ejemplo 2 anterior, en 2 kg de aceite de soja bruto.

Aceite:

Aceite de soja bruto

FFA: 0,24%

10 pH: 6,97

DAG: 0,27% 1,2 + 0,24% 1,3 = 0,51% DAG total

PLs: 0,21% PA, 0,43% PE, 0,25% PI, 0,44% PC (1,34% PLs totales); sin LPA, 0,01% LPE, sin LPI, 0,02% LPC, sin 1-LPLs; 0,01% A, sin E, I o C; 661 ppm de fósforo total, de los cuales 628,6 ppm proceden de PLs

CP: 742 ppm P, 73,8 ppm Ca, 69,8 ppm Mg, 0,0 ppm Fe

15 Enzimas:

PLC (SEQ ID NO:2)

Requieráanse 5,5 unidades = 200 ppm = 0,4 g/2000 g de aceite

Calientese previamente el aceite hasta 60°C con mezclamiento continuo a 200 rpm.

Trasládese el aceite precalentado a un mezclador de alto cizallamiento.

20 Comiéntese a mezclar a baja velocidad.

Añádanse 0,4 g de PLC (SEQ ID NO:2) + 60 g de agua a temperatura ambiente al aceite precalentado mientras se mezcla.

Ajústese el mezclador de alto cizallamiento a 6 (velocidad más elevada) durante 1 minuto.

25 Llévese nuevamente la muestra al mezclador de paletas y agítese continuamente a 200 rpm a 60°C durante 2 horas. Ajústese la temperatura hasta 80°C.

Recójase la muestra no centrifugada y almacénese a RT para el análisis.

Una vez que la temperatura del aceite alcance 80C, centrifúguese usando una centrifugadora Gyro tester.

Fosfolipasa evolucionada 8 (Ejemplo 2, Tabla 9) – 11,5 U/mg

Requieráanse 5,5 unidades/g de aceite, reacción 2 kg o 2000 g = 11000 unidades total

30 Requieráanse 11.000 unidades/11,5 U/mg = 957 mg

Aceite bruto: pésense 958,6 mg x 11,5 U/mg= 11.024 unidades. Resuspéndanse las muestras en 60 g de agua inmediatamente antes de la adición al aceite bruto.

Fosfolipasa evolucionada 156 (Ejemplo 2, Tabla 9) – 17,2 U/mg

Requieráanse 5,5 unidades/g de aceite, reacción 2 kg o 2000 g = 11000 unidades total

35 Requieráanse 11.000 unidades/17,2 U/mg = 640 mg

Aceite bruto: pésense 642,49 mg x 17,2 U/mg= 11.049 unidades. Resuspéndanse las muestras en 60 g de agua inmediatamente antes de la adición al aceite bruto.

SEQ ID NO:8 – 4,2 U/mg

Requieráanse 0,02 unidades/g de aceite, reacción 2 kg o 2000 g = 40 unidades total

40 Requieráanse 40 unidades/4,2 U/mg = 9,5 mg

ES 2 590 037 T3

Aceite bruto: pésense 9,6 mg x 4,2 U/mg= 40,32 unidades. Resuspéndanse las muestras en 60 g de agua inmediatamente antes de la adición al aceite bruto.

Fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8 - 2 h: pésense 959,2 mg de fosfolipasa evolucionada 8 PH045 x 11,5 U/mg = 11.031 unidades. Pésense 9,8 mg de SEQ ID NO:8 x 4,2 U/mg = 41,16 unidades

- 5 Fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8 - 4 h: pésense 959,1 mg de fosfolipasa evolucionada 8 PH045 x 11,5 U/mg = 11.030 unidades. Pésense 9,8 mg de SEQ ID NO:8 x 4,2 U/mg = 41,16 unidades

Resuspéndanse las muestras en 60 g de agua inmediatamente antes de la adición al aceite bruto y fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO:8 al mismo tiempo.

Condiciones de reacción:

- 10 2000 g de aceite se pesaron en un vaso de precipitados de 4 l. El aceite se precalentó a 60C sobre una placa de calentamiento con control de temperatura de retroalimentación (Barnstead/Themolyne mirak)

El aceite se precalentó a 60C con agitación continua a ~ 200 rpm antes de la adición de la enzima.

- 15 Las muestras se movieron al mezclador de alta velocidad, enzima + 60 g de agua a temperatura ambiente al aceite pre calentado mezclando a baja velocidad, posteriormente inmediatamente se mezclaron con cizallamiento elevado (velocidad máxima) durante 1 minuto.

Muévase la muestra al mezclador de paletas y agítese continuamente a 200 rpm a 60C durante 2 horas.

Ajústese la temperatura a 80C. Recójase la muestra de aceite no centrifugada y almacénese a -20C para el análisis

Una vez que la temperatura del aceite alcanza 80C, centrifúguese utilizando una centrifugadora de alta velocidad.

Tabla 20						
Descripción del ensayo de aceite	% de 1,2-DAG Promedio	% de 1,3-DAG Promedio	Suma de 1,3 y 1,2 DAG	DAG Neto	% DAG máx. teórico obtenido	Acido graso libre (titulación)
aceite de soja bruto	0,36	0,32	0,68	0,00		0,47
aceite pre-centrifugado tratado de SEQ ID NO: 2 *	1,11	0,33	1,44	0,76	80	0,47
aceite centrifugado tratado de SEQ ID NO: 2 *	0,98	0,33	1,32	0,64	68	0,24
aceite pre-centrifugado tratado con fosfolipasa 8 evolucionada *	1,56	0,33	1,88	1,20	128	0,48
aceite centrifugado tratado con fosfolipasa 8 evolucionada *	1,78	0,39	2,16	1,48	158	0,24
aceite pre-centrifugado tratado con fosfolipasa 156 evolucionada *	1,44	0,32	1,76	1,08	114	0,49
aceite centrifugado tratado con	1,48	0,34	1,82	1,14	121	0,25

Tabla 20						
Descripción del ensayo de aceite	% de 1,2-DAG Promedio	% de 1,3-DAG Promedio	Suma de 1,3 y 1,2 DAG	DAG Neto	% DAG máx. teórico obtenido	Acido graso libre (titulación)
fosfolipasa 156 evolucionada *						
aceite pre-centrifugado tratado con SEQ ID NO: 8 **	0,66	0,32	0,98	0,30	157	0,48
aceite centrifugado tratado con SEQ ID NO: 8 **	0,55	0,34	0,90	0,22	112	0,21
aceite pre-centrifugado tratado 2 h con fosfolipasa 8 evolucionada + SEQ ID NO: 8 ***	1,71	0,33	2,04	1,36	119	0,71
aceite centrifugado tratado 2 h con fosfolipasa 8 evolucionada + SEQ ID NO: 8 ***	1,87	0,37	2,23	1,55	136	0,24
aceite pre-centrifugado tratado 4 h con fosfolipasa 8 evolucionada + SEQ ID NO: 8 ***	1,99	0,38	2,37	1,69	148	0,72
Aceite centrifugado tratado 4 h con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8 ***	1,92	0,38	2,30	1,62	142	0,21

DAG Neto = Suma de 1,3 y 1,2 DAG Generados - DAG Endógeno

% DAG máx. teórico obtenido = (DAG Neto/DAG máx. teórico)*100

aceite de soja bruto 06 17 08: PC = 0,47, PE = 0,46, PA = 0,22, PI = 0,27

* DAG máx. teórico de los valores de RMN de PL PC, PE y PA = (%PC*0,78) + (%PE*0,83) + (%PA*0,89) = 0,94

5 ** DAG máx. teórico del valor de RMN de PL, PI = (%PI*0,72) = 0,194

*** DAG máx. teórico de los valores de RMN de PL, PC, PE, PA y PI = (%PC*0,78) + (%PE*0,83) + (%PA*0,89) + (%PI*0,72) = 1,14

ES 2 590 037 T3

Tabla 21

Descripción de los ensayos de aceite	PA(%)	PI(%)	PE(%)	PC(%)	PA(%) SD	PI(%) SD	PE(%) SD	PC(%) SD	% de eliminación de PA
aceite de soja bruto	0,21	0,26	0,43	0,45	0,01	0,01	0,01	0,02	0
aceite pre-centrifugado tratado con SEQ ID NO: 2	0,20	0,25	0,18	0,06	0,00	0,00	0,00	0,01	7
aceite centrifugado tratado con SEQ ID NO: 2	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	77
aceite pre-centrifugado tratado con fosfolipasa 8 evolucionada	0,04	0,22	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	80
aceite centrifugado tratado con fosfolipasa 8 evolucionada	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	85
aceite pre-centrifugado tratado con fosfolipasa 156 evolucionada	0,05	0,08	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	75
aceite centrifugado tratado con fosfolipasa 156 evolucionada	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	83
aceite pre-centrifugado tratado con SEQ ID NO: 8	0,20	0,00	0,42	0,41	0,01	0,00	0,01	0,00	0
aceite centrifugado tratado con SEQ ID NO: 8	0,07	0,00	0,05	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00	65
aceite pre-centrifugado tratado 2 h con fosfolipasa 8 evolucionada + SEQ ID	0,07	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	67

ES 2 590 037 T3

Descripción de los ensayos de aceite	PA(%)	PI(%)	PE(%)	PC(%)	PA(%) SD	PI(%) SD	PE(%) SD	PC(%) SD	% de eliminación de PA
NO: 8									
aceite centrifugado, tratado 2 h con fosfolipasa 8 evolucionada + SEQ ID NO: 8	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	82
aceite pre-centrifugado tratado 4 h con fosfolipasa 8 evolucionada + SEQ ID NO: 8	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	74
Aceite centrifugado tratado 4 h con fosfolipasa 8 evolucionada + SEQ ID NO: 8	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	86

Tabla 22

Descripción de los ensayos de aceite	PA(%)	PI(%)	PE(%)	PC(%)	PA(%) SD	PI(%) SD	PE(%) SD	PC(%) SD	A(%)	I(%)	E(%)	C(%)
Gomas tratadas con SEQ ID NO: 2	3,60	5,21	5,19	2,96	0,10	0,26	0,28	0,14	0,14	0,00	1,17	2,54
Gomas tratadas con fosfolipasa 8 evolucionada	0,49	6,28	0,04	0,00	0,06	0,40	0,07	0,00	1,22	0,00	3,25	4,41
Gomas tratadas con fosfolipasa 156 evolucionada	1,32	6,67	0,56	0,00	0,06	0,24	0,06	0,00	0,84	0,00	2,85	4,02
Gomas tratadas con SEQ ID NO: 8	2,65	0,63	7,20	7,15	0,10	0,04	0,34	0,24	0,09	0,86	0,03	0,12
Gomas tratadas 2 h con fosfolipasa 8 evolucionada + SEQ ID NO: 8	1,35	0,90	0,85	0,28	0,06	0,13	0,05	0,26	1,23	2,98	3,50	4,90
Gomas tratadas 4 h con fosfolipasa 8 evolucionada + SEQ ID NO: 8	0,95	0,31	0,39	0,08	0,11	0,06	0,03	0,13	1,34	4,50	3,57	4,83

Tabla 23

Descripción de los ensayos del aceite	LPA(%)	LPE(%)	LPI(%)	LPC(%)	1-LPA(%)	1-LPE(%)	1-LPI(%)	1-LPC(%)	X(uM) 12,9ppm
Acete de soja bruto	0,00	0,01	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0
Gomas tratadas con SEQ ID NO: 2	0,23	0,40	0,58	0,46	0,05	0,00	0,10	0,00	0
Gomas tratadas con fosfolipasa 8 evolucionada	0,33	0,00	0,29	0,28	0,55	0,00	0,00	0,00	60,9
Gomas tratadas con fosfolipasa 156 evolucionada	0,00	0,03	0,36	0,55	0,46	0,00	0,00	0,00	0
Gomas tratadas con SEQ ID NO: 8	0,00	0,28	0,00	0,54	0,00	0,00	0,00	0,00	439,5
Gomas tratadas 2 h con fosfolipasa 8 evolucionada + SEQ ID NO: 8	0,26	0,20	0,00	0,62	0,60	0,00	0,00	0,00	526,9
Gomas tratadas 4 h con fosfolipasa 8 evolucionada + SEQ ID NO: 8	0,16	0,07	0,00	0,34	0,63	0,00	0,00	0,00	265,5

Posteriormente, las muestras se analizaron para el contenido de fosfolípidos (datos PL) utilizando RMN, como se describe anteriormente. Las muestras también se analizaron para el contenido de DAG (DAG FFA) utilizando los siguientes protocolos de HPLC:

5 Determinación de diacilglicerol en el aceite vegetal mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento con detector evaporativo de dispersión de luz

Este método se basa en el método Cd 11d-96 de AOCS, según se describe en Mono- and Diglycerides Determination by HPLC-ELSD (AOCS Official Method Cd 11d-96), con algunas modificaciones. Un cambio significativo es la adopción del aceite ENOVA™ como el estándar para fines de cuantificación. El método de AOCS utiliza dipalmitina (C16:0) como el patrón. Sin embargo, en el aceite vegetal, la C16:0 solo da razón de ~10%, mientras que C18:0, C18:1, y C18:2 representan casi 90%. En el cromatograma de HPLC, no solo es diferente la forma del pico de dipalmitina de aquella de los diacilgliceroles (DAG) reales en el aceite vegetal, la respuesta del detector para dipalmitina también es diferente de C18 DAG. Ambos factores afectan el resultado de la cuantificación debido a que el detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) es un detector no lineal. El aceite ENOVA™ es un aceite con alto contenido de DAG producido a través de un proceso patentado por ADM que utiliza aceite de soja y aceite de cáñola como materia prima, el cual tiene una distribución de ácidos grasos similar al aceite vegetal normal y por lo tanto un mejor patrón para la cuantificación del DAG en el aceite vegetal. La cantidad de DAG en el aceite ENOVA™ se puede determinar utilizando el AOCS Official Method Cd 11b-91 (2) y el método de RMN ³¹P (3, 4).

Preparación de disoluciones de la muestra y del patrón:

20 1. disolución de la muestra: pénsese con precisión muestras de aceite de aproximadamente 50 µl y añádanse 950 µl de hexano/isopropanol = 9:1 para obtener 1 ml de disolución.

2. disoluciones patrón: el rango de 1,2-DAG y 1,3-DAG en las disoluciones patrón cubrirá la concentración DAG real en la disolución de la muestra. Un ejemplo es 5 disoluciones de aceite ENOVA™ con concentración de 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, y 4 mg/ml, respectivamente.

Ajustes de HPLC:

25 Columna: Chromegasphere SI-60, 15 cm x 4,6 mm

Temperatura: 40°C

Caudal: 2 ml/min.

Volumen de inyección: 20 µl

Fase móvil A: Hexano

30 Fase móvil B: Hexano/Isopropanol/Acetato de Etilo/Ácido fórmico = 800:100:100:1

Elución en gradiente:

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

Ajustes de ELSD:

35 Los parámetros de ELSD Sedex 75 serán optimizados para maximizar la sensibilidad. Éstos incluyen temperatura, ganancia, presión del gas nebulizador, y la posición de la celda de vidrio. Un ejemplo típico es temperatura 40°C, ganancia 5, y gas de nitrógeno 3,5 bares.

Cuantificación e identificación del pico

40 Identifíquese el pico de DAG mediante comparación del tiempo de retención con aquél del patrón. La cuantificación se basa en la relación entre la respuesta I del detector (Área del Pico) y la concentración del analito C: $I = K \cdot C^M$, aquí K y M son constantes relacionadas con las condiciones experimentales.

Referencias

1. Mono- and Diglycerides Determination by HPLC-ELSD (AOCS Official Method Cd 11d-96).

2. Determination of Mono- and Diglycerides by Capillary Gas Chromatography (AOCS Official Method Cd 11b-91).

3. Spyros, A.; Dais, P. Application of ³¹P NMR Spectroscopy in Food Analysis. 1. Quantitative Determination of the Mono- and Diglyceride Composition of Olive Oils, *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 802-805.

4. Vigli, G.; Philippidis, A.; Spyros, A.; Dais, P. Classification of Edible Oils by Employing ³¹P and ¹H NMR Spectroscopy in Combination with Multivariate Statistical Analysis. A Proposal for the Detection of Seed Oil Adulteration in Virgin Olive Oils, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5715-5722.

El acierto del GR líder "G2" se optimizó en los codones:

La optimización de los codones se intentó dos formas diferentes en el ORF subclonado (opt de codones V1 de G2 y opt de codones V2 de G2) y con el segundo método que proporciona una variante mucho más altamente expresable. Para la opt de codones V1 de G2, los codones originales cuyo uso en el ORF subclonado cayó por debajo de 15-25% para *P. fluorescens*, se cambiaron a codones en *P. fluorescens* con un uso > 30%. Adicionalmente se utilizaron dos codones de parada TGA en el extremo 3' del ORF.

Opt de codones V1 de G2 (SEQ ID NO: 9):

```
ATGGCCAGCAGCATCAACGTCCTCGAAAACCTGGTCGCGCTGGATGAAGCCGATCAACGACG
ACATCCCCGCTGGCCCGCATCAGCATCCCGGGCACCCACGACAGCGGCACCTTCAAGCTGCA
GAACCCGATCAAGCAGGTCTGGGGCATGACCCAGGAATACGACTTCCGCTACCAGATGGAC
CACGGCGCCCGCATCTTCGACATCCGCGGCCGCTGACCGACGACAACACCATCGTGCTGC
ACCACGGCCCGCTGTACCTGTACGTGACCCTGCACGAATTCATCAACGAAGCCAAGCAGTTC
CTGAAGGACAACCCGAGCGAAACCATCATCATGAGCCTGAAGAAAGAATACGAAGACATGA
AGGGCGCCGAAAGCAGCTTCAGCAGCACCTTCGAAAAGAAGTACTTCCGCGACCCGATCTTC
CTGAAGACCGAAGGCAACATCAAGCTGGGCGACGCCCGCGGCAAGATCGTCCCTCCTGAAGC
GCTACAGCGGCAGCAACGAAAGCGGCGGCTACAACCTTCTTCTACTGGCCGGACAACGAAAC
CTTCACCAGCACCATCAACGGCAACGTGAACGTGACCGTGCAGGACAAGTACAAGGTGAGC
CTGGACGAAAAGATCAACGCCATCAAGGACACCCTGAACGAAACCATCAACAACAGCGAAG
ACGTGAACCACCTGTACATCAACTTCACCAGCCTGAGCAGCGGCGGCACCCGCTGGACCAG
CCCGTACTACTACGCCAGCCGCATCAACCCGAAATCGCCAACACTACATCAAGCAGAAGAACC
CGACCCGCGTGGGCTGGATCATCCAGGACTTCATCAACGAAAAGTGGCACCCGCTGCTGTA
CCAGGAAGTGATCAACGCGAACAAGAGCCTGGTCAAGTGATGA
```

Para la opt de codones V2 de G2, se seleccionaron codones de *P. fluorescens* de modo que su uso (%) coincidió más estrechamente con el uso (%) de cada codón según se encuentra en el ORF original. Éste es un proceso que denominamos Transferencia del Uso de Codones. Adicionalmente, la estructura secundaria de ARNm predicha del transcrito se minimizó para prevenir vástagos-lazos y horquillas al inicio de la traducción (una ventana de nucleótidos en el ARNm desde -65 hasta +65, donde la traducción comienza en +1 con el nucleótido "A" de "ATG" que es el código para la primera metionina de la proteína). En esta minimización, se utilizaron codones sinónimos con uso (%) similar para reducir los apareamientos nucleótido-nucleótido no deseados. Como antes, se utilizaron dos codones de parada TGA en el extremo 3' del ORF.

Opt de codones V2 de G2 (SEQ ID NO: 10):

ES 2 590 037 T3

ATGGCGAGCAGCATCAACGTCTTGGAGAACTGGTCCCAGGTGGATGAAGCCCAT
 CAACGACGATATCCCCTGGCCCGTATCTCGATCCCAGGGCACCCACGACAGCGGCAC
 CTTTAACTCCAGAACCCCAATCAAACAGGTCTGGGGCATGACCCAGGAGTACGACTTC
 CGCTACCAGATGGACCACGGCGCCCGGATCTTCGACATCCGGGGGCGCCTGACCGAC
 GACAACACCATCGTGCTGCACCACGGGCCGCTGTACCTGTACGTGACCTTGCATGAGT
 TCATCAATGAGGCGAAGCAGTTCCTGAAGGACAACCCGAGCGAAACCATCATCATGTC
 CCTGAAGAAAGAATACGAAGACATGAAGGGGGCGGAGAGTTTGGTTGAGCAGCACCTT
 CGAAAAGAACTACTTCCGCGACCCGATTTTCTGAAGACCGAGGGCAACATCAAAGTG
 GGCGACGCCCGCGGCAAGATCGTGCTGTTGAAGCGGTACAGCGGCAGCAACGAGTC
 CGGGGGCTACAACCTCTTTTACTGGCCGGATAACGAAACCTTCACTTCGACGATCAAC
 GGCAACGTGAACGTGACCGTGCAGGACAAGTACAAGGTCAGCCTCGACGAAAAGATC
 AATGCCATCAAGGACACCCTGAACGAGACCATCAATAACAGCGAGGACGTGAACCACT
 TGTACATCAACTTACCAGTCTCTCCTCCGGCGGCACCGCCTGGACCAGCCCGTACTA
 CTACGCGAGTCGTATCAACCCCGAGATCGCCAACACTACATCAAACAGAAAAACCCACC
 CGGGTCGGTTGGATCATCCAGGACTTCATCAACGAGAAGTGGCACCCGCTGCTGTAC
 CAGGAGGTGATCAACGCGAACAAATCGCTGGTGAAGTGATGA

Los datos que comparan fermentaciones de 30L de G2 (SEQ ID NO: 8) y sus versiones optimizadas para codones (SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10) se resumen en la Tabla 24. Las fermentaciones fueron en el sistema de *P. fluorescens* descrito anteriormente. Los datos que comparan la termotolerancia entre la SEQ ID NO: 10 optimizada para codones frente a SEQ ID NO: 8 se resumen en la Tabla 25. La termotolerancia se midió según se describe anteriormente.

5

Tabla 24

Tiempo	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10
24		1,90E+06	
28		3,31E+06	
29	8,98E+05		
32		3,82E+06	
33	1,62E+06		
36		4,94E+06	
37	2,47E+06		
40		4,81E+06	
41	3,82E+06		
44		5,46E+06	
45	5,28E+06		
46			4,38E+06
48		5,26E+06	
49	6,04E+06		
50			9,02E+06
52		5,64E+06	
53	5,27E+06		

ES 2 590 037 T3

Tiempo	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10
54			1,14E+07
56		1,19E+07	
58			2,02E+07
60		6,22E+06	
62			1,93E+07
66			1,88E+07
70			1,53E+07
75			1,22E+07

Tabla 25

	SEQ ID NO:8	SEQ ID NO:10
Temperatura ambiente °C	100,00%	100,00%
55°C	99,12%	134,05%
60°C	116,64%	108,53%
65°C	107,96%	108,16%
70°C	49,12%	56,78%

5 Los datos que comparan la actividad de G2 (SEQ ID NO: 8) y su versión optimizada para codones (SEQ ID NO: 10) se resumen en la Tabla 26. Los ensayos se realizaron utilizando el procedimiento de aceite a pequeña escala según se describe anteriormente.

Tabla 26

DATOS PROMEDIADOS											
Nº de muestra	Experimento	PA(%)	PE(%)	PI(%)	PC(%)	PL Total (%)	LPA(%)	LPE(%)	LPI(%)	LPC(%)	1-LPA(%)
1	SEQ ID NO:8 – 0,4U/g	0,18	0,48	0,02	0,47	1,14	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00
2	SEQ ID NO:8 – 0,2U/g	0,16	0,43	0,00	0,43	1,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00
3	SEQ ID NO:8 – 0,1U/g	0,18	0,46	0,05	0,50	1,19	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00
4	SEQ ID NO:8 – 0,05U/g	0,16	0,43	0,05	0,44	1,08	0,01	0,02	0,00	0,03	0,00
5	SEQ ID NO:10 – 0,4U/g	0,19	0,51	0,00	0,53	1,23	0,01	0,02	0,00	0,03	0,00
6	SEQ ID NO:10 – 0,2U/g	0,15	0,41	0,00	0,44	1,00	0,01	0,02	0,00	0,03	0,00
7	SEQ ID NO: 10 – 0,1U/g	0,15	0,41	0,07	0,41	1,05	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00
8	SEQ ID NO:10 - 0.05U/g	0,16	0,45	0,07	0,45	1,13	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00
9	Sin Enzima (Control)	0,17	0,46	0,23	0,47	1,33	0,00	0,02	0,02	0,03	0,00

DATOS PROMEDIADOS										
Nº de muestra	Experimento	1-LPE(%)	1-LPI(%)	1-LPC(%)	A(%)	E(%)	I(%)	C(%)	P Total (ppm)	P Total de PLs (ppm)
1	SEQ ID NO:8 - 0,4U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,16	0,00	804,49	485,05
2	SEQ ID NO:8 - 0,2U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,16	0,00	743,13	429,86
3	SEQ ID NO:8 - 0,1U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,10	0,00	794,03	500,55
4	SEQ ID NO:8 - 0,05U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,08	0,00	710,86	453,40
5	SEQ ID NO: 10 - 0,4U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,24	0,00	943,30	523,00
6	SEQ ID NO:10 - 0,2U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,16	0,00	731,12	423,97
7	SEQ ID NO: 10 - 0,1U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,04	0,00	632,84	440,85
8	SEQ ID NO:10 - 0,05U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,05	0,00	681,24	476,04
9	Sin Enzima (Control)	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	711,84	551,23

Dosificación

5 La dosificación de la enzima se puede definir mediante el número de “unidades” de enzima a añadir por gramo de aceite a tratar, donde una unidad (U) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 umol de 4-metilumbeliferona a partir de mio-inositol-1-fosfato de 4-metilumbeliferilo 4,5 mM, sal de N-metil-morfolina, en un minuto a pH 7,5 y 30°C. En una realización, la dosis de PLC (por ejemplo utilizando la SEQ ID NO: 2) o ePLC varía dentro del rango desde 1-50 U/g de aceite, mientras que la dosis de PI-PLC varía dentro del rango desde 0,05 - 20 U/g de aceite. En otra realización, se utilizan dosis en el rango de 1 - 20 U/g de aceite de PLC o ePLC y 0,05 - 2 U/g de aceite de PI-PLC. En otra realización, se utilizan dosis en el rango de 2 - 10 U/g de aceite de PLC o ePLC y 0,1-1 U/g de aceite de PI-PLC. En una realización alternativa, la dosis de PLC (por ejemplo, utilizando la SEQ ID NO: 2) o ePLC es 5,5 U/g de aceite, y para PI-PLC es 0,2 U/g de aceite.

15 Alternativamente, la dosis se puede determinar utilizando la actividad específica de la enzima para convertir el número de unidades de enzima requeridas por gramo de aceite al peso de la enzima (ug) requerido por gramo de aceite. Específicamente, el número de unidades requeridas se divide entre la actividad específica (U/mg) de la enzima para llegar a los ug requeridos de enzima. Por ejemplo, una dosis de 0,2 U de enzima/gramo de aceite dividida entre una actividad específica de 90,1 U/mg da como resultado una dosis de 2,22 ug de enzima/g de aceite. Por consiguiente, en una realización, la dosis de PI-PLC varía dentro del rango desde 0,55 - 222 ug de enzima/g de aceite. En otra realización, se utilizan dosis en el rango de 0,55 - 22,2 ug de enzima/g de aceite de PI-PLC. En otra realización, se utilizan dosis en el rango de 1,11 - 11,1 ug de enzima/g de aceite de PI-PLC. En una realización alternativa, la dosis de PI-PLC es 2,22 ug de enzima/g de aceite.

25 En realizaciones alternativas, la invención también proporciona combinaciones o mezclas de enzimas que comprenden una PI-PLC de la invención y al menos otra enzima, por ejemplo una enzima fosfolipasa, por ejemplo una descrita en la Tabla 8, o en la Tabla 9, o en el documento WO 2008/036863. Por ejemplo, en realizaciones alternativas, la invención también proporciona combinaciones o mezclas de enzimas que comprenden una PI-PLC de la invención y la SEQ ID NO: 2, que no tiene una secuencia señal, codificada por ejemplo mediante la SEQ ID NO: 1; o la SEQ ID NO: 4, que tiene una secuencia señal (equivalente a la SEQ ID NO: 2 con una secuencia señal), codificada por ejemplo mediante la SEQ ID NO: 3; o que incluyen cualquiera de las enzimas ePLC descritas en el Ejemplo 2 (por ejemplo, véanse las Tablas 8 y 9), y en el documento WO 2008/036863, que describe variantes de la SEQ ID NO: 4 (codificada por ejemplo mediante la SEQ ID NO: 3). En realizaciones alternativas, la invención también proporciona combinaciones o mezclas de enzimas que comprenden una PI-PLC de la invención, por ejemplo variantes de la SEQ ID NO: 6 (codificada por ejemplo mediante la SEQ ID NO: 5) según se describe aquí, o variantes de la SEQ ID NO: 8 (codificada por ejemplo mediante la SEQ ID NO: 7, y la SEQ ID NO: 10 y SEQ ID NO: 9 optimizadas para codones).

35 Los Ejemplos 4-9 son ejemplos de control. Los Ejemplos 10-16 describen los métodos ejemplares proporcionados aquí.

En cada uno de los ejemplos de abajo, el mezclador de cabeza fue el mezclador digital RW 20 de IKA con una paleta de cuchilla plana; operado en 200 rpm para agitación normal y 350 rpm para agitación vigorosa. La centrifugadora fue una centrifugadora de tipo DeLaval Gyro-Tester instalada con “La Unidad de Tazón” para

separación continua. El tazón de la centrifugadora se cerró con los tornillos tapón instalados. El mezclamiento con cizallamiento se realizó con el homogenizador T-50 basic Ultra-Turrax de IKA con un elemento de dispersión S 50 N - G 45 G a 10.000 rpm. La enzima PLA1 fue Lecitase® Ultra (número de lote LYN05015A que contiene 11,7 Unidades/mg) vendida por Novozymes A/S de Dinamarca. La enzima PLC fue PLC Purifine® (número de lote 90BU006A1 o 190DU001A1 que contiene 26,0 o 28,6 Unidades/mg respectivamente) y la PI-PLC (SEQ ID NO: 8) que contiene 4 Unidades/mg fueron proporcionadas por Verenum Corporation de San Diego, California. La reacción tuvo lugar en un vaso de precipitados de 4 litros y se cubrió con una envoltura de plástico para reducir o eliminar cualquier pérdida de agua. La cantidad de fosfolípidos restantes en el aceite tratado se midió como ppm de P de conformidad con el método de American Oil Chemists' Society Official Method Ca 20-99, "Analysis of Phosphorus in Oil by Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectroscopy". El ácido graso libre (FFA) se midió utilizando el American Oil Chemists' Society Official Method Ca 5a-40. La humedad se midió utilizando American Oil Chemists' Society Official Method Ca 2c-25. El aceite neutro se midió utilizando el método establecido en el Apéndice debajo. La materia insoluble en acetona que incluye fosfolípidos se midió utilizando American Oil Chemists' Society Official Method Ja 4-46. El índice de Acidez se midió utilizando el American Oil Chemists' Society Official Method Ja 6-55. Los procedimientos de RMN P-31 y las mediciones de Diacilglicerol (DAG) mediante Cromatografía de Líquidos de Alto Rendimiento con Detector Evaporativo de Dispersión de la Luz (HPLC-ELSD), se realizaron mediante los procedimientos según se dan a conocer por Verenum Corporation (entonces conocida como Diversa Corporation), "Analytical Profiling of Small Scale Reactions of phospholipase-C mediated Vegetable Oil Degumming," de la reunión American Oil Chemists Society 2007.

20 **Ejemplo 4: Control - Desgomado con Agua a un pH neutro**

2001,2 gramos de aceite de soja bruto que contiene 696,3 ppm de fósforo se calentaron a 70 – 74°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Al aceite caliente, se añadieron 60,0 gramos de agua desionizada. La mezcla de aceite/agua se agitó a 450 rpm durante 1 minuto. El agitador se desaceleró hasta 100 rpm durante 30 minutos para flocular e hidratar las gomas. El aceite tratado con agua se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite desgomado con agua fue 80,0 ppm, el FFA fue 0,22%, y el DAG fue 0,34%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 108,5 gramos.

25 **Ejemplo 5: Control - Desgomado con PLC a un pH neutro**

2003,8 gramos de aceite de soja bruto que contiene 696,3 ppm de fósforo se calentaron a 60°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron 0,50 gramos de lipasa PLC Purifine® de Verenum (número de lote 90BU006A1) seguido de 60 gramos de agua desionizada, y la mezcla completa se mezcló con cizallamiento durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60°C. El aceite tratado con enzima se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLC a pH neutro produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 47,0 ppm. El FFA fue 0,20% y el DAG fue 0,61%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 85,5 gramos.

35 **Ejemplo 6: Control - Desgomado con PI-PLC (SEQ ID NO: 8) a un pH neutro**

2001,8 gramos de aceite de soja bruto que contiene 696,3 ppm de fósforo se calentaron a 60°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron 0,0110 gramos de una PI-PLC (SEQ ID NO: 8) proporcionada por Verenum a un vaso de precipitados de 10 ml y se disolvieron en 1 ml de agua desionizada. Una vez que la proteína se había disuelto en el agua, la disolución de la enzima se añadió al aceite. El vaso de precipitados se enjuagó tres veces con aproximadamente 1 ml de agua a fin de asegurar que se añadió toda la enzima. El resto del agua que se añadió para una cantidad total de agua añadida fue 60 gramos. La mezcla de aceite-enzima-agua se mezcló con cizallamiento durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60°C. El aceite tratado con enzima se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en la reacción tratada con PI-PLC a pH neutro que produjo un aceite desgomado fue 50,3 ppm. Se encontró que el FFA fue 0,18% y el DAG fue 0,49%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 102,5 gramos.

40 **Ejemplo 7: Control - Desgomado con PI-PLC (SEQ ID NO: 8) más PLC a un pH neutro**

2000,2 gramos de aceite de soja bruto que contiene 696,3 ppm de fósforo se calentaron a 60°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron 0,50 gramos de lipasa PLC Purifine® de Verenum (número de lote 90BU006A1) al aceite, seguido de 0,0104 gramos de una PI-PLC (SEQ ID NO: 8) proporcionada por Verenum que se añadieron a un vaso de precipitados de 10 ml y se disolvieron en 1 ml de agua desionizada. Una vez que la proteína se había disuelto, la disolución de la enzima se añadió al aceite. El vaso de precipitados se enjuagó tres veces con aproximadamente 1 ml de agua a fin de asegurar que se añadió toda la enzima al aceite. El resto del agua que se añadió para un volumen total de agua añadida fue 60 gramos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 45°C. El aceite tratado con enzima se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en la reacción tratada con PLA1-PI-PLC a pH neutro produjo aceite desgomado con un fósforo residual de 50,0 ppm. El FFA fue 0,24% y el DAG fue 0,85%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 84,2 gramos.

Ejemplo 8: Control - Desgomado con PLA₁ a un pH neutro

2000,6 gramos de aceite de soja bruto que contiene 694,1 ppm de fósforo se calentaron a 45°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Con la temperatura mantenida a 45°C, se añadieron 0,10 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1 número de lote LYN05015) seguido de 60 gramos de agua desionizada, y la mezcla completa se mezcló con cizallamiento durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 240 minutos a una temperatura de 45°C. El aceite tratado con enzima se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en la reacción tratada con PLA1 a pH neutro produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 27,2 ppm. El FFA fue 0,60% y el DAG fue 0,33%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 90,0 gramos.

10 Ejemplo 9: Control - Desgomado con PLA₁ a pH 4,5

2001,2 gramos de aceite de soja bruto que contiene 641,6 ppm de fósforo se calentaron a 70°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se cizallaron durante 1 minuto. El aceite experimentó agitación normal durante 1 hora con un mezclador de cabeza. El aceite se dejó enfriar con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 45°C, posteriormente se añadieron 1,8 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar al aceite y se mezclaron. Se añadieron 0,10 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1 número de lote LYN05015) seguido de un total de 60 gramos de agua desionizada, y la mezcla completa se mezcló con cizallamiento durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 240 minutos a una temperatura de 45°C. El aceite tratado con enzima se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLA1 a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 0,5 ppm. El FFA fue 0,54% y el DAG fue 0,33%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 91,4 gramos.

Los procesos de desgomado descritos en los Ejemplos 4-10 fracasaron para eliminar y/o hacer reaccionar todos los fosfolípidos presentes en el aceite bruto como es evidente por el fósforo residual, excepto para el experimento 6. El experimento 6 representa el desgomado en condiciones de reacción normal para la enzima Lecitase® Ultra. En la Tabla 27, se listan los perfiles de fosfolípidos de las gomas húmedas recogidas.

Tabla 27. Resultados analíticos de los ejemplos de control neutros.

Experimento	Adición de Enzima	pH	Agua (g)	Temp. (C)	Tiempo de Reacción (minutos)	Fos. (ppm)	FFA (%)	DAG (%)	Gomas húmedas (g)
	Material de partida	Neutro	-	-	—	668,0	0,53	0,32	-
1	Ninguna	Neutro	60	70	30	80,0	0,22	0,34	108,5
2	PLC	Neutro	60	60	120	47,0	0,20	0,61	85,5
3	PI-PLC	Neutro	60	60	120	50,3	0,18	0,49	102,5
4	PLC + PI-PLC	Neutro	60	60	120	50,0	0,24	0,85	84,2
5	PLA1	Neutro	60	45	240	27,2	0,60	0,33	90,0
6	PLA1	4,5	60	45	240	0,5	0,54	0,33	91,4

Como se observa en la Tabla 29, el desgomado con agua demuestra la habilidad de emulsiónamiento de los fosfolípidos hidratables que permite la eliminación de todas las especies de fosfolípidos, incluso algunas de las especies no hidratables. Sin embargo, una gran porción de los NHPs permaneció en el aceite como es evidente por el fósforo residual, calcio, magnesio y hierro en el aceite desgomado (véase la Tabla 29). El desgomado que utiliza una fosfolipasa C fue capaz de hacer reaccionar esencialmente toda la fosfatidilcolina y una cantidad significativa de la fosfatidiletanolamina. El fosfatidilinositol y el ácido fosfatídico no reaccionaron. La cantidad de gomas recogidas fue significativamente más baja que el ejemplo del desgomado con agua (85,5 gramos frente a 108,5 gramos), pero una gran cantidad de los NHPs permaneció en el aceite como es evidente por el fósforo residual de cerca de 50 ppm y el Ca, Mg, y Fe restante que quedan en el aceite. Como se observa en la Tabla 29, el desgomado con una fosfolipasa específica para fosfatidilinositol produjo una goma húmeda con la cantidad más alta de PC y PE de todos los ejemplos de control. La composición de fosfolípido de las gomas húmedas recuperadas en los ejemplos 4-10 también se proporciona en la Figura 13.

Tabla 28. Composición de Fosfolípido de las Gomas Recuperadas

Experimento	PC (%)	PE (%)	PI (%)	PA (%)	liso-PC (%)	liso-PE (%)	liso-PI (%)	liso-PA (%)	C (%)	E (%)	I (%)	A (%)
1	9,62	7,35	4,02	2,04	0,58	0,35	0,33	b.d.	b.d.	b.d.	b.d.	0,07
2	0,19	2,05	5,29	2,88	0,44	0,09	0,39	0,28	3,92	2,42	b.d.	0,19
3	11,01	7,78	0,00	2,33	0,59	0,36	b.d.	b.d.	0,05	0,02	4,29	0,12
4	2,39	3,09	1,68	2,77	0,44	0,17	b.d.	0,35	3,25	1,97	1,26	0,18
5	0,24	0,41	0,67	0,26	8,05	7,33	4,32	3,52	b.d.	b.d.	b.d.	0,19
6	0,62	0,74	0,90	0,13	7,98	7,40	4,30	4,28	b.d.	b.d.	b.d.	0,25

b.d. = por debajo de los límites de detección

Todo el PI se hizo reaccionar con la fosfolipasa C produciendo fosfoinositol. Al igual que en los ejemplos 4 y 5, grandes cantidades de NHPs permanecieron en el aceite como es evidente mediante el análisis de metales en trazas dado a conocer en la Tabla 29.

5

Tabla 29. Resultados elementales de los ejemplos de control neutros.

Experimento	Adición de Enzima	pH	Fósforo (ppm)	Calcio (ppm)	Magnesio (ppm)	Hierro (ppm)
Bruto Promedio	Material de partida	Neutro	668,0	61,67	69,92	0,95
1	Ninguna	Neutro	80,0	34,97	18,79	0,44
2	PLC	Neutro	47,0	21,25	10,14	0,19
3	PI-PLC	Neutro	50,3	25,33	12,33	0,20
4	PLC + PI- PLC	Neutro	50,0	22,49	9,62	0,20
5	PLA1	Neutro	27,2	15,14	7,73	0,13
6	PLA1	4,5	0,5	0,19	0,12	b.d.

La humedad y el aceite neutro presentes en el aceite de gomas recuperadas se da a conocer en la Tabla 29a.

Tabla 29a: Humedad y Aceite Neutro presentes en las gomas recuperadas

Experimento	Humedad (%)	Aceite "según se encuentra" (%)	Aceite "seco" (%)	Aceite Perdido (g)
1	43,31	20,40	36,05	22,13
2	49,62	17,04	33,82	14,57
3	40,70	23,97	40,42	24,57
4	46,80	20,44	38,42	17,21
5	44,33	11,63	20,89	10,47
6	45,00	14,52	26,40	13,27

- 10 En el Ejemplo 7, el desgomado tanto con PLC como con PI-PLC demostró una hidrólisis enzimática significativa de PC, PE, y PI (Tabla 27 y Figura 13), pero no tan buena como la enzima individual añadida sola en el Ejemplo 5 o 6. Adicionalmente, el fósforo residual en el aceite permaneció en aproximadamente 50 ppm debido a la incapacidad del proceso para hidrolizar las sales del ácido fosfatídico y la fosfatidiletanolamina. En el Ejemplo 8, el desgomado con PLA1 hidrolizó casi todos los fosfolípidos presentes en las gomas húmedas en sus formas liso como se observa en la Figura 13 y como es evidente por la cantidad significativa de liso-fosfolípidos presentes (Tabla 28). Sin embargo, incluso después de 4 horas, cantidades significativas de PA permanecieron en el aceite debido a que los NHPs no estuvieron accesibles para la enzima.
- 15

En el experimento 6 de control, el aceite tratado con PLA1 a pH 4,5 demuestra la habilidad de la fosfolipasa A1 para reaccionar con todas las especies de fosfolípidos produciendo un aceite desgomado con menos de 1 ppm de fósforo residual, y esencialmente todas las gomas se han convertido en sus especies liso-solubles en agua - como es evidente en la Figura 13 y en las Tablas 30 y 31. Los cationes de calcio, magnesio, y hierro ya no están unidos a los NHPs, pero lo están ahora en la fase de agua. Los cationes de calcio, magnesio, y hierro se disocian de las sales de ácido fosfatídico y fosfatidiletanolamina. Como consecuencia, los elementos divalentes ahora pueden reaccionar con el ácido cítrico presente en la fase de agua formando un citrato de calcio, magnesio, o hierro que son insolubles en la fase de agua en el pH reaccionado de la fase de agua. Estas sales insolubles precipitan de la disolución formando un recubrimiento de "agua dura" sobre todo el sistema de tuberías, intercambiadores de calor, e incluso la centrifugadora hasta que la fase pesada que comprende una mezcla de gomas reaccionadas, agua, y sales se elimina por medio del proceso de centrifugación. Dayton et al. en el documento U.S 2007/0134777 describen un proceso de desgomado enzimático mejorado en donde el pH de la reacción enzimática débilmente amortiguada se hace descender desde 4,5 hasta, por ejemplo, un rango de 3,5 a 4,2 después de que la reacción enzimática se completa disociando las sales de citrato, eliminando por consiguiente el ensuciamiento del equipo, particularmente de los intercambiadores de calor y de la centrifugadora de separación, que habría resultado de la precipitación de las sales de calcio y de magnesio en el pH óptimo requerido para la actividad de la enzima.

Como se demuestra por los siguientes ejemplos, los procesos aquí previstos comprenden tratar un aceite con un ácido para hacer descender el pH a menos de tres, permitir que las sales del ácido fosfatídico y la fosfatidiletanolamina (los NHPs) se disocien, posteriormente ajustar el pH de la fase de agua nuevamente a un pH neutro de 7, antes de hidratar los fosfolípidos en el desgomado con agua o hacer reaccionar los fosfolípidos con una fosfolipasa permite que los NHPs migren a la interfaz aceite-agua permitiendo una mejor hidratación y una mejor disponibilidad del sustrato (NHPs) para las fosfolipasas. La Tabla 30 debajo proporciona un resumen de los ejemplos de los procesos realizados según se describe debajo.

Tabla 30. Resultados analíticos de los ejemplos con pH ajustado.

Experimento	Adición de Enzima	PH ajustado	Agua (g)	Temp. (°C)	Tiempo de Reacción (minutos)	Fos. (ppm)	FFA (%)	DAG	Gomas Húmedas (g)
7	Ninguna	7,0	60	70	30	26,9	0,24	0,39	112,0
8	PLC	7,0	60	60	120	14,4	0,21	1,11	80,0
9	PI-PLC	7,0	60	60	120	13,5	0,22	0,61	100,8
10	PLC + PI-PLC	7,0	60	60	120	18,7	0,21	1,04	84,4
11	PLA1	5,5	60	45	240	1,6	0,54	0,33	91,7
12	PLA1	6,5	60	45	240	3,4	0,51	0,33	88,7
13	PLA1	7,0	60	45	240	3,4	0,52	0,39	93,1

Ejemplo 10: Desgomado con agua a un pH ajustado de 7,0

2002,2 gramos de aceite de soja bruto que contiene 640,1 ppm de fósforo se calentaron a 70°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se cizallaron durante 1 minuto. El aceite experimentó agitación normal durante 1 hora con un mezclador de cabeza. Se añadieron al aceite 3,65 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y se mezclaron. Al aceite caliente, se añadieron 56,0 gramos de agua desionizada (un total de 60 gramos de agua incluyendo el ácido cítrico e hidróxido de sodio). La mezcla de aceite/agua se agitó a 450 rpm durante 1 minuto. El agitador se desaceleró hasta 100 rpm durante 30 minutos para flocular e hidratar las gomas. El aceite tratado con agua se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite desgomado con agua fue 26,9 ppm, el FFA fue 0,24%, y el DAG fue 0,39%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 112,0 gramos.

El fósforo residual en el Ejemplo 10 donde el pH se ajustó a 7 (26,9 ppm de P) en comparación al ejemplo de pH neutro original (80,0 ppm de P) demostró que algo más de los fosfolípidos estuvieron disponibles para hidratación o atrapamiento mecánico. Adicionalmente, las concentraciones tanto de ácido fosfatídico como de fosfatidiletanolamina (NHPs) se incrementaron en las gomas recuperadas como se observa en la Tabla 31.

Tabla 31. Composición de fosfolípido de las gomas recuperadas de los ejemplos 10-16

Experimento	PC (%)	PE (%)	PI (%)	PA (%)	liso-PC (%)	liso-PE (%)	liso-PI (%)	liso-PA (%)	C (%)	E (%)	I (%)	A (%)
7	7,62	7,78	4,19	2,81	0,59	0,48	0,34	0,26	b.d.	b.d.	b.d.	0,18
8	0,30	0,88	6,15	3,84	0,67	0,22	0,51	0,67	3,91	2,79	0,06	0,31
9	8,29	8,31	b.d.	3,11	0,71	0,56	b.d.	0,48	0,42	0,20	4,63	0,23
10	1,12	1,74	0,74	3,34	0,36	0,09	b.d.	0,59	3,87	2,62	1,85	0,30
11	0,40	0,51	0,42	0,18	7,78	7,06	4,40	3,83	b.d.	b.d.	b.d.	0,24
12	0,30	0,50	0,50	0,09	8,47	7,72	4,66	4,10	b.d.	b.d.	b.d.	0,24
13	0,14	0,43	0,07	b.d.	7,65	7,31	3,97	3,26	0,06	b.d.	0,10	0,24

b.d = por debajo de los límites de detección

La humedad y el aceite neutro presentes en las gomas recuperadas de los ejemplos 10-16 se dan a conocer en la Tabla 31a.

Tabla 31a. Humedad y Aceite Neutro presentes en las gomas recuperadas.

Experimento	Humedad (%)	Aceite "según se encuentra" (%)	Aceite "seco" (%)	Aceite perdido (g)
7	45,53	17,44	32,02	19,53
8	51,58	13,23	27,32	10,53
9	43,19	18,29	32,20	18,44
10	50,33	17,64	35,51	14,89
11	44,71	12,43	22,48	11,40
12	44,44	11,07	19,92	9,82
13	43,25	10,37	18,27	9,65

5

Ejemplo 11: Desgomado con PLC a un pH ajustado de 7,0

2002,0 gramos de aceite de soja bruto que contiene 640,1 ppm de fósforo se calentaron a 70°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se cizallaron durante 1 minuto. El aceite experimentó agitación normal durante 1 hora con un mezclador de cabeza. El aceite se dejó enfriar a 60°C donde se añadieron al aceite 3,65 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y se mezclaron. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron 0,50 gramos de lipasa PLC Purifine® de Verenium (número de lote 190DU001A1) seguido del resto de los 60 gramos de agua desionizada, y la mezcla completa se mezcló con cizallamiento durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60°C. El aceite tratado con enzima se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLC ajustado a pH 7,0 con ácido/base produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 14,4 ppm. El FFA fue 0,21% y el DAG fue 1,11%.

Las gomas húmedas recogidas pesaron 80,0 gramos.

Los resultados de este experimento demuestran tanto la eliminación de los fosfolípidos a partir del aceite como la habilidad de la fosfolipasa para convertir los fosfolípidos en diacilgliceroles o aceite. Los diacilgliceroles se incrementaron desde el aceite de partida (0,31%) o 0,34% en el experimento de desgomado con agua de control hasta 1 a 1,11% en el experimento de desgomado con enzima a un pH ajustado de 7,0. El fósforo residual en el aceite se redujo desde 47,0 ppm en el experimento de control hasta 14,4 ppm en el experimento de pH ajustado. Los otros metales en trazas también se redujeron significativamente como se demuestra en la Tabla 32.

25

Tabla 32. Resultados elementales de los ejemplos 10-16

Experimento	Adición de enzima	pH Ajustado	Fósforo (ppm)	Calcio (ppm)	Magnesio (ppm)	Hierro (ppm)
7	Ninguna	7,0	26,9	7,80	2,71	0,35
8	PLC	7,0	14,4	4,70	0,96	0,34
9	PI-PLC	7,0	13,5	5,30	1,99	b.d.
10	PLC + PI-PLC	7,0	18,7	4,60	2,14	b.d.
11	PLA1	5,5	1,6	0,82	0,34	0,01
12	PLA1	6,5	3,4	2,56	0,95	b.d.
13	PLA1	7,0	3,4	2,75	1,03	b.d.

Es importante reconocer que las gomas recogidas se redujeron al nivel más bajo en todos los experimentos en la solicitud (80,0 gramos). La composición de fosfolípido muestra que casi toda la PC y PE se convirtieron a la *fosfo*-colina y *fosfo*-etanolamina (Tabla 31) formando los diacilgliceroles encontrados en el aceite recuperado. La cantidad de ácido fosfatídico también se incrementó en las gomas recogidas demostrando adicionalmente la disponibilidad incrementada del sustrato para ser hidratado/mecánicamente “atrapado” o disponible para ser enzimáticamente reaccionado.

Ejemplo 12: Desgomado con PI-PLC a un pH ajustado de 7,0

2000,0 gramos de aceite de soja bruto que contiene 694,1 ppm de fósforo se calentaron a 70°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se cizallaron durante 1 minuto. El aceite experimentó agitación normal durante 1 hora con un mezclador de cabeza. El aceite se dejó enfriar a 60°C donde se añadieron al aceite 3,65 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y se mezclaron. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron 0,0108 gramos de una PI-PLC (SEQ ID NO: 8) proporcionada por Verenium a un vaso de precipitados de 10 ml y se disolvieron en 1 ml de agua desionizada. Una vez que la proteína se había disuelto en el agua, la disolución de la enzima se añadió al aceite. El vaso de precipitados se enjuagó tres veces con aproximadamente 1 ml de agua a fin de asegurar que se añadió toda la enzima. El resto del agua que se añadió para una cantidad total de agua añadida fue 60 gramos. La mezcla completa se mezcló con cizallamiento durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60°C. El aceite tratado con enzima se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PI-PLC ajustado a pH 7,0 con ácido/base produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 13,5 ppm. El FFA fue 0,22% y el DAG fue 0,61%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 100,8 gramos.

Como en los dos ejemplos previos, la cantidad de PA presente en las gomas recogidas se incrementó en los experimentos de pH ajustado frente a los experimentos de control. Adicionalmente, la cantidad más grande de PC, y PE estuvo presente en las gomas recogidas, por lo tanto en los 100,8 gramos de las gomas húmedas. Debido a que la fosfolipasa específica para fosfatidilinositol predominantemente solo reacciona con PI, el incremento en DAG fue menor que la reacción de fosfolipasa en el experimento 8, y el *fosfo*-inositol fue el *fosfo*-compuesto predominante presente en las gomas recogidas (Tabla 31).

Ejemplo 13: Desgomado con PI-PLC más PLC a un pH ajustado de 7,0

2003,8 gramos de aceite de soja bruto que contiene 641,6 ppm de fósforo se calentaron a 70°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se cizallaron durante 1 minuto. El aceite experimentó agitación normal durante 1 hora con un mezclador de cabeza. El aceite se dejó enfriar a 60°C donde se añadieron al aceite 3,65 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y se mezclaron. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron al aceite 0,50 gramos de lipasa PLC Purifine® de Verenium (número de lote 190DU001A1) seguido de 0,0094 gramos de una PI-PLC (SEQ ID NO: 8) proporcionada por Verenium que se añadieron a un vaso de precipitados de 10 ml y se disolvieron en 1 ml de agua desionizada. Una vez que la proteína se había disuelto, la disolución de la enzima se añadió al aceite. El vaso de precipitados se enjuagó tres veces con aproximadamente 1 ml de agua a fin de asegurar que se añadió toda la enzima al aceite. El resto del agua que se añadió para un volumen total de agua añadida fue 60 gramos. La mezcla completa se mezcló posteriormente con cizallamiento durante 1 minuto.

La mezcla de aceite se agitó posteriormente a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60°C. El aceite tratado con enzima se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLC-PI-PLC a un pH ajustado de 7,0 produjo aceite desgomado con un fósforo residual de 18,7 ppm. El FFA fue 0,21% y el DAG fue 1,04%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 84,4 gramos.

Las cantidades limitadas de PC, PE y PI recogidas en las gomas (Tabla 31), la gran cantidad de *fosfo*-colina, *fosfo*-etanolamina, y *fosfo*-inositol en las gomas (Tabla 31), y el alto nivel de diacilglicerol presente en el aceite recuperado demuestran claramente la reacción enzimática tanto de la PLC como de la PI-PLC en el aceite bruto. El PA recuperado en las gomas también fue mayor que la combinación de control de enzimas encontradas en el Ejemplo 7.

Ejemplo 14: Desgomado con PLA₁ a un pH ajustado de 5,5

2001,2 gramos de aceite de soja bruto que contiene 641,6 ppm de fósforo se calentaron a 70°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se cizallaron durante 1 minuto. El aceite experimentó agitación normal durante 1 hora con un mezclador de cabeza. El aceite se dejó enfriar con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 45°C, se añadieron posteriormente al aceite 2,55 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y se mezclaron. Se añadieron 0,10 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1 número de lote LYN05015) seguido de un total de 60 gramos de agua desionizada, y la mezcla completa se mezcló con cizallamiento durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 240 minutos a una temperatura de 45°C. El aceite tratado con enzima se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLA1 a un pH de 5,5, produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 1,6 ppm. El FFA fue 0,54% y el DAG fue 0,33%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 91,7 gramos.

Ejemplo 15: Desgomado con PLA₁ a un pH ajustado de 6,5

2001,6 gramos de aceite de soja bruto que contiene 641,6 ppm de fósforo se calentaron a 70°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se cizallaron durante 1 minuto. El aceite experimentó agitación normal durante 1 hora con un mezclador de cabeza. El aceite se dejó enfriar con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 45°C, se añadieron posteriormente al aceite 3,31 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y se mezclaron. Se añadieron 0,10 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1 número de lote LYN05015) seguido de un total de 60 gramos de agua desionizada, y la mezcla completa se mezcló con cizallamiento durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 240 minutos a una temperatura de 45°C. El aceite tratado con enzima se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLA1 a un pH de 6,5 produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 3,4 ppm. El FFA fue 0,51% y el DAG fue 0,33%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 88,7 gramos.

Ejemplo 16: Desgomado con PLA₁ a un pH ajustado de 7,0

2001,6 gramos de aceite de soja bruto que contiene 641,6 ppm de fósforo se calentaron a 70°C bajo agitación normal utilizando un mezclador de cabeza. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se cizallaron durante 1 minuto. El aceite experimentó agitación normal durante 1 hora con un mezclador de cabeza. El aceite se dejó enfriar con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite fue 45°C, se añadieron posteriormente al aceite 3,31 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y se mezclaron. Se añadieron 0,10 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1 número de lote LYN05015) seguido de un total de 60 gramos de agua desionizada, y la mezcla completa se mezcló con cizallamiento durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 240 minutos a una temperatura de 45°C. El aceite tratado con enzima se centrifugó posteriormente; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLA1 a un pH de 7,0 produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 3,4 ppm. El FFA fue 0,52% y el DAG fue 0,39%. Las gomas húmedas recogidas pesaron 93,1 gramos.

Los ejemplos 14, 15, y 16 demuestran el efecto de incrementar el pH de la condición óptima para la enzima de 4,5 hasta un pH ajustado de 5,5, 6,5, y 7,0, respectivamente, para la enzima fosfolipasa A. La habilidad para operar la reacción a un pH neutro de 7,0, en lugar de 4,5, incrementaría la viabilidad económica del proceso industrial debido a los materiales de construcción y el coste de reducir el pH de 3,5 a 4,2 para prevenir el ensuciamiento del equipo industrial. En resumen, el experimento 13 muestra claramente que se puede obtener un fósforo residual bajo en el aceite, siendo todavía capaz de hacer reaccionar todos los fosfolípidos presentes en las gomas a sus formas liso, maximizando por consiguiente el rendimiento del aceite para este tipo de reacción enzimática.

La Figura 14 compara la composición de fosfolípido de las reacciones de pH neutro de control frente a las reacciones de pH ajustado a un pH de 7,0, lado a lado. Se puede observar claramente que en todas las reacciones en las que un tratamiento con ácido seguido de un tratamiento con agente cáustico diluido a fin de llevar la fase de agua a un pH neutro incrementan el nivel de NHPs en las gomas recogidas y/o permiten que estos NHPs se conviertan en las forma liso o fosfo, incrementando por consiguiente el rendimiento global y minimizando cualquier producto de desecho generado a partir del proceso.

La Figura 15 compara el aceite neutro perdido a la fase de goma en las reacciones de pH neutro de control frente a las reacciones de pH ajustado a un pH de 7,0, lado a lado. Se puede observar claramente que en todas las reacciones en las que un tratamiento con ácido fue seguido de un tratamiento con agente cáustico diluido a fin de llevar la fase de agua a un pH neutro, disminuyó la cantidad de aceite neutro perdido a la fase de goma.

La Figura 16 compara el aceite neutro perdido a la fase de goma de varias condiciones de pH donde se utiliza una fosfolipasa A1. Todas las reacciones tienen un pH ajustado excepto la reacción "neutra". Se demuestra que la cantidad de aceite neutro es mínima cuando el pH se ha ajustado a 7,0 frente a incluso la reacción no ajustada neutra sin base o ácido alguno añadido para ayudar en la disponibilidad del NHP al proceso de desgomado.

5 **Ejemplo 17: Estudios de la Distribución del Tamaño de Partículas**

En este ejemplo, se estudiaron la distribución promedio del tamaño de gota y el tamaño de gota prevalente del tratamiento de cizallamiento aplicado en los métodos aquí provistos y los métodos disponibles en la técnica (por ejemplo, Patentes US 4.698.185 y 6.103.505).

10 El tamaño de partículas en este estudio se analizó utilizando el analizador de tamaños de partículas (gota) Malvern Mastersizer modelo 2000, con la distribución de volumen y partículas calculada mediante el software que acompaña al equipo.

15 **Ejemplo 17A:** 300 g de aceite de soja desgomado se calentaron a 90°C en un vaso de precipitados de 600 ml bajo agitación normal utilizando un agitador magnético. A esto se añadieron 1,8 g de agua desionizada, seguido de 0,565 g de ácido fosfórico al 85%. La mezcla se sometió posteriormente a cizallamiento durante 30 segundos utilizando un homogenizador T-50 basic Ultra-Turrax con un elemento de dispersión S 50 N - G 45 G a 10.000 (se cree por el proveedor que este homogenizador es equivalente al Ultra Turrax T-45 utilizado en la Patente US 4.698.185).

Posteriormente, una muestra de la emulsión formada se analizó en el Malvern 2000. El tamaño de gota promedio para la fase acuosa fue 3,963 µm y 90% de la fase acuosa apareció en gotas con un diámetro menor que 6,675 µm (Tabla 33). La distribución de gota se muestra en la Figura 17.

20 Tabla 33

Tamaño de gota (µm)	Distribución de volumen (%)				Distribución acumulada de volumen (%)			
	Ejemplo 17A	Ejemplo 17B	Ejemplo 17D	Ejemplo 17C	Ejemplo 17A	Ejemplo 17B	Ejemplo 17D	Ejemplo 17C
1,259	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,445	0,13	0,00	0,01	0,00	0,13	0,00	0,01	0,00
1,660	2,38	0,91	0,09	0,01	2,51	0,91	0,10	0,01
1,905	5,25	4,62	0,10	0,10	7,76	5,53	0,20	0,11
2,188	7,63	7,51	0,09	0,23	15,39	13,04	0,29	0,34
2,512	9,37	9,76	0,08	0,35	24,76	22,80	0,37	0,69
2,884	10,44	11,18	0,15	0,49	35,20	33,98	0,52	1,18
3,311	10,84	11,71	0,37	0,67	46,04	45,69	0,89	1,85
3,802	10,62	11,45	0,87	0,90	56,66	57,14	1,76	2,75
4,365	9,95	10,60	1,73	1,20	66,61	67,74	3,49	3,95
5,012	8,95	9,35	2,98	1,60	75,56	77,09	6,47	5,55
5,754	7,72	7,89	4,62	2,12	83,28	84,98	11,09	7,67
6,607	6,30	6,27	6,50	2,77	89,58	91,25	17,59	10,44
7,586	4,78	4,58	8,49	3,56	94,36	95,83	26,08	14,00
8,710	3,21	2,92	10,26	4,46	97,57	98,75	36,34	18,46
10,000	1,80	1,23	11,51	5,46	99,37	99,98	47,85	23,92
11,482	0,62	0,00	11,94	6,45	99,99	100,00	59,79	30,37
13,183	0,01	0,00	11,41	7,30	100,00	100,00	71,20	37,67
15,136	0,00	0,00	9,99	7,97	100,00	100,00	81,19	45,64

ES 2 590 037 T3

Tamaño de gota (µm)	Distribución de volumen (%)				Distribución acumulada de volumen (%)			
	Ejemplo 17A	Ejemplo 17B	Ejemplo 17D	Ejemplo 17C	Ejemplo 17A	Ejemplo 17B	Ejemplo 17D	Ejemplo 17C
17,378	0,00	0,00	7,90	8,27	100,00	100,00	89,09	53,91
19,953	0,00	0,00	5,57	8,23	100,00	100,00	94,66	62,14
22,909	0,00	0,00	3,34	7,81	100,00	100,00	98,00	69,95
26,303	0,00	0,00	1,61	7,06	100,00	100,00	99,61	77,01
30,200	0,00	0,00	0,39	6,08	100,00	100,00	100,00	83,09
34,674	0,00	0,00	0,00	4,97	100,00	100,00	100,00	88,06
39,811	0,00	0,00	0,00	3,85	100,00	100,00	100,00	91,91
45,709	0,00	0,00	0,00	2,82	100,00	100,00	100,00	94,73
52,481	0,00	0,00	0,00	1,96	100,00	100,00	100,00	96,69
60,256	0,00	0,00	0,00	1,28	100,00	100,00	100,00	97,97
69,183	0,00	0,00	0,00	0,79	100,00	100,00	100,00	98,76
79,433	0,00	0,00	0,00	0,47	100,00	100,00	100,00	99,23
91,201	0,00	0,00	0,00	0,27	100,00	100,00	100,00	99,50
104,713	0,00	0,00	0,00	0,17	100,00	100,00	100,00	99,67
120,226	0,00	0,00	0,00	0,11	100,00	100,00	100,00	99,78

5 **Ejemplo 17B:** 2000 g de aceite de soja desgomado se calentaron a 90°C en un vaso de precipitados de 4000 ml bajo agitación normal utilizando un agitador magnético. Se añadieron al aceite 12 g de agua desionizada, seguido de 3,767 g de ácido fosfórico al 85%. La mezcla se sometió posteriormente a cizallamiento durante 30 segundos utilizando un homogeneizador T-50 basic Ultra-Turrax con un elemento de dispersión S 50 N - G 45 G a 10.000.

Posteriormente, una muestra de la emulsión formada se analizó en el Malvern 2000. El tamaño de gota promedio para la fase acuosa fue 3,905 µm, y 90% de la fase acuosa apareció en gotas con un diámetro menor que 6,405 µm (Tabla 33). La distribución de gota se muestra en la Figura 18.

10 **Ejemplo 17C:** 2000,3 g de aceite de soja bruto se calentaron a 60°C en un vaso de precipitados de 4000 ml bajo agitación normal utilizando un agitador magnético. Se añadieron 2,0 gramos de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico y se cizallaron durante 1 minuto. Se añadieron al aceite 3,650 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar y se mezclaron. Se añadieron 0,50 gramos de enzima PLC Purifine seguido de un total de 60 gramos de agua desionizada, y la mezcla completa se mezcló con cizallamiento durante 30 segundos utilizando un homogeneizador T-50 basic Ultra-Turrax con un elemento de dispersión S 50 N - G 45 G a 10.000 rpm.

15 Posteriormente, una muestra de la emulsión formada se analizó en el Malvern 2000. El tamaño de gota promedio para la fase acuosa fue 19,957 µm, y 90% de la fase acuosa apareció en gotas con un diámetro menor que 36,998 µm (Tabla 33). La distribución de gota se muestra en la Figura 19.

20 **Ejemplo 17D:** 0,6 l (aproximadamente 560 g) de aceite de soja desgomado se calentaron a 40°C en un vaso de precipitados de 600 ml bajo recirculación a través del mezclador Silverson. El mezclador se enfrió en un baño de agua, para evitar que la temperatura aumentara durante el experimento. Se añadieron 0,6 g de disolución al 50% peso/peso de ácido cítrico, seguido de 1,095 mililitros de disolución de hidróxido de sodio 4 molar. Se añadieron 0,028 g (50 ppm) de enzima PLA Lecitase® Ultra seguido de un total de 16,8 g de agua desionizada.

25 Posteriormente, una muestra de la emulsión formada se recogió después de 15 minutos, para permitir el equilibrio del sistema. Posteriormente, la muestra se analizó en el Malvern 2000. El tamaño de gota promedio para la fase acuosa fue 12,691 µm, y 90% de la fase acuosa apareció en gotas con un diámetro menor que 20,333 µm (Tabla 33). La distribución de gota se muestra en la Figura 20. Siendo un mezclador en línea, el Silverson continuó para reducir los tamaños de gota, logrando eventualmente el tamaño de partícula promedio de 9 µm.

La Figura 21 representa la superposición de la distribución del tamaño de gota (partícula) que resulta de los Ejemplos 17A, 17B, 17C, y 17D.

La Tabla 34 proporciona datos para el tamaño de partícula comparativo para los ejemplos 17A, 17B, 17C y 17D.

Tabla 34

	Ejemplo 17A	Ejemplo 17B	Ejemplo 17D	Ejemplo 17C
Tamaño medio de partícula (µm)	3,963	3,905	12,691	19,975
Tamaño de partícula para volumen de agua acumulado de 90% (µm)	6,675	6,405	20,333	36,998
Fase acuosa en gotas ≤ 10 µm (%)	99,37	99,98	47,85	23,92
Fase acuosa en gotas > 10 µm (%)	0,63	0,02	52,15	76,08

5

Como se observa a partir de los datos, el Ejemplo 17C produjo un perfil de distribución de gota muy distintivo, con tamaño de partícula promedio superior. Se encontró que el tamaño de partícula promedio del Ejemplo 17C es aproximadamente 5 veces más grande que el Ejemplo 17A y 17B, y 1,6 veces más grande que el Ejemplo 17D.

10

Como se observa a partir de los datos, para el ejemplo 17C, más del 76% de la fase de agua se encuentra en gotas con un diámetro mayor que 10 µm, mientras que para el Ejemplo 17A el 52% de la fase de agua se encuentra en gotas con un diámetro mayor que 10 µm, y menos de 0,65% de la fase de agua se encuentra en gotas con un diámetro mayor que 10 µm en el Ejemplo 17D.

Ejemplo 18: Estudio comparativo de las gomas obtenidas mediante diversos métodos

15

En este ejemplo, se proporcionan datos comparativos para el aceite tratado de acuerdo con los procesos dados a conocer en la patente US. nº 4.698.185 y el proceso descrito en los Ejemplos 4-16 arriba.

Varios aceites (listados en la Tabla 35) se tratan de acuerdo con el siguiente protocolo según se describe en la patente US nº 4.698.185:

20

- el aceite se calienta a más de 75°C
- se añade agua para elevar la concentración a 0,6% en peso
- se añade ácido fosfórico aproximadamente 20 - 60% en peso al aceite desgomado con agua
- se dispersa ácido durante 30 segundos
- el mezclado se continúa durante tres minutos
- se añade disolución de agente cáustico en aproximadamente 2% en volumen
- la mezcla se centrifuga durante 30 minutos en 5.000 rpm

25

- la fase de aceite se separa y se lava con agua desmineralizada al 2% en peso
- el agua de lavado se elimina mediante centrifugación durante 30 minutos a 5.000 rpm
- se analizan las gomas en el aceite

La Tabla 35 debajo proporciona datos para la composición de las gomas separadas de las muestras de aceite tratado:

Tipo de aceite	Soja	Girasol	Germen de maíz	Colza	Cacahuete
Fosfolípidos					
PA	55	49	37	72	53
LPA	6	20	-	6	-
PC	4	8	26	<1	15

ES 2 590 037 T3

Tipo de aceite	Soja	Girasol	Germen de maíz	Colza	Cacahuete
LPC	<1	-	-		
PE	17	9	13	13	7
LPE	<1	5		2	
Cardiolipina N-acilfosfatidil Etanolamina					
	13	9	19	7	24
PI	4	-	5	-	
No Identificado	-	-		-	

La Tabla 36 debajo proporciona datos para los fosfolípidos en las muestras de aceite tratadas de acuerdo con los Ejemplos 10, 11, 12, 13, y 16 anteriores:

Tabla 36:

	Ejemplo 10	Ejemplo 11	Ejemplo 12	Ejemplo 13	Ejemplo 16
Fosfolípidos					
PA	11,6	18,9	11,6	20,1	0,0
LPA	1,1	3,3	1,8	3,6	14,1
"A"	0,7	1,5	0,9	1,8	1,0
PC	31,4	1,5	31,0	6,7	0,6
LPC	2,4	3,3	2,7	2,2	32,9
"C"	b.d.	19,3	1,6	23,3	0,3
PE	32,1	4,3	30,4	10,5	1,9
LPE	2,0	1,1	1,0	0,5	31,5
"E"	b.d.	13,7	11,2	15,8	b.d.
PI	17,3	30,3	9,6	4,4	0,3
LPI	1,4	2,5	b.d.	b.d.	17,1
"I"	b.d.	0,3	17,3	11,2	0,4

5

La Tabla 37 debajo proporciona un resumen de las enzimas utilizadas, el pH de la reacción y los datos para los fosfolípidos en las muestras de aceite tratadas de acuerdo con los Ejemplos 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 y 16 anteriores.

Tabla 37

	PC	PE	PI	PA	LPC	LPE	LPI	LPA	C	E	I	A	Enzima	pH
1	39,5	30,2	16,5	8,4	2,4	1,4	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	Ninguna	Neutro
7	31,4	32,1	17,3	11,6	2,4	2,0	1,4	1,1	0,0	0,0	0,0	0,7	Ninguna	7,0
2	1,1	11,3	29,1	15,9	2,4	0,5	2,2	1,6	21,6	13,3	0,0	1,1	PLC	Neutro
8	1,5	4,3	30,3	18,9	3,3	1,1	2,5	3,3	19,3	13,7	0,3	1,5	PLC	7,0

	PC	PE	PI	PA	LPC	LPE	LPI	LPA	C	E	I	A	Enzima	pH
3	41,5	29,3	0,0	8,8	2,2	1,3	0,0	0,0	0,2	0,1	16,2	0,5	PI-PLC	Neutro
9	31,0	30,4	0,0	11,6	2,7	2,1	0,0	1,8	1,6	0,7	17,3	0,9	PI-PLC	7,0
4	13,6	17,6	9,6	15,8	2,5	1,0	0,0	2,0	18,5	11,2	7,2	1,0	PLC + PI-PLC	Neutro
10	6,7	10,5	4,4	20,1	2,2	0,5	0,0	3,6	23,3	15,8	11,2	1,8	PLC + PI-PLC	7,0
5	0,9	1,6	2,7	1,1	32,2	29,3	17,3	14,1	0,0	0,0	0,0	0,7	PLA1	Neutro
13	0,6	1,9	0,3	0,0	32,9	31,5	17,1	14,1	0,3	0,0	0,4	1,0	PLA1	7,0

Como se observa a partir de los datos, los fosfolípidos obtenidos mediante los procesos aquí descritos tienen una composición única.

5 Las realizaciones de la materia reivindicada anteriormente descrita pretenden ser meramente ejemplares, y aquellos expertos en la técnica reconocerán, o podrán determinar utilizando no más que la experimentación de rutina, numerosos equivalentes de los procedimientos, materiales y compuestos específicos. Se considera que todos tales equivalentes están dentro del alcance de la materia reivindicada y están abarcados por las reivindicaciones anexas.

10 Mientras que la invención se ha descrito con detalle con referencia a ciertos aspectos ejemplares de la misma, se entenderá que las modificaciones y las variaciones están dentro del espíritu y alcance de lo que se describe y se reivindica.

15 En realizaciones alternativas, la invención proporciona enzimas de fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), ácidos nucleicos que las codifican, anticuerpos que se unen específicamente a éstas, y métodos para obtenerlas y utilizarlas. También se proporcionan métodos industriales y productos que comprenden el uso de estas fosfolipasas. En ciertas realizaciones, se proporcionan aquí métodos para la hidratación de fosfolípidos no hidratables (NHPs) dentro de una matriz de lípido. Los métodos posibilitan la migración de los NHPs a una interfaz aceite-agua permitiendo por consiguiente que los NHPs reaccionen y/o sean eliminados de los lípidos. En ciertas realizaciones, se proporciona un método para eliminar NHPs, fosfolípidos hidratables, y lecitinas de los aceites vegetales para producir un producto de aceite o grasa desgomado que se puede usar para la producción de alimentos y/o aplicaciones no alimentarias. En ciertas realizaciones, se proporcionan aquí métodos para la hidratación de NHPs seguido del tratamiento enzimático y eliminación de diversos fosfolípidos y lecitinas. Los métodos proporcionados aquí se pueden poner en práctica sobre aceites brutos o desgomados con agua.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VERENIUM CORPORATION

BARTON, Nelson

25 HITCHMAN, Tim

LYON, Jonathan

O'DONOGHUE, Eileen

WALL, Mark

30 <120> FOSFOLIPASAS, ÁCIDOS NUCLEICOS QUE LAS CODIFICAN Y MÉTODOS PARA OBTENERLAS Y USARLAS

<130> D1250-6WO

<140> No Asignado Todavía

< 141> Concurrentemente con ésta

<150> 61/252.313

35 < 151> 2009-10-16

<160> 10

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

ES 2 590 037 T3

<210> 1

< 211> 738

< 212> ADN

< 213> Artificial

5

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 1

```

tggtcagctg aggataagca taatgagggg attaactctc atttgtggat tgtaaactcg      60
gcaattgaca tcatgtctcg taatacaacg attgtgaatc cgaatgaaac tgcattatta      120
aatgagtggc gtgctgattt agaaaatggt atttattctg ctgattacga gaatccttat      180
tatgatgata gtacatatgc ttctcacttt tatgatccgg atactggaac aacatatatt      240
ccttttgcg aacatgcaaa agaaacaggc gcaaaatatt ttaaccttgc tggccaagca      300
taccaaaatc aagatatgca gcaagcattc ttctacttag gattatcgct tcattattta      360
ggagatgtga atcagccaat gcatgcagca tcttttacgg atctttctta tccaatgggt      420
ttccattcta aatacgaaaa ttttgttgat acaataaaaa ataactatat tgtttcagat      480
agcaatggat attggaattg gaaaggagca aaccagaag attggattga aggagcagcg      540
gtagcagcta aacaagatta tctggcggt gtgaacgata cgacaaaaga ttggtttga      600
aaagcagccg tatctcaaga atatgcagat aaatggcgtg cggaagtaac accggtgaca      660
ggaaagcggt taatggaagc gcagcgcggt acagctgggt atattcattt gtggtttgat      720
acgtatgtaa atcgctaa
    
```

<210> 2

10

< 211> 245

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

< 223> Generada sintéticamente

15

<400> 2

```

Trp Ser Ala Glu Asp Lys His Asn Glu Gly Ile Asn Ser His Leu Trp
1           5           10           15
Ile Val Asn Arg Ala Ile Asp Ile Met Ser Arg Asn Thr Thr Ile Val
          20           25           30
Asn Pro Asn Glu Thr Ala Leu Leu Asn Glu Trp Arg Ala Asp Leu Glu
    
```

ES 2 590 037 T3

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

<210> 3

< 211> 849

< 212> ADN

5 < 213> Artificial

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 3

atgaaaaaga	aagtattagc	actagcagct	atggttgctt	tagctgcgcc	agttcaaagt	60
gtagtatttg	cacaaacaaa	taatagttaa	agtcctgcac	cgattttaag	atggtcagct	120
gaggataagc	ataatgaggg	gattaactct	catttgggga	ttgtaaactc	tgcaattgac	180
atcatgtctc	gtaatacaac	gattgtgaat	ccgaatgaaa	ctgcattatt	aaatgagtg	240
cgtgctgatt	tagaaaatgg	tatttattct	gctgattacg	agaatcctta	ttatgatgat	300
agtacatatg	cttctcactt	ttatgatccg	gatactggaa	caacatatat	tccttttgcg	360
aaacatgcaa	aagaaacag	cgcaaaatat	tttaaccttg	ctgggtcaagc	ataccaaagt	420
caagatatgc	agcaagcatt	cttctactta	ggattatcgc	ttcattattt	aggagatgtg	480
aatcagccaa	tgcatgcagc	atcttttacg	gatctttctt	atccaatggg	tttccattct	540
aaatacgaaa	atthttgttg	tacaataaaa	aataactata	ttgtttcaga	tagcaatgga	600
tattggaatt	ggaaggagc	aaaccagaa	gattggattg	aaggagcagc	ggtagcagct	660
aaacaagatt	atcctggcgt	tgtgaacgat	acgacaaaag	attggtttgt	aaaagcagcc	720
gtatctcaag	aatatgcaga	taaattggcgt	gcggaagtaa	caccgggtgac	aggaaagcgt	780
ttaatggaag	cgacgcgcgt	tacagctggg	tatattcatt	tgtggtttga	tacgtatgta	840
aatcgctaa						849

10 <210> 4

< 211> 282

< 212> PRT

< 213> Artificial

<220>

15 < 223> Generada sintéticamente

<220>

< 221> SEÑAL

< 222> (1)...(37)

<400> 4

```

Met Lys Lys Lys Val Leu Ala Leu Ala Ala Met Val Ala Leu Ala Ala
1      5      10      15
Pro Val Gln Ser Val Val Phe Ala Gln Thr Asn Asn Ser Glu Ser Pro
      20      25      30
Ala Pro Ile Leu Arg Trp Ser Ala Glu Asp Lys His Asn Glu Gly Ile
      35      40      45
Asn Ser His Leu Trp Ile Val Asn Arg Ala Ile Asp Ile Met Ser Arg
      50      55      60
Asn Thr Thr Ile Val Asn Pro Asn Glu Thr Ala Leu Leu Asn Glu Trp
65      70      75      80
Arg Ala Asp Leu Glu Asn Gly Ile Tyr Ser Ala Asp Tyr Glu Asn Pro
      85      90      95
Tyr Tyr Asp Asp Ser Thr Tyr Ala Ser His Phe Tyr Asp Pro Asp Thr
      100      105      110
Gly Thr Thr Tyr Ile Pro Phe Ala Lys His Ala Lys Glu Thr Gly Ala
      115      120      125
Lys Tyr Phe Asn Leu Ala Gly Gln Ala Tyr Gln Asn Gln Asp Met Gln
130      135      140
Gln Ala Phe Phe Tyr Leu Gly Leu Ser Leu His Tyr Leu Gly Asp Val
145      150      155      160
Asn Gln Pro Met His Ala Ala Ser Phe Thr Asp Leu Ser Tyr Pro Met
      165      170      175
Gly Phe His Ser Lys Tyr Glu Asn Phe Val Asp Thr Ile Lys Asn Asn
      180      185      190
Tyr Ile Val Ser Asp Ser Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Lys Gly Ala Asn
195      200      205
Pro Glu Asp Trp Ile Glu Gly Ala Ala Val Ala Ala Lys Gln Asp Tyr
210      215      220
Pro Gly Val Val Asn Asp Thr Thr Lys Asp Trp Phe Val Lys Ala Ala
225      230      235      240
Val Ser Gln Glu Tyr Ala Asp Lys Trp Arg Ala Glu Val Thr Pro Val
      245      250      255
Thr Gly Lys Arg Leu Met Glu Ala Gln Arg Val Thr Ala Gly Tyr Ile
      260      265      270
His Leu Trp Phe Asp Thr Tyr Val Asn Arg
      275      280

```

5 <210> 5

< 211> 987

< 212> ADN

< 213> Desconocido

<220>

10 < 223> ADN obtenido de una muestra medioambiental

<400> 5

ES 2 590 037 T3

```

atgaacaata agaagtttat tttgaagtta ttcatatgta gtatggtact tagcgccttt      60
gtatttgctt tcaatgataa gaaaaccggt gcagctagct ctattaatgt gcttgaaaat      120
tggcttagat ggatgaaacc tataaatgat gacataccgt tagcacgaat ttcaattcca      180
ggaacacatg atagtggaac gttcaagttg caaaatccga taaagcaagt gtggggaatg      240
acgcaagaat atgattttcg ttatcaaattg gatcatggag ctagaatttt tgatataaga      300
gggcgctttaa cagatgataa tacgatagtt cttcatcatg ggccattata tctttatgta      360
acactgcacg aatttataaa cgaagcgaaa caatttttaa aagataatcc aagtgaaacg      420
attattatgt ctttaaaaaa agagtatgag gatatgaaag gggcggaaaag ctcatttagt      480
agtacgtttg agaaaaatta ttttcgtgat ccaatctttt taaaaacaga agggaatata      540
aagcttggag atgctcgtgg gaaaattgta ttactaaaaa gatatagtgg tagtaatgaa      600
tctgggggat ataataatth ctattggcca gacaatgaga cgtttacctc aactataaat      660
caaatgtaa atgtaacagt acaagataaa tataaagtga gttatgatga gaaaataaac      720
gctattaaag atacattaaa tgaaacgatt aacaatagtg aagatgtaa tcatctatat      780
attaatttta caagcttgtc ttctggtggt acagcatgga atagtccata ttattatgcg      840
tcctacataa atcctgaaat tgcaaattat atgaagcaaa agaatcctac gagagtgggc      900
tgataatac aagattatat aaatgaaaaa tggtcacccat tactttatca agaagttata      960
agagcgaata agtcacttgt aaaatag

```

<210> 6

< 211> 328

< 212> PRT

5 < 213> Desconocido

<220>

< 223> Proteína obtenida de una muestra medioambiental

<220>

< 221> SEÑAL

10 < 222> (1)...(23)

<220>

< 221> DOMINIO

< 222> (56)...(195)

< 223> Fosfolipasa específica para fosfatidilinositol, dominio X

15 <400> 6

ES 2 590 037 T3

Met Asn Asn Lys Lys Phe Ile Leu Lys Leu Phe Ile Cys Ser Met Val
 1 5 10 15
 Leu Ser Ala Phe Val Phe Ala Phe Asn Asp Lys Lys Thr Val Ala Ala
 20 25 30
 Ser Ser Ile Asn Val Leu Glu Asn Trp Ser Arg Trp Met Lys Pro Ile
 35 40 45
 Asn Asp Asp Ile Pro Leu Ala Arg Ile Ser Ile Pro Gly Thr His Asp
 50 55 60
 Ser Gly Thr Phe Lys Leu Gln Asn Pro Ile Lys Gln Val Trp Gly Met
 65 70 75 80
 Thr Gln Glu Tyr Asp Phe Arg Tyr Gln Met Asp His Gly Ala Arg Ile
 85 90 95
 Phe Asp Ile Arg Gly Arg Leu Thr Asp Asp Asn Thr Ile Val Leu His
 100 105 110
 His Gly Pro Leu Tyr Leu Tyr Val Thr Leu His Glu Phe Ile Asn Glu
 115 120 125
 Ala Lys Gln Phe Leu Lys Asp Asn Pro Ser Glu Thr Ile Ile Met Ser
 130 135 140
 Leu Lys Lys Glu Tyr Glu Asp Met Lys Gly Ala Glu Ser Ser Phe Ser
 145 150 155 160
 Ser Thr Phe Glu Lys Asn Tyr Phe Arg Asp Pro Ile Phe Leu Lys Thr
 165 170 175
 Glu Gly Asn Ile Lys Leu Gly Asp Ala Arg Gly Lys Ile Val Leu Leu
 180 185 190
 Lys Arg Tyr Ser Gly Ser Asn Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Asn Phe Tyr
 195 200 205
 Trp Pro Asp Asn Glu Thr Phe Thr Ser Thr Ile Asn Gln Asn Val Asn
 210 215 220
 Val Thr Val Gln Asp Lys Tyr Lys Val Ser Tyr Asp Glu Lys Ile Asn
 225 230 235 240
 Ala Ile Lys Asp Thr Leu Asn Glu Thr Ile Asn Asn Ser Glu Asp Val
 245 250 255
 Asn His Leu Tyr Ile Asn Phe Thr Ser Leu Ser Ser Gly Gly Thr Ala
 260 265 270
 Trp Asn Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ala Ser Tyr Ile Asn Pro Glu Ile Ala
 275 280 285
 Asn Tyr Met Lys Gln Lys Asn Pro Thr Arg Val Gly Trp Ile Ile Gln
 290 295 300
 Asp Tyr Ile Asn Glu Lys Trp Ser Pro Leu Leu Tyr Gln Glu Val Ile
 305 310 315 320
 Arg Ala Asn Lys Ser Leu Val Lys
 325

<210> 7

< 211> 897

< 212> ADN

5

< 213> Artificial

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 7

```

atggctagct ctattaatgt gcttgaaaat tggcttagat ggatgaaacc tataaatgat      60
gacataccgt tagcacgaat ttcaattcca ggaacacatg atagtggaac gttcaagttg      120
caaaatccga taaagcaagt gtggggaatg acgcaagaat atgattttcg ttatcaaagt      180
gatcatggag ctagaatfff tgatataaga gggcgtttaa cagatgataa tacgatagtt      240
cttcatcatg ggccattata tctttatgta aactgcacg aatttataaa cgaagcgaaa      300
caatttttaa aagataatcc aagtgaaacg attattatgt cttaaaaaaa agagtatgag      360
gatatgaaag gggcgaaaag ctcatatagt agtacgtttg agaaaaatta ttttcgtgat      420
ccaatctttt taaaacaga aggaaatata aagcttggag atgctcgtgg gaaaattgta      480
ttactaaaaa gatatagtgg tagtaatgaa tctgggggat ataatttttt ctattggcca      540
gacaatgaga cgtttacctc aactataaat ggtaatgtaa atgtaacagt acaagataaa      600
tataaagtga gtttggatga gaaaataaac gctattaaag atacattaaa tgaaacgatt      660
aacaatagtg aagatgtaa tcatctatat attaatttta caagcttgtc ttctgggtgg      720
acagcatgga cagtcacata ttattatgcy tccaggataa atcctgaaat tgcaaatat      780
attaagcaaa agaatcctac gagagtggc tggataatac aagattttat aaatgaaaaa      840
tggcatccat tactttatca agaagttata aatgcgaata agtcacttgt aaaatga      897
  
```

ES 2 590 037 T3

<210> 8

< 211> 298

< 212> PRT

< 213> Artificial

5

<220>

< 223> Generada sintéticamente

<400> 8

Met Ala Ser Ser Ile Asn Val Leu Glu Asn Trp Ser Arg Trp Met Lys
 1 5 10 15
 Pro Ile Asn Asp Ile Pro Leu Ala Arg Ile Ser Ile Pro Gly Thr
 20 25 30
 His Asp Ser Gly Thr Phe Lys Leu Gln Asn Pro Ile Lys Gln Val Trp
 35 40 45
 Gly Met Thr Gln Glu Tyr Asp Phe Arg Tyr Gln Met Asp His Gly Ala
 50 55 60
 Arg Ile Phe Asp Ile Arg Gly Arg Leu Thr Asp Asp Asn Thr Ile Val
 65 70 75 80
 Leu His His Gly Pro Leu Tyr Leu Tyr Val Thr Leu His Glu Phe Ile
 85 90 95
 Asn Glu Ala Lys Gln Phe Leu Lys Asp Asn Pro Ser Glu Thr Ile Ile
 100 105 110
 Met Ser Leu Lys Lys Glu Tyr Glu Asp Met Lys Gly Ala Glu Ser Ser
 115 120 125
 Phe Ser Ser Thr Phe Glu Lys Asn Tyr Phe Arg Asp Pro Ile Phe Leu
 130 135 140
 Lys Thr Glu Gly Asn Ile Lys Leu Gly Asp Ala Arg Gly Lys Ile Val
 145 150 155 160
 Leu Leu Lys Arg Tyr Ser Gly Ser Asn Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Phe
 165 170 175
 Phe Tyr Trp Pro Asp Asn Glu Thr Phe Thr Ser Thr Ile Asn Gly Asn
 180 185 190
 Val Asn Val Thr Val Gln Asp Lys Tyr Lys Val Ser Leu Asp Glu Lys
 195 200 205
 Ile Asn Ala Ile Lys Asp Thr Leu Asn Glu Thr Ile Asn Asn Ser Glu
 210 215 220
 Asp Val Asn His Leu Tyr Ile Asn Phe Thr Ser Leu Ser Ser Gly Gly
 225 230 235 240

Thr Ala Trp Thr Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ala Ser Arg Ile Asn Pro Glu
 245 250 255
 Ile Ala Asn Tyr Ile Lys Gln Lys Asn Pro Thr Arg Val Gly Trp Ile
 260 265 270
 Ile Gln Asp Phe Ile Asn Glu Lys Trp His Pro Leu Leu Tyr Gln Glu
 275 280 285
 Val Ile Asn Ala Asn Lys Ser Leu Val Lys
 290 295

10

<210> 9

< 211> 900

< 212> ADN

< 213> Artificial

15

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 9

ES 2 590 037 T3

atggccagca	gcatcaacgt	cctcgaaaac	tggtcgcgct	ggatgaagcc	gatcaacgac	60
gacatcccgc	tggcccgcat	cagcatcccg	ggcaccacg	acagcggcac	cttcaagctg	120
cagaaccoga	tcaagcaggt	ctggggcatg	accaggaat	acgacttccg	ctaccagatg	180
gaccacggcg	cccgcacgtt	cgacatccgc	ggccgcctga	ccgacgacaa	caccatcgtg	240
ctgcaccacg	gcccgcgtga	cctgtacgtg	accctgcacg	aattcatcaa	cgaagccaag	300
cagttcctga	aggacaaccc	gagcgaacc	atcatcatga	gcctgaagaa	agaatacгаа	360
gacatgaagg	gcccgaag	cagcttcacg	agcaccttcg	aaaagaacta	cttccgcgac	420
ccgatcttcc	tgaagaccga	aggcaacatc	aagctggcgg	acgcccgcgg	caagatcgtc	480
ctcctgaagc	gctacagcgg	cagcaacgaa	agcggcggct	acaacttctt	ctactggccg	540
gacaacgaaa	ccttcaccag	caccatcaac	ggcaacgtga	acgtgaccgt	gcaggacaag	600
tacaagtgga	gcctggacga	aaagatcaac	gccatcaagg	acaccctgaa	cгааaccatc	660
aacaacagcg	aagacgtgaa	ccacctgtac	atcaacttca	ccagcctgag	cagcggcggc	720
accgcctgga	ccagcccgta	ctactacgcc	agccgcatca	acccggaaat	cgccaactac	780
atcaagcaga	agaacccgac	ccgcgtgggc	tggtatcatcc	aggacttcat	caacgaaaag	840
tggcaccgcg	tgctgtacca	ggaagtgatc	aacgcgaaca	agagcctggt	caagtgatga	900

<210> 10

< 211> 900

< 212> ADN

5

< 213> Artificial

<220>

< 223> Generado sintéticamente

<400> 10

atggcgagca	gcatcaacgt	cttggagaac	tggtcccggg	ggatgaagcc	catcaacgac	60
gatatcccac	tggcccgat	ctogatcccg	ggcaccacg	acagcggcac	ctttaaactc	120
cagaacccaa	tcaaacaggt	ctggggcatg	accagaggt	acgacttccg	ctaccagatg	180
gaccacggcg	cccgcacgtt	cgacatccgg	ggcgcctga	ccgacgacaa	caccatcgtg	240
ctgcaccacg	ggccgcgtga	cctgtacgtg	accttgcacg	agttcatcaa	tgaggcgaag	300
cagttcctga	aggacaaccc	gagcgaacc	atcatcatgt	ccctgaagaa	agaatacгаа	360
gacatgaagg	ggcggagag	ttcgttcacg	agcaccttcg	aaaagaacta	cttccgcgac	420
ccgattttcc	tgaagaccga	gggcaacatc	aaactggcgg	acgcccgcgg	caagatcgtg	480
ctgttgaagc	ggtacagcgg	cagcaacgag	tccgggggct	acaacttctt	ttactggccg	540
gataacgaaa	ccttcacttc	gacgatcaac	ggcaacgtga	acgtgaccgt	gcaggacaag	600
tacaagtgca	gcctcgacga	aaagatcaat	gccatcaagg	acaccctgaa	cgagaccatc	660
aataacagcg	aggacgtgaa	ccacttgtac	atcaacttca	ccagtctctc	ctccggcggc	720
accgcctgga	ccagcccgta	ctactacgcg	agtcgtatca	accccagat	cgccaactac	780
atcaaacaga	aaaaccccac	ccgggtcggg	tggtatcatcc	aggacttcat	caacgagaag	840
tggcaccgcg	tgctgtacca	ggaggtgatc	aacgcgaaca	aatcgcctggt	gaagtgatga	900

10

REIVINDICACIONES

1. Un ácido nucleico (polinucleótido) aislado, sintético o recombinante, que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico:

5 (a) que codifica un polipéptido que tiene una actividad de enzima fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), y

10 (i) que tiene al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 5 y que codifica un polipéptido que tiene al menos uno o más, o todos, de los cambios (mutaciones) de aminoácidos que consisten en N176F, Q191G, Y205L, N244T, Y252R, M261I, Y276F, S282H, y R291N, o cualquier combinación de los mismos, en el que la numeración de los cambios de aminoácidos comienza con el aminoácido 31 de SEQ ID NO: 6;

15 (ii) que codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en SEQ ID NO: 6 y que tiene al menos uno de los cambios o sustituciones (mutaciones) de aminoácidos que consisten en N176F, Q191G, Y205L, N244T, Y252R, M261I, Y276F, S282H, y R291N, o cualquier combinación de los mismos, en el que la numeración de los cambios de aminoácidos comienza con el aminoácido 31 de SEQ ID NO: 6; o

(iii) un ácido nucleico que comprende o consiste en SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:9 o SEQ ID NO:10; o

(b) la secuencia de ácido nucleico de (a) que codifica un polipéptido que tiene la actividad de enzima PI-PLC pero carece de una secuencia señal nativa o secuencia de aminoácidos de proproteína;

20 (c) la secuencia de ácido nucleico de (a) o (b) que codifica un polipéptido que tiene la actividad de enzima PI-PLC pero carece de una secuencia de promotor nativo;

(d) el ácido nucleico de (c) que comprende además una secuencia heteróloga promotora u otra secuencia reguladora transcripcional;

25 (e) la secuencia de ácido nucleico de cualquiera de (a) a (d) que comprende además ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos heteróloga, o que comprende además una secuencia nucleotídica heteróloga;

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

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

2. Un vector, casete de expresión, vector de expresión, plásmido, o vehículo de clonación:

(a) que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1; o,

35 (b) el vector, casete de expresión, vector de expresión, plásmido, o vehículo de clonación de (a) que comprende o contiene en un vector vírico, un fago, un fagómido, un cósmido, un fósido, un bacteriófago, un cromosoma artificial, un vector de adenovirus, un vector retrovírico o un vector vírico adenoasociado; o un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un vector derivado del bacteriófago P1 (PAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), o un cromosoma artificial de mamífero (MAC).

3. Una célula hospedante o una célula transformada:

40 (a) que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1, o el vector, casete de expresión, vector de expresión, plásmido, o vehículo de clonación de la reivindicación 2; o,

(b) la célula hospedante o una célula transformada de (a), en donde la célula es una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula de hongo, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal.

4. Un polipéptido aislado, sintético o recombinante que tiene una actividad de enzima fosfolipasa C específica para fosfatidilinositol (PI-PLC), y:

45 (a) que comprende una secuencia de aminoácidos:

50 (i) que tiene al menos 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6, y que tiene al menos uno o más, o todos, de los cambios del aminoácido o sustituciones (mutaciones) que consisten en N176F, Q191G, Y205L, N244T, Y252R, M261I, Y276F, S282H, y R291N, o cualquier combinación de los mismos, en el que la numeración de los cambios de aminoácidos comienza con el aminoácido 31 de SEQ ID NO: 6,

- (ii) codificada por el ácido nucleico de la reivindicación 1;
- (iii) que tiene al menos 98%, 99%, o más, o 100% de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 8;
- (b) el polipéptido de (a) pero que carece de una secuencia señal nativa y/o una secuencia de proproteína;
- 5 (c) el polipéptido de (a) o (b) que comprende además una secuencia de aminoácidos heteróloga o un resto heterólogo;
- (d) el polipéptido de (c), en donde la secuencia de aminoácidos heteróloga o el resto heterólogo comprende o consiste en una secuencia heteróloga señal (líder), una etiqueta, un marcador detectable o un epítipo;
- 10 (e) el polipéptido de cualquiera uno de (a) a (d), en donde: (i) el polipéptido está glicosilado, o el polipéptido comprende al menos un sitio de glicosilación, (ii) el polipéptido de (i) en donde la glicosilación es una glicosilación enlazada a N o una glicosilación enlazada a O; (iii) el polipéptido de (i) o (ii) en donde el polipéptido está glicosilado después de expresarse en una célula de levadura; o (iv) el polipéptido de (iii) en donde la célula de levadura es una *P. pastoris* o una *S. pombe*;
- (f) el polipéptido de uno cualquiera de (a) a (e), que comprende además o contiene una composición que comprende al menos una segunda enzima, o al menos una segunda enzima fosfolipasa; o
- 15 (g) el polipéptido de (f), en donde la al menos una segunda enzima fosfolipasa comprende un polipéptido que tiene una secuencia como se establece en SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 4, o al menos una de sus enzimas PLC variantes como se describe en las Tablas 8 y 9.
5. Una preparación de proteína que comprende el polipéptido de la reivindicación 9, en donde la preparación de proteína comprende un líquido, un sólido o un gel.
- 20 6. El polipéptido de la reivindicación 4, en donde el polipéptido está inmovilizado en una célula, un metal, una resina, un polímero, una cerámica, un vidrio, un microelectrodo, una partícula grafitica, una perla, un gel, una placa, una matriz o un tubo capilar.
7. Una matriz que comprende el polipéptido inmovilizado de la reivindicación 9, o el ácido nucleico inmovilizado como se establece en 1; o el anticuerpo de la reivindicación 14, o una combinación de los mismos.
- 25 8. Un método para producir un polipéptido recombinante que comprende:
- (A) (a) proporcionar la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1; y (b) expresar el ácido nucleico de la etapa (a) bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido, produciendo de ese modo un polipéptido recombinante; o
- 30 (B) el método de (A), que comprende además transformar una célula hospedante con el ácido nucleico de la etapa (a) seguido de la expresión del ácido nucleico de la etapa (a), produciendo de ese modo un polipéptido recombinante en una célula transformada, en donde la célula transformada es una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal.
9. Un método para modificar codones en un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fosfolipasa, comprendiendo el método:
- 35 (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad de fosfolipasa que comprende la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1; y,
- (b) identificar un codón en el ácido nucleico de la etapa (a) y remplazarlo por un codón diferente que codifica el mismo aminoácido que el codón remplazado, modificando de ese modo codones en un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa.
- 40 10. Una composición detergente:
- (a) que comprende el polipéptido de la reivindicación 4, o un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1;
- (b) la composición detergente de (a), en donde el polipéptido es un polipéptido no tensioactivo o un polipéptido tensioactivo; o,
- 45 (c) la composición detergente de (a) o (b), en donde el polipéptido se formula en una composición líquida no acuosa, un sólido moldeado, un polvo liofilizado, una forma granular, una forma en partículas, un comprimido prensado, un pelete, una forma de gel, una pasta, un aerosol, o una forma de lechada.
11. Una composición que comprende el polipéptido de la reivindicación 4, o un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1.

- 5 12. Un método para obtener una secuencia que codifica fosfolipasa variante que tiene expresión incrementada en una célula hospedante, que comprende modificar la secuencia de ácido nucleico de la reivindicación 1, de tal manera que uno, varios o todos los motivos que codifican el sitio de glicosilación enlazado a N se modifican a un motivo no glicosilado, en donde la célula hospedante es una célula bacteriana, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal.
13. Una composición que comprende una mezcla de enzimas, que comprende:
- (a)
- (i) el polipéptido de la reivindicación 4, y
- (ii) al menos una segunda enzima;
- 10 (b) la composición de (a), en donde la al menos una segunda enzima es una enzima fosfolipasa; o
- (c) la composición de (b), en donde la al menos una segunda enzima fosfolipasa comprende un polipéptido como se establece en SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 4, o al menos una de las enzimas PLC variantes como se describe en las Tablas 8 y 9.
- 15 14. Un soluble seco de destilería (DDS), un grano seco de destilería (DDG), un soluble de destilería condensado (CDS), un grano húmedo de destilería (DWG), o un grano seco de destilería con solubles (DDGS), que comprende: el polipéptido de la reivindicación 4, o la composición de la reivindicación 13.
15. Una biomasa, que comprende:
- (a) el polipéptido de la reivindicación 4, o la composición de la reivindicación 13; o
- 20 (b) la biomasa de (a), en donde la biomasa es, o comprende, una biomasa de animal, de alga y/o de planta, o una biomasa que comprende lípido o una biomasa lignocelulósica, o un material de desecho.
16. Un método para desgomar un aceite o una grasa, que comprende
- a) proporcionar un polipéptido según la reivindicación 4, o una composición que comprende un polipéptido según la reivindicación 11, o una composición que comprende una mezcla de enzimas de la reivindicación 13;
- (b) proporcionar una composición que comprende una grasa o aceite que contiene fosfolípidos; y
- 25 (c) poner en contacto el polipéptido o composición de la etapa (a) y la composición que comprende la grasa o aceite que contiene fosfolípidos de la etapa (b) bajo condiciones en donde el polipéptido o mezcla de enzimas pueden catalizar la hidrólisis de un fosfolípido en la grasa o aceite.
- 30

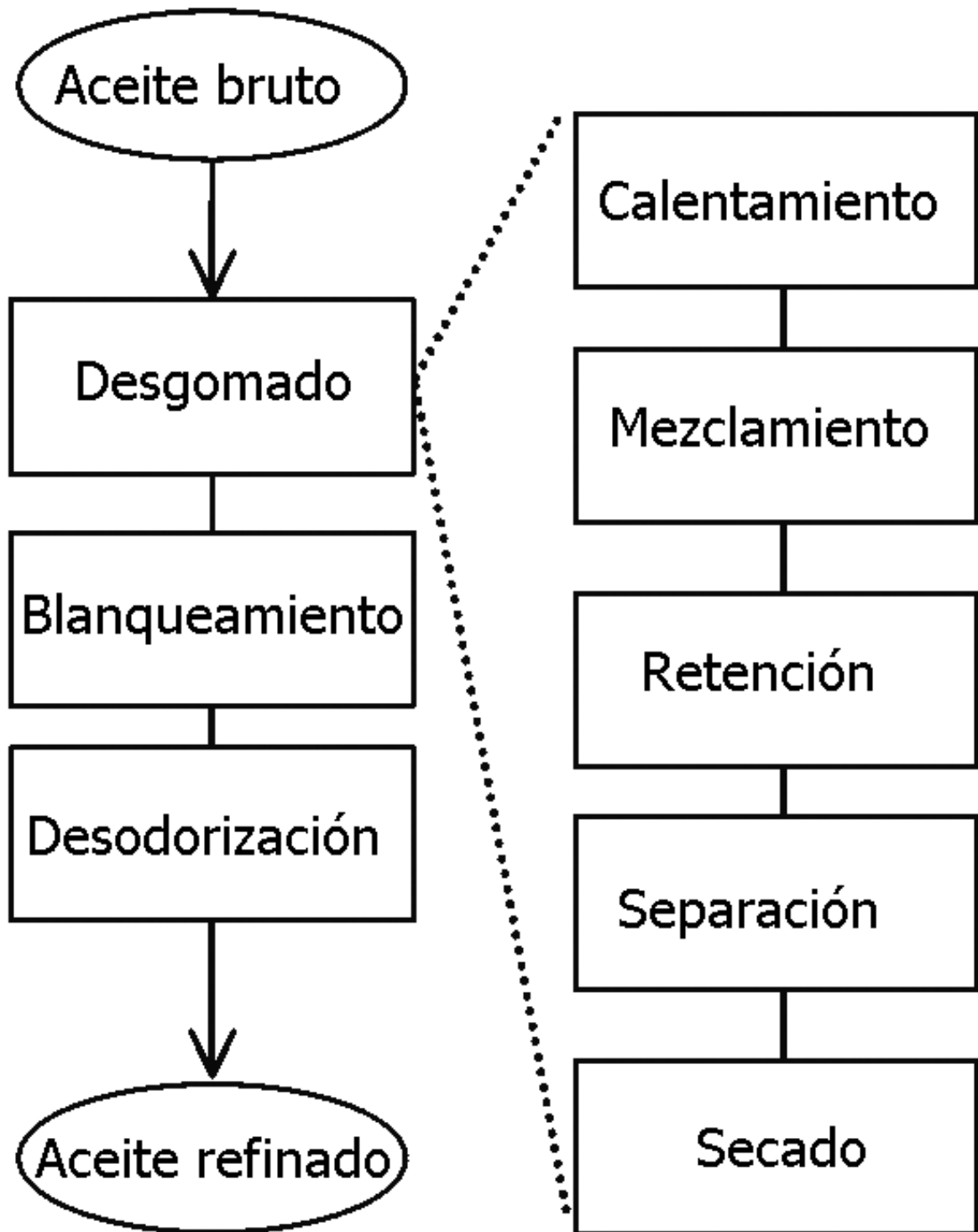


FIGURA 1

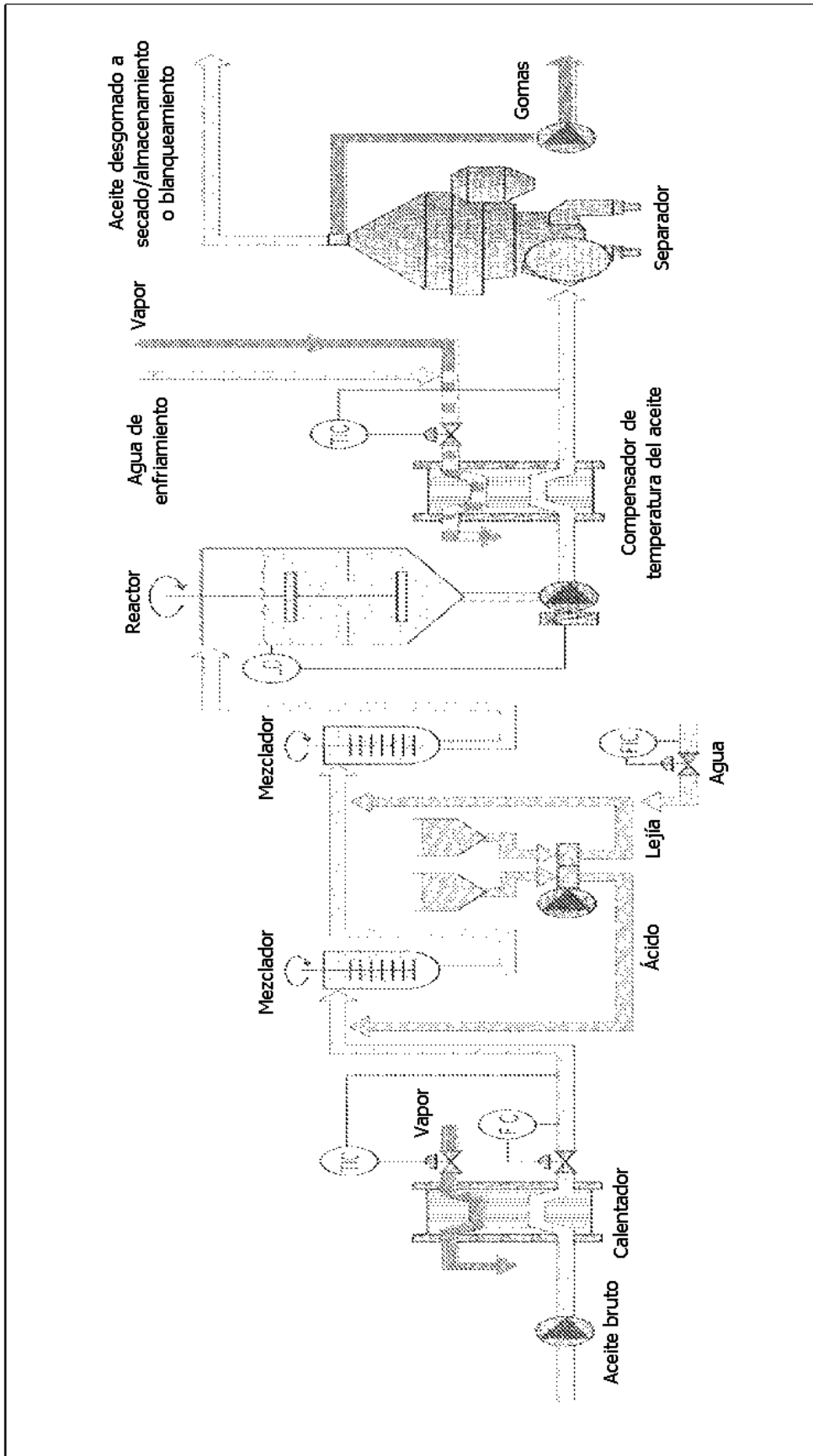


FIGURA 2

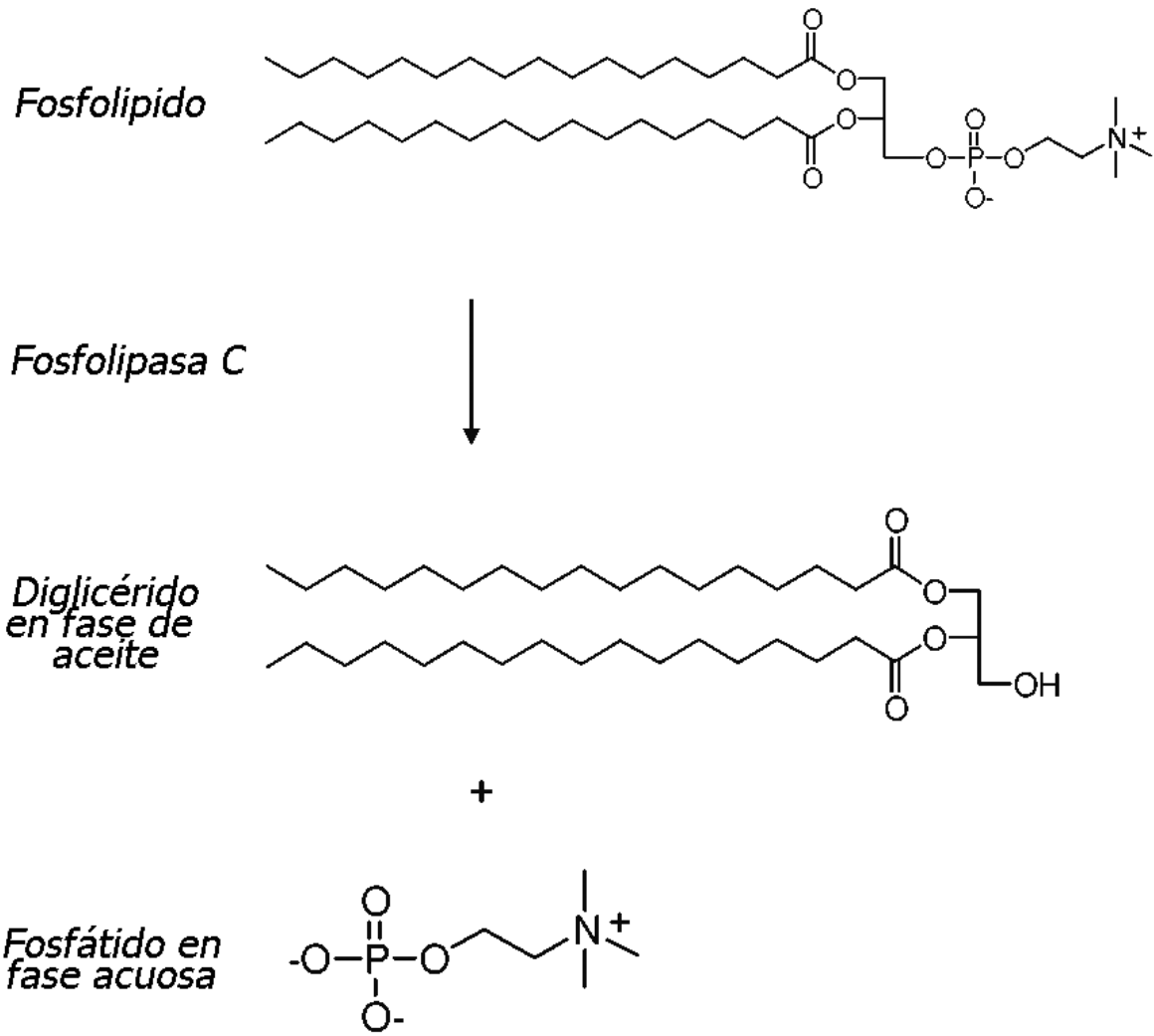


FIGURA 3

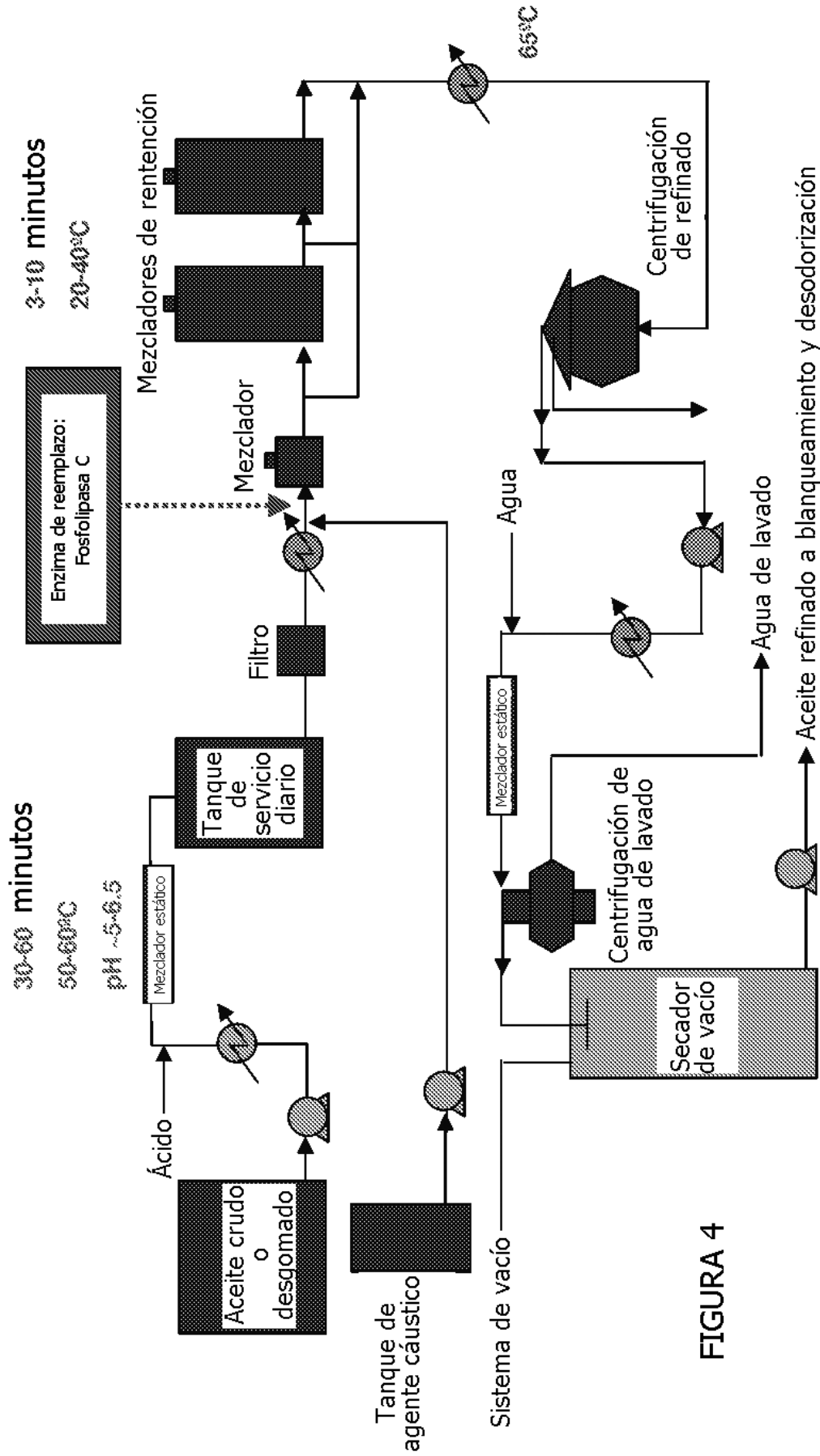


FIGURA 4

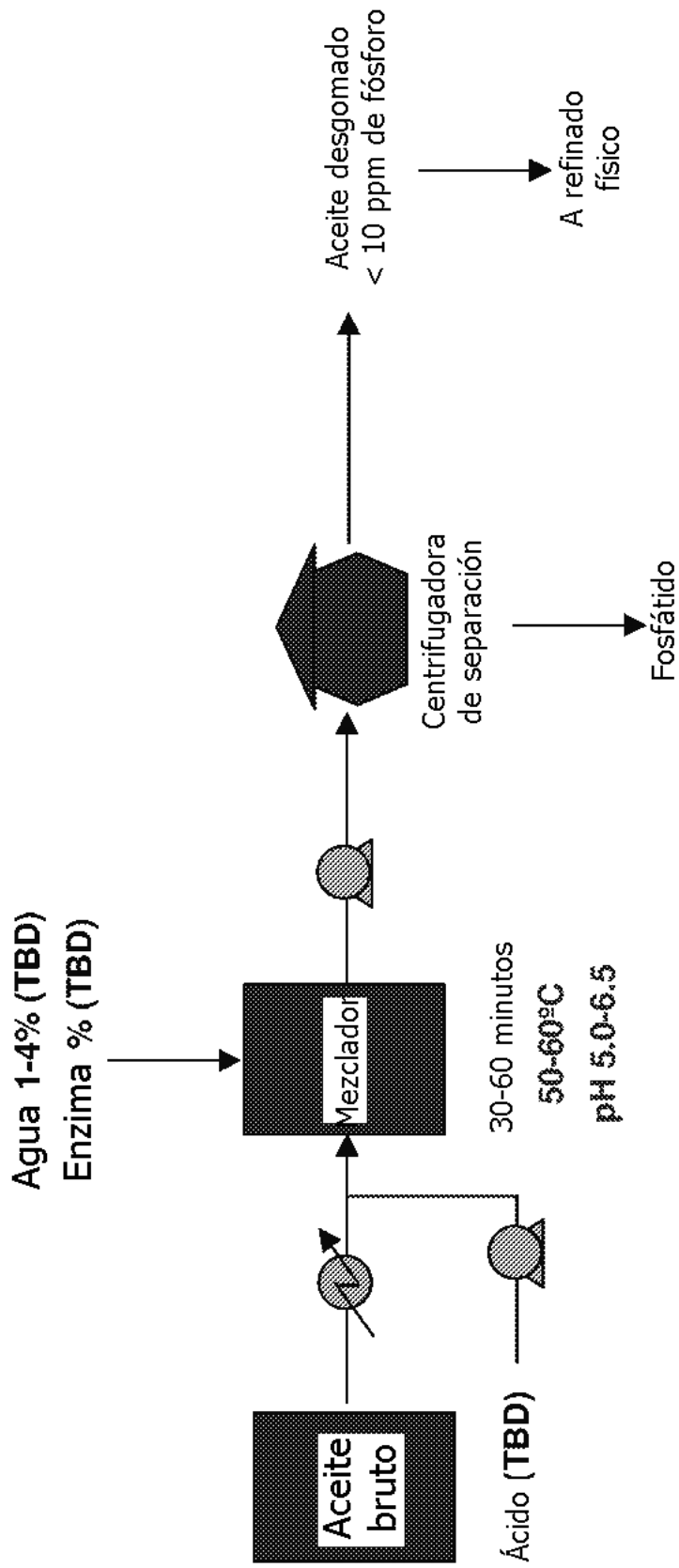


FIGURA 5

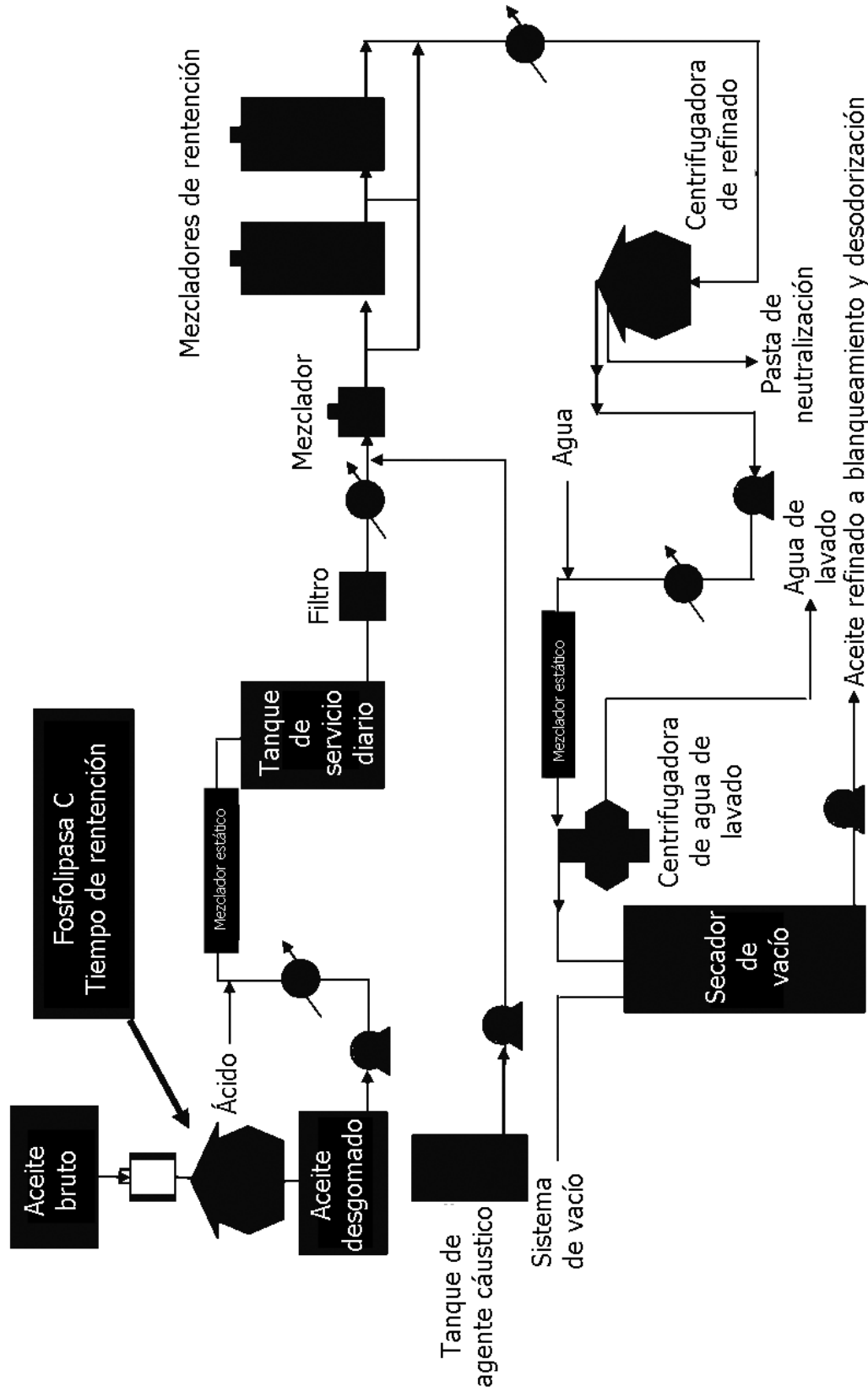
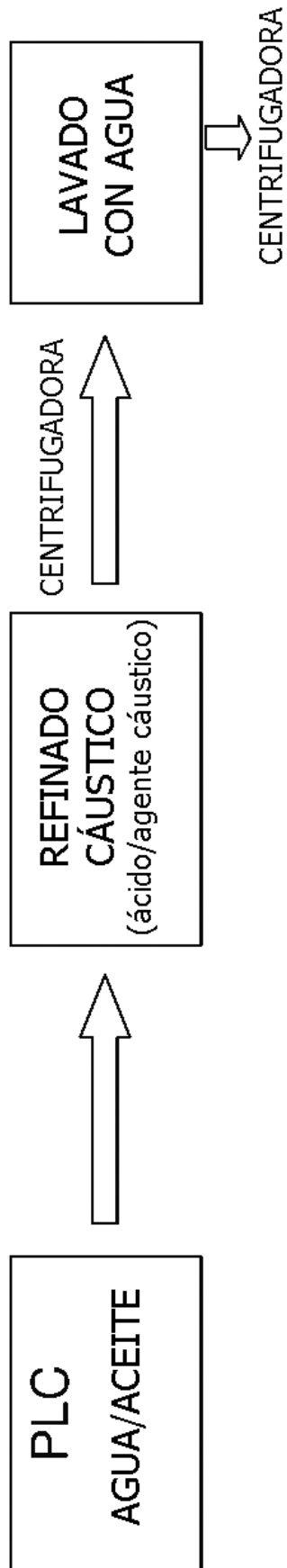


FIGURA 6 - Biodesgomado PLC



(Soja bruto): proceso de 2 etapas de centrifugación

FIGURA 7



(Soja bruto): proceso de 3 etapas de centrifugación

FIGURA 8



(Aceite de soja bruto) proceso con etapa de centrifugación y tratamiento con ácido

FIGURA 9

ES 2 590 037 T3

mutación	Codón original	Codón mutado	Fracción en peso de PL total después de la reacción								DAG liberado (lib. Por HPLC)
			PA	PE	PI	PC	PA (μ M)	PI (μ M)	PI/PA (μ M)	(TIP/P)/(PA/TIP)	
E41A	GAG	GCA	0.083	0.000	0.337	0.000	234	985	4.209	7.445	1.407
E41W	GAG	TGG	0.061	0.000	0.301	0.000	173	878	5.075	10.973	1.339
E41F	GAG	TTC									
E41Y	GAG	TAC									
E41R	GAG	CGT									
E94R	GAG	CGG	0.056	0.000	0.294	0.000	158	859	5.437	12.015	1.354
D100L	GAT	TTG	0.000	0.000	0.276	0.000	0	806	#DIV/0!	#DIV/0!	1.358
D100M	GAT	ATG	0.000	0.000	0.293	0.000	0	854	#DIV/0!	#DIV/0!	1.350
D100Y	GAT	TAT	0.044	0.000	0.359	0.000	124	1043	8.411	12.023	1.343
D100F	GAT	TTT	0.030	0.000	0.396	0.000	84	1150	13.690	17.307	1.338
D100W	GAT	TGG	0.034	0.000	0.270	0.000	97	792	8.165	21.728	1.226
A104L	GCT	CTT	0.069	0.000	0.318	0.000	195	926	4.749	9.388	1.273
D111R	GAT	AGG	0.096	0.000	0.374	0.000	268	1087	4.056	5.476	1.304
T112R	ACT	CGG	0.057	0.000	0.330	0.000	162	971	5.994	10.530	1.302
Y116W	TAT	TGG	0.086	0.000	0.428	0.000	245	1256	5.127	5.450	1.300
I117W	ATT	TGG	0.093	0.000	0.347	0.000	264	1018	3.856	6.288	1.288
P118W	CCT	TGG	0.051	0.000	0.292	0.000	143	851	5.951	14.102	1.376
E125K	GAA	AAG	0.067	0.000	0.301	0.000	189	875	4.630	9.938	1.352
D171V	GAT	GTG	0.052	0.000	0.338	0.000	145	986	6.800	12.003	1.430
D171E	GAT	GAG	0.074	0.000	0.317	0.000	209	927	4.435	8.391	1.463
M176W	ATG	TGG	0.021	0.000	0.359	0.000	59	1055	17.881	26.363	1.481
D230H	GAT	CAT	0.048	0.000	0.308	0.000	135	893	6.615	13.569	1.366
D230R	GAT	CGT	0.053	0.000	0.308	0.000	148	896	6.054	13.100	1.339
D234W	GAT	TGG	0.045	0.000	0.302	0.000	127	881	6.937	14.552	1.382
D234V	GAT	GTG	0.051	0.000	0.312	0.000	145	915	6.310	13.574	1.349
D234G	GAT	GGT	0.057	0.000	0.297	0.000	162	873	5.389	12.320	1.377
D234R	GAT	CGG	0.043	0.000	0.310	0.000	120	897	7.475	16.582	1.344
D234K	GAT	AAG	0.045	0.000	0.280	0.000	126	809	6.421	15.011	1.336
Q265R	CAG	CGT	0.074	0.000	0.000	0.000	209	0	0.000	#DIV/0!	1.441
precursor (SEQ ID NO:175)			0.072	0.000	0.278	0.000	205	816	3.980	9.948	1.338
precursor (SEQ ID NO:175)			0.082	0.000	0.280	0.000	230	811	3.526	9.186	1.428
Control positivo (E41A)			0.021	0.000	0.340	0.000	59	985	16.690	28.320	1.470
Control negativo			0.119	0.450	0.357	0.643	338	1049	3.104	4.672	0.466
Control negativo			0.096	0.346	0.234	0.517	270	681	2.522	9.093	0.417

FIGURA 10

Mutantes aceleradores de GSSM seleccionados para la inclusión en la genoteca de GeneReassembly

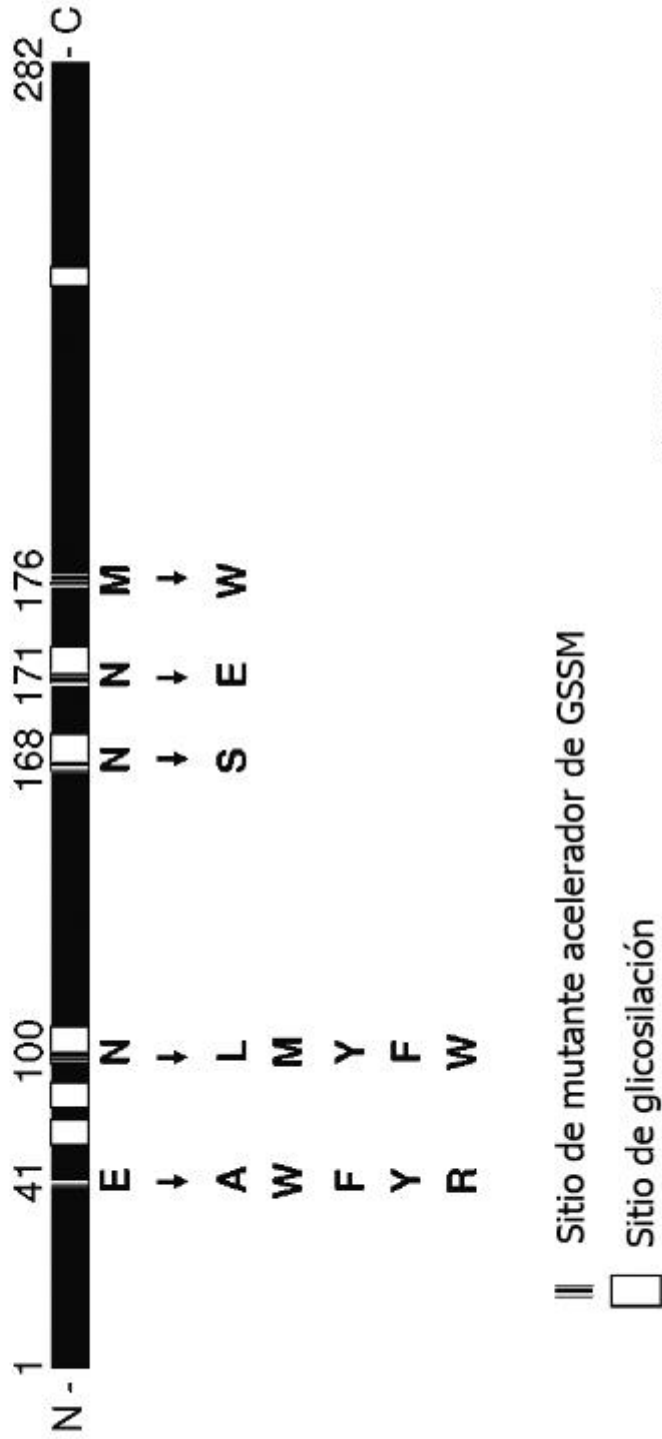


FIGURA 11

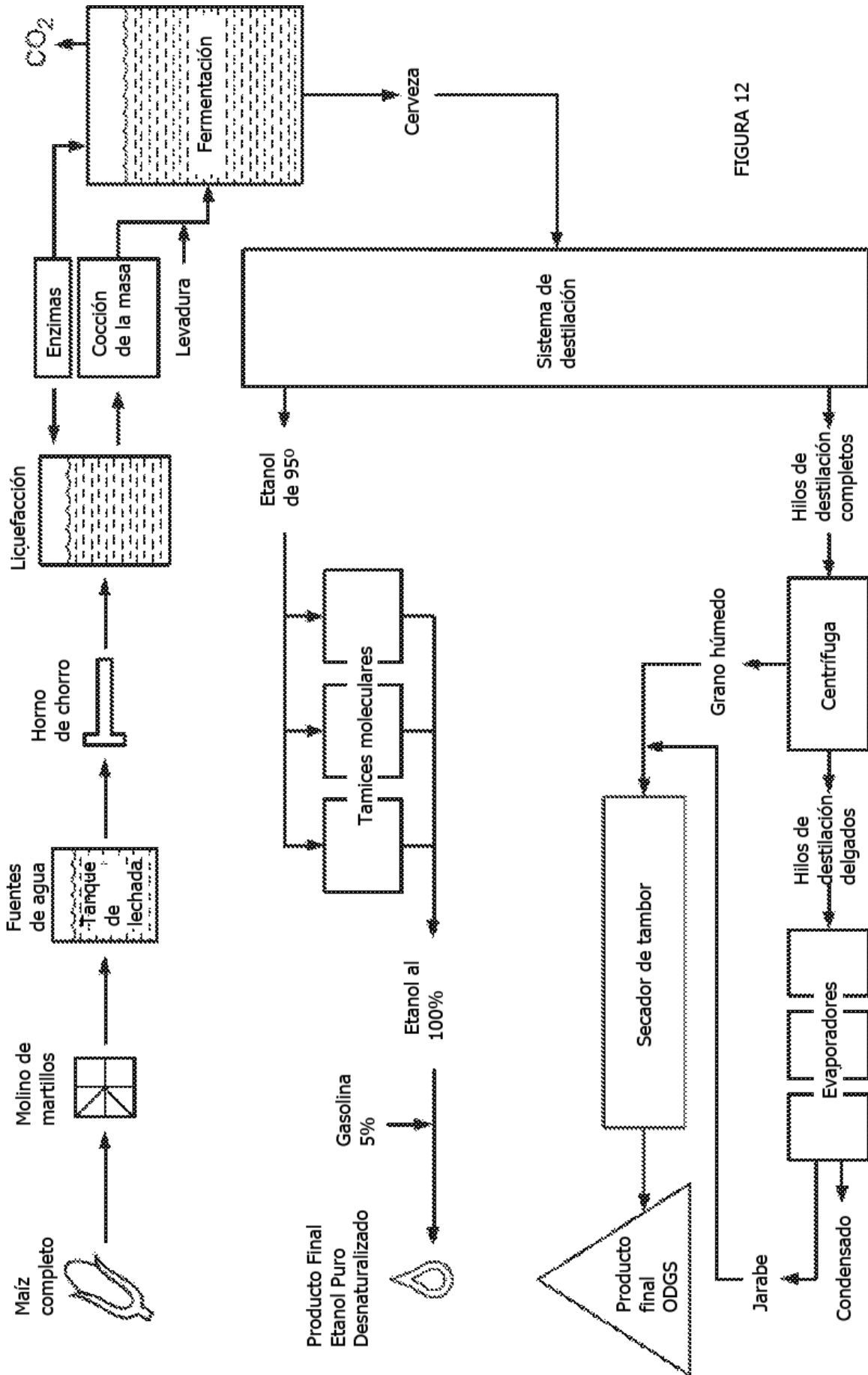


FIGURA 12

FIGURA 13

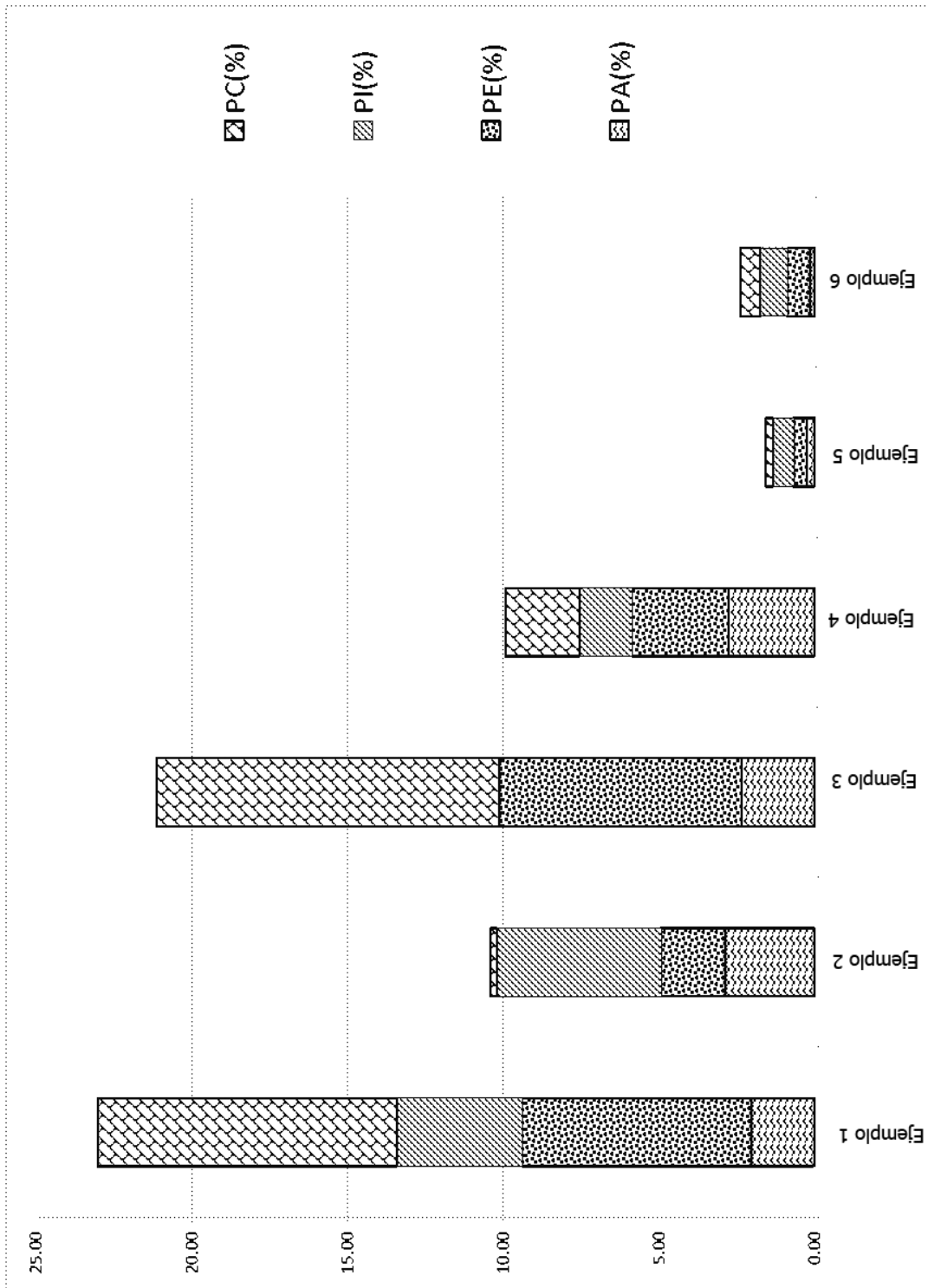


FIGURA 14

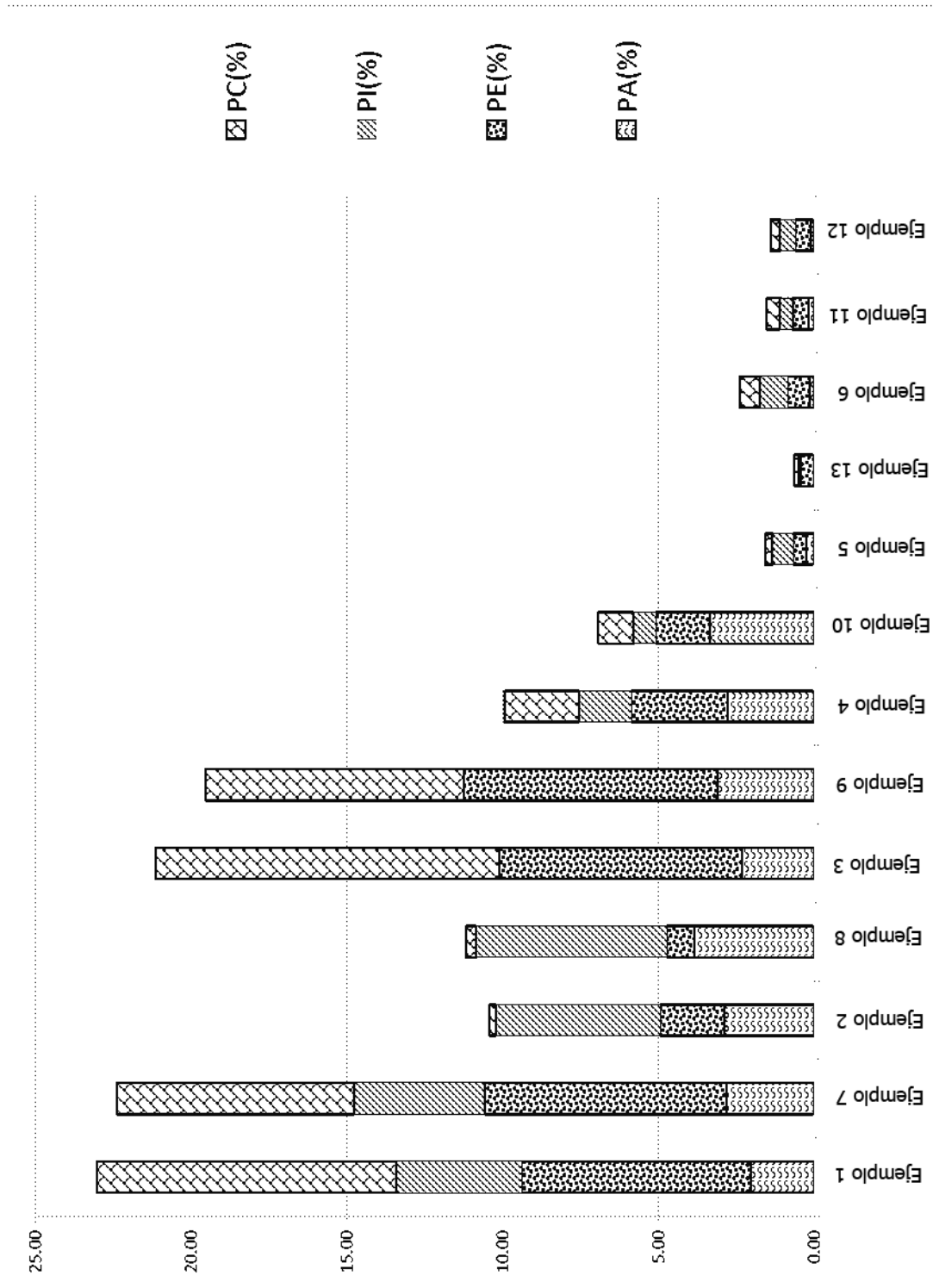


FIGURA 15

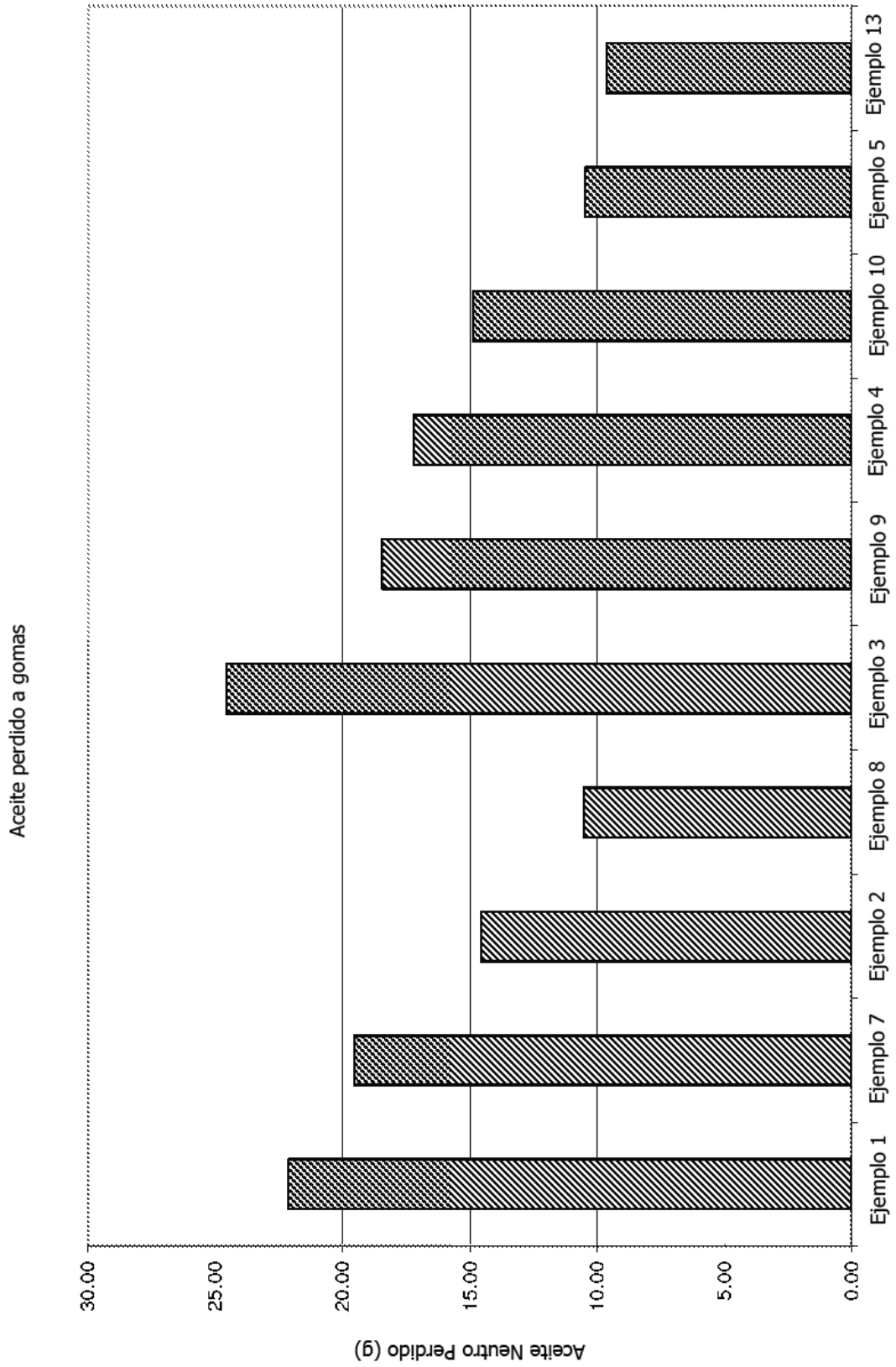
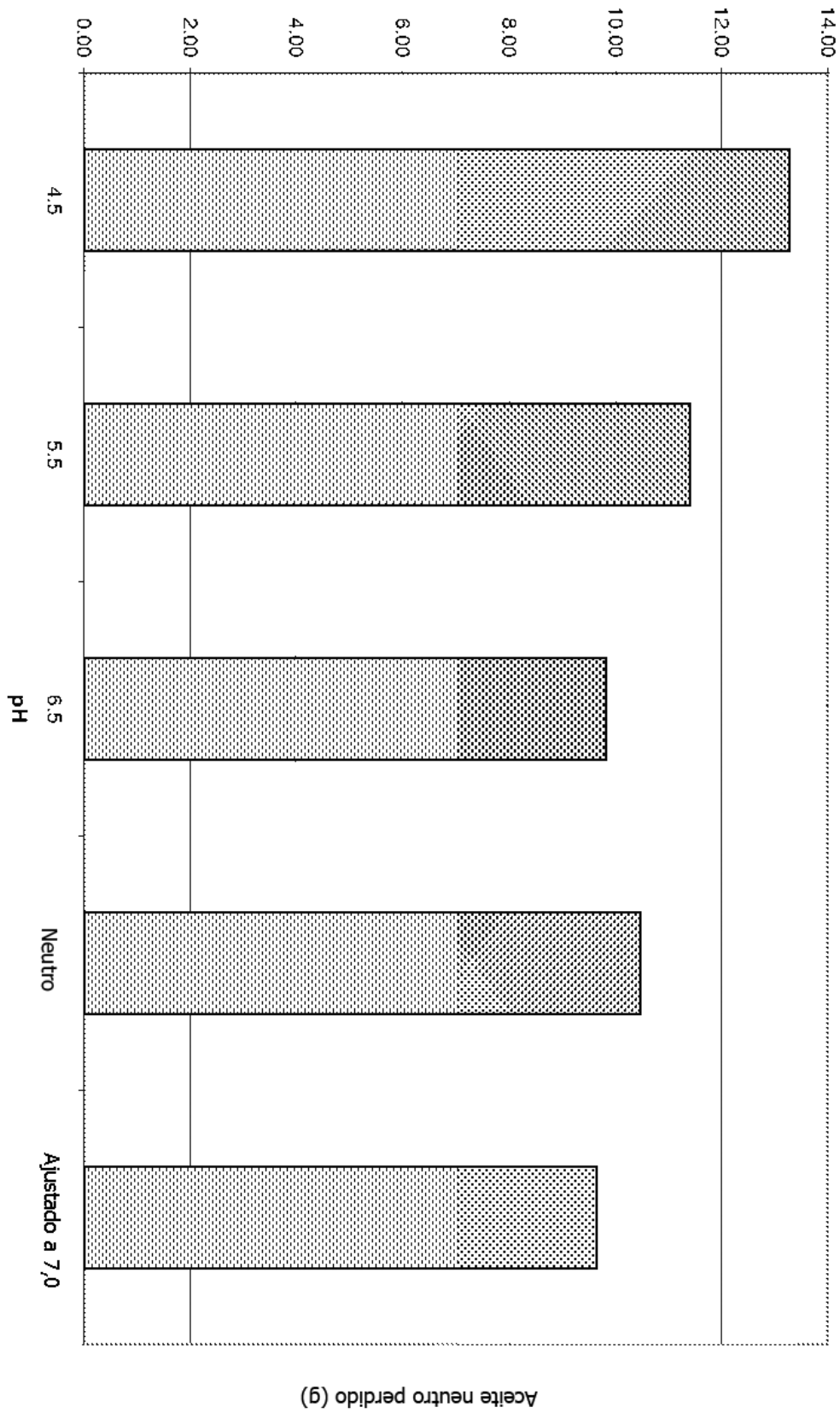


FIGURA 16



Fosfolipasa A1

FIGURA 17

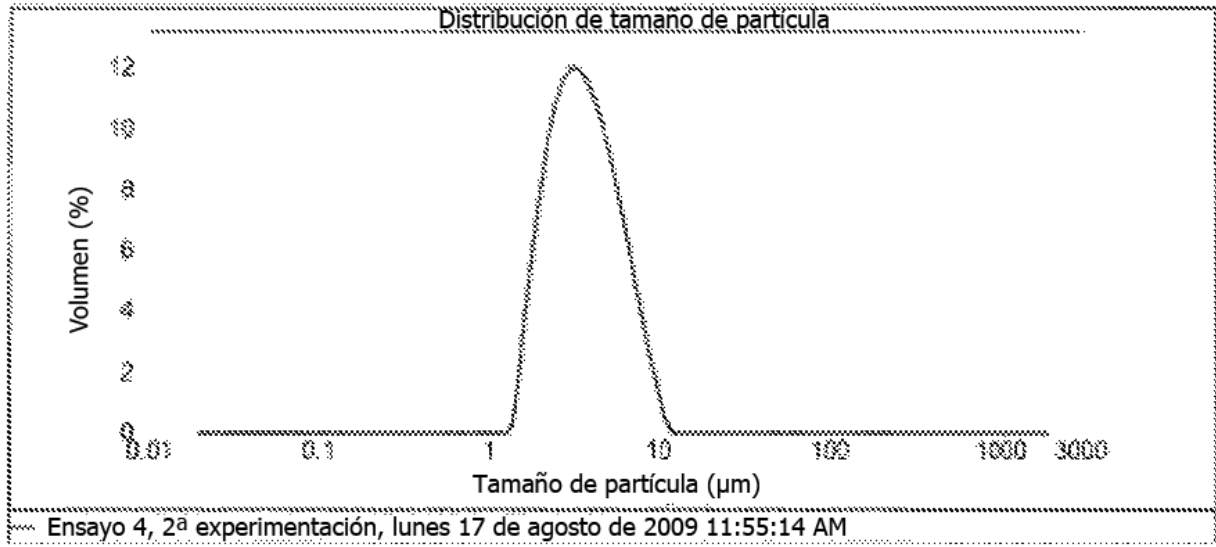


FIGURA 18

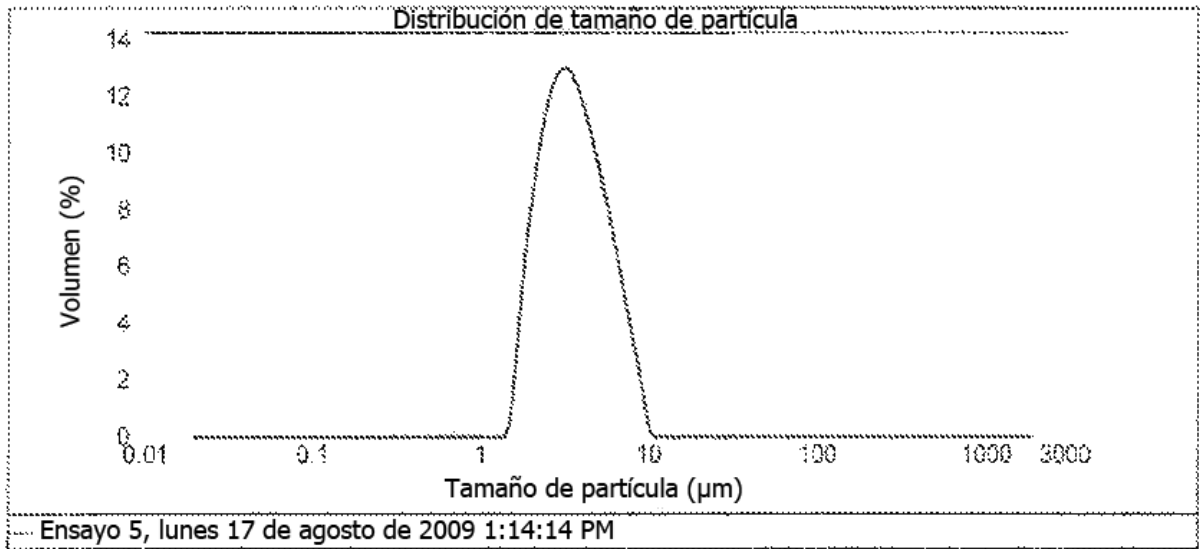


FIGURA 19

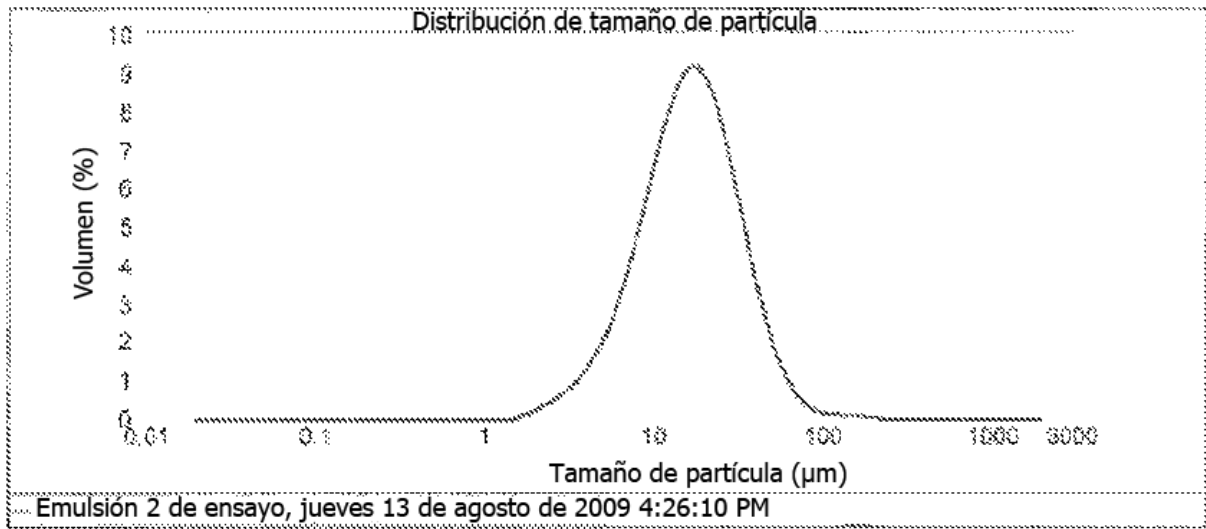


FIGURA 20

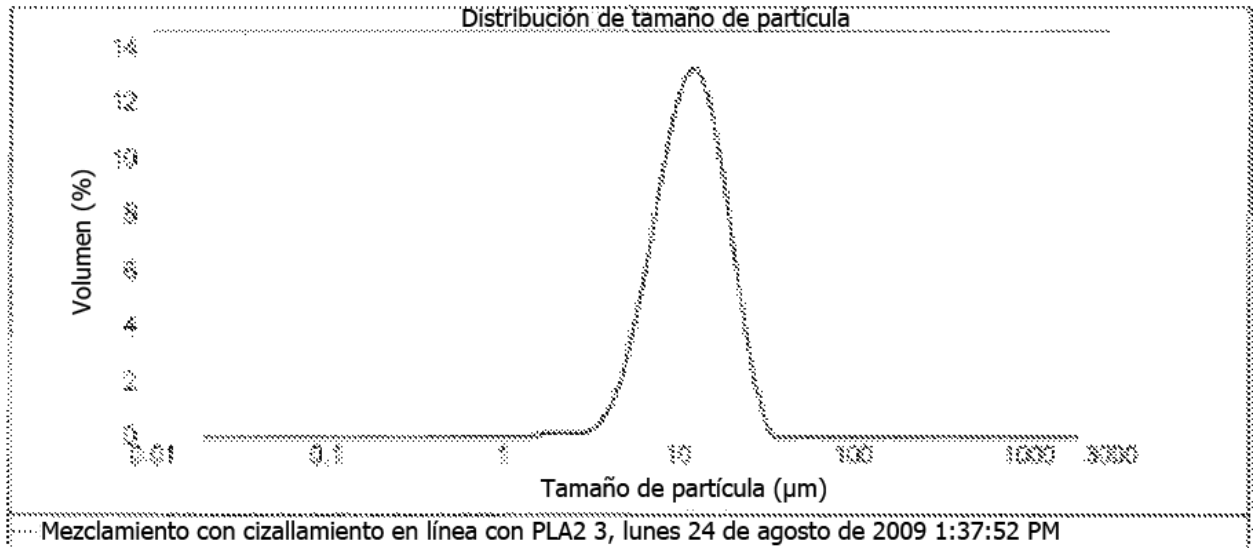
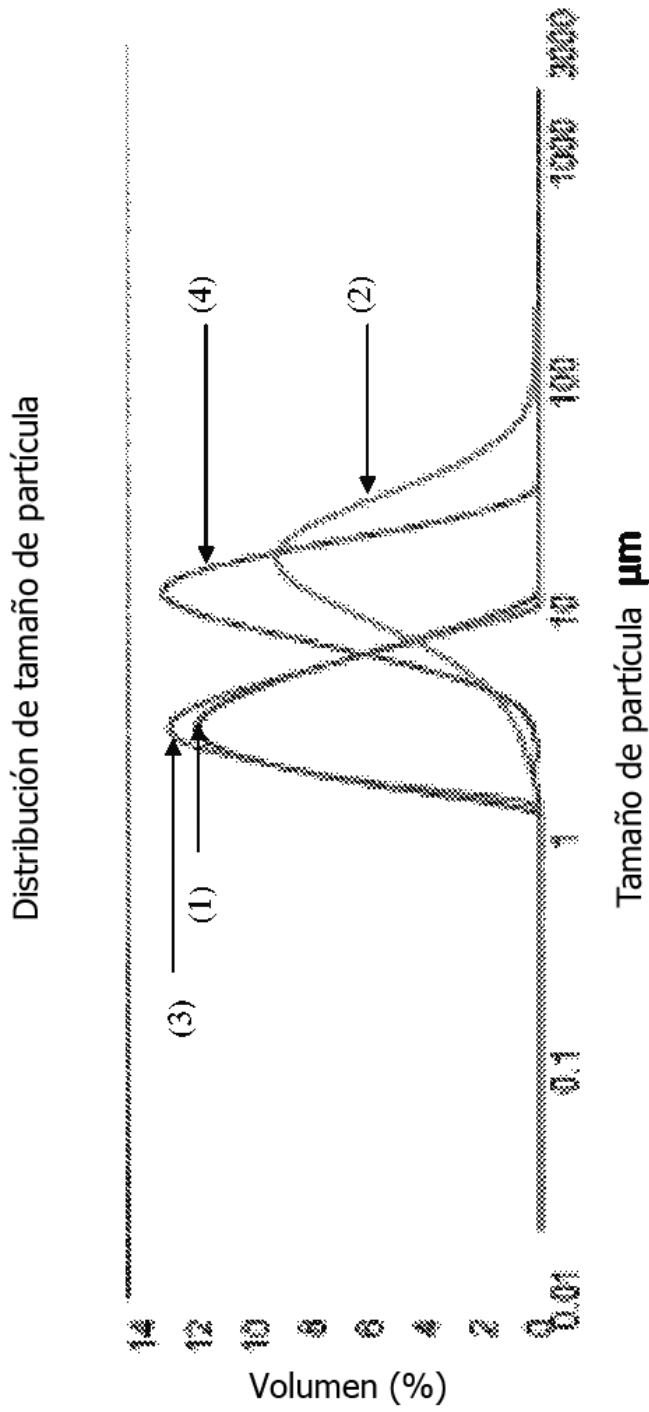


FIGURA 21



- (1) Ensayo 4; 2ª experimentación, lunes 17 de agosto de 2009 11:55:14 AM
- (2) Emulsión 2 de ensayo, jueves 13 de agosto de 2009 4:26:10 PM
- (3) Ensayo 5, lunes 17 de agosto de 2009 1:14:14 PM
- (4) Mezclamiento con ciazallamiento en línea con PLA3, lunes 24 de agosto de 2009 1:34:52 PM