

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 912**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2012 PCT/IB2012/050715**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.08.2012 WO12114234**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2012 E 12706934 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2678438**

54 Título: **Tratamiento enzimático de la clorofila en los aceites vegetales**

30 Prioridad:

23.02.2011 US 201161445665 P

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

16.01.2018

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)**

**Langebrogade 1 P.O. Box 17
1001 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**SØE, JØRN BORCH;
JØRGENSEN, TINA LILLAN;
LAURIDSEN, LENE;
MIKKELSEN, RENE y
BRUNSTEDT, JANNE**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 649 912 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

Tratamiento enzimático de la clorofila en los aceites vegetales

Campo

5 La presente invención hace referencia al procesamiento industrial de los aceites vegetales. En particular, la invención hace referencia a los estereoisómeros *a'* y *b'* de la clorofila. La invención se podría emplear para reducir o eliminar la contaminación por clorofila o por derivados de la clorofila.

Antecedentes

10 La clorofila es un pigmento de color verde que se encuentra ampliamente extendido por todo el reino vegetal. La clorofila es esencial para la fotosíntesis y es uno de los compuestos organometálicos más abundante de los que se encuentran en la Tierra. Así pues, muchos productos derivados de las plantas, entre ellos los alimentos y los piensos, contienen cantidades significativas de clorofila.

15 Por ejemplo, los aceites vegetales procedentes de semillas oleaginosas, tales como soja, palma o colza (canola), semilla de algodón y aceite de cacahuete, contienen típicamente algo de clorofila. Sin embargo, no suele ser deseable la presencia de una elevada concentración de pigmentos clorofilicos en los aceites vegetales. Esto se debe a que la clorofila otorga un color verde indeseable y puede inducir a la oxidación del aceite durante el almacenamiento, lo que conduce al deterioro del aceite.

20 Se han empleado diferentes métodos para retirar la clorofila de los aceites vegetales. La clorofila se podría retirar durante muchas etapas del proceso de producción del aceite, entre ellas las etapas de aplastamiento de las semillas, extracción del aceite, desgomado, tratamiento caústico y blanqueo. Sin embargo, la etapa del blanqueo suele ser la más significativa para reducir los residuos de la clorofila hasta un nivel aceptable. Durante el blanqueo, se calienta el aceite y se hace pasar por un adsorbente para retirar la clorofila y otros compuestos coloreados que repercuten en el aspecto y/o la estabilidad del aceite acabado. El adsorbente utilizado típicamente en la etapa de blanqueo es la arcilla.

25 En la industria del procesamiento de aceites comestibles, el uso de tales etapas reduce típicamente la cantidad de clorofila en el aceite procesado a entre 0,02 y 0,05 ppm. Sin embargo, la etapa de blanqueo incrementa el coste del procesamiento y reduce el rendimiento del aceite debido al arrastre en la arcilla usada para el blanqueo. La utilización de arcilla podría retirar del aceite muchos compuestos deseables, tales como los carotenoides y el tocoferol. De igual forma, el uso de la arcilla es caro, en concreto debido al tratamiento de la arcilla utilizada (a saber, el residuo) que puede ser difícil, peligroso (propenso a la autoignición) y, así pues, su manipulación resulta costosa. Así pues, se han dedicado muchos esfuerzos para retirar la clorofila del aceite por otros medios, por ejemplo, con el uso de la enzima clorofilasa.

35 En las plantas, se piensa que la clorofilasa (clfasa) interviene en la degradación de la clorofila y cataliza la hidrólisis de un enlace éster de la clorofila para producir clorofilida y fitol. En la solicitud de patente internacional WO 2006009676 se describe un proceso industrial en el que la contaminación de la clorofila de una composición, tal como un aceite vegetal, se puede reducir mediante el tratamiento con la clorofilasa. La clorofilida hidrosoluble que se produce en este proceso también es de color verde, pero se puede retirar mediante una extracción acuosa o tratamiento con sílice.

40 La clorofila se degrada a menudo de forma parcial en las semillas utilizadas para la producción de aceite, así como durante la extracción del aceite a partir de las semillas. Una modificación frecuente es la pérdida del ion de magnesio del anillo de porfirina (clorina) para formar el derivado denominado feofitina (véase la figura 1). La pérdida del ion de magnesio altamente polar del anillo de porfirina confiere unas propiedades físico-químicas significativamente diferentes a la feofitina en comparación con la clorofila. Típicamente, la feofitina es más abundante que la clorofila en el aceite durante el procesamiento. La feofitina tiene un color verdusco y se podría retirar del aceite mediante un procedimiento análogo al utilizado para la clorofila, por ejemplo, tal y como se describe en la solicitud de patente internacional WO 2006009676 mediante una reacción de tipo esterasa catalizada por una enzima que tiene una actividad feofitinasas. En determinadas condiciones, algunas clorofilasas son capaces de hidrolizar la feofitina al igual que la clorofila, y son, por lo tanto, idóneas para retirar ambos contaminantes. Los productos de la hidrólisis de la feofitina son la feoforbida de color rojo/pardusco y el fitol. La feoforbida también se puede producir por la pérdida de un ion de magnesio de la clorofilida, a saber, después de la hidrólisis de la clorofila (véase la figura 1). La solicitud de patente internacional WO 2006009676 enseña cómo se retira la feoforbida mediante un método análogo al de la clorofilida, p. ej., mediante la extracción acuosa o la adsorción en sílice.

55 La feofitina se podría degradar adicionalmente en pirofeofitina, ambos mediante la actividad de las enzimas de la planta durante la recolección y conservación de las semillas oleaginosas, o por las condiciones de procesamiento (p. ej., calor) durante el refinado del aceite (véase «Behaviour of Chlorophyll Derivatives in Canola Oil Processing», JAOCS, vol. n.º 9 (septiembre de 1993), páginas 837-841). Un posible mecanismo es la hidrólisis enzimática del enlace éster del metilo del anillo isocíclico de la feofitina seguido de la conversión no enzimática del intermedio inestable en pirofeofitina. Se ha descrito que una enzima de 28 a 29 kDa de *Chenopodium album* denominada

feoforbidasas es capaz de catalizar una reacción análoga sobre la feoforbida para producir el derivado de la pirofeofitina que carece de fitol, denominado pirofeoforbida (véase la figura 1). La pirofeoforbida es menos polar que la feoforbida, lo que da lugar a que la pirofeoforbida sea menos hidrosoluble y más soluble en aceite que la feoforbida.

5 Según las condiciones del procesamiento, la pirofeofitina puede ser más abundante que la feofitina y que la clorofila en los aceites vegetales durante el procesamiento (véase la tabla 9 en el volumen 2.2 de *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005), 6.^a edición, ed. Fereidoon Shahidi, John Wiley & Sons). Esto se debe en parte a la pérdida del magnesio de la clorofila durante la recolección y la conservación del material vegetal. Si se utiliza un tratamiento extenso con calor a 90°C o superior, la cantidad de pirofeofitina en el aceite probablemente se incremente y pueda ser mayor que la cantidad de feofitina. La cantidad de clorofila también se reduce al calentar las semillas oleaginosas antes del prensado y de la extracción, así como el desgomado del aceite y el tratamiento alcalino durante el proceso de refinado. También se ha observado que los fosfolípidos del aceite pueden formar complejo con el magnesio y de esta forma reducir la cantidad de clorofila. Así pues, la clorofila es un contaminante relativamente menor en comparación con la pirofeofitina (y la feofitina) en muchos aceites vegetales.

15 Cada uno de los cuatro derivados de la clorofila, clorofila a y b y feofitina a y b, existen como un par de epímeros determinados por la estereoquímica del H y del COOCH₃ en torno al carbono de número 13² (numeración de acuerdo con el sistema de la IUPAC, marcado con asterisco en la figura 2). Así pues, la clorofila a existe como el par de epímeros clorofila a y clorofila a', y la clorofila b comprende las formas b y b'. De igual modo, la feofitina a comprende el par de epímeros a y a', y la feofitina b comprende las formas b y b'. Las formas con la prima (') tienen la estereoquímica S y las formas sin la prima tienen la estereoquímica R en torno al átomo de carbono 13². La epimerización de, por ejemplo, la forma a en la forma a' y viceversa puede tener lugar en determinadas condiciones a través de un enol común, tal y como se describe en «Epimerization in the pheophytin a/a' system», *Chemistry Letters* (1984), 1411-1414. En solución, hay típicamente un equilibrio que dictamina la distribución de los compuestos de clorofila con la prima y sin la prima, y esto se determina a menudo mediante parámetros físicos, tales como la temperatura, el pH, el solvente y así sucesivamente.

En general, las enzimas actúan típicamente como catalizadores estereoespecíficos al tener actividad solo sobre un estereoisómero. Los análisis previos sugirieron que las clorofilasas poseen un alto grado de estereoespecificidad al catalizar solo la hidrólisis de las formas sin la prima de los compuestos de clorofila (véase «The stereospecific interaction between chlorophylls and chlorophyllase», *J. Biol. Chem.* 267 (31): 22043-22047 (1992)).

30 En los métodos que sirven para retirar la clorofila y los derivados de la clorofila del aceite vegetal que emplean clorofilasas o enzimas relacionadas, la estereoespecificidad de la enzima podría resultar problemática. En particular, según la distribución y el equilibrio de los estereoisómeros de la clorofila en el aceite, puede ser muy difícil una degradación completa de los componentes de la clorofila. Por ejemplo, si existe una proporción significativa de clorofila o del derivado de la clorofila en la forma con prima, esta fracción de los derivados de la clorofila presente en el aceite puede ser resistente a la degradación enzimática. Además, un número de enzimas muestran una actividad mucho más baja sobre la pirofeofitina que sobre, por ejemplo, la feofitina. La patente de los Estados Unidos US 2008/0070291 hace referencia a composiciones y métodos para el tratamiento enzimático de las composiciones con clorofila, entre ellas los aceites vegetales y las preparaciones de plantas. Entre las enzimas descritas se encuentra la de la SEQ ID n.º 2 de la presente invención. En Arkus et al., 2005 (*Arch Biochem Biophysics* 438: 146-155), se enseña la clonación de la clorofilasa de *Triticum aestivum* (trigo) y se da a conocer un análisis detallado de cómo funciona la enzima.

La solicitud de patente internacional WO 2010/143149 describe los métodos y usos para el tratamiento de las composiciones que contienen pirofeofitina, en particular para retirar la pirofeofitina.

45 El n.º de acceso B9RTK6 de la base de datos UniProt da a conocer la secuencia de una clorofilasa de *Ricinus communis* (semilla de ricino), SEQ ID n.º 13 de la presente invención. Este problema con los métodos existentes se ilustra en la figura 3. En la figura 3 se muestra la epimerización de la feofitina a y la conversión en pirofeofitina. El pH de una mezcla de agua y aceite vegetal bruto (p. ej., que comprende agua a aproximadamente el 1-2%) está típicamente de en torno a 5,0 a aproximadamente 60°C. En tales condiciones, en el aceite de soja o en el aceite de colza brutos, una distribución del epímero a de la feofitina es típicamente la feofitina a al 70% (estereoisómero R) y la feofitina a' al 30% (estereoisómero S), y la isomerización entre los dos epímeros es lenta. Además, se pueden formar cantidades variables de pirofeofitina según las condiciones de la reacción. Si la enzima utilizada en la reacción es predominantemente activa sólo sobre la feofitina a, la enzima no podrá hidrolizar de manera directa una proporción significativa de los derivados de la clorofila presentes en el aceite a pH intacto.

55 Así pues, existe la necesidad de un procedimiento mejorado para retirar la clorofila y los derivados de la clorofila, tales como la feofitina y la pirofeofitina, de los aceites vegetales. En particular, existe la necesidad de un procedimiento que mejore la retirada de las diferentes formas de la clorofila y de los derivados de la clorofila que hay en el aceite.

Compendio

5 En un aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para el tratamiento de un aceite vegetal, que comprende una etapa de poner en contacto el aceite con una enzima, en donde la enzima es capaz de hidrolizar un estereoisómero *a'* o *b'* de la clorofila, o un derivado de la clorofila, y en donde la enzima comprende un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 13.

En una realización, el estereoisómero *a'* o *b'* comprende clorofila *a'*, feofitina *a'*, clorofila *b'* o feofitina *b'*. Preferiblemente, el estereoisómero es un estereoisómero *a'* de la clorofila o del derivado de la clorofila, p. ej., clorofila *a'* o feofitina *a'*.

10 En una realización, la enzima tiene una razón de actividad sobre un estereoisómero *a* de la clorofila o de un derivado de la clorofila, en comparación con un estereoisómero *a'* de la clorofila o del derivado de la clorofila, de menos de 10, de menos de 5 o de menos de 2. En una realización alternativa, la enzima tiene una razón de actividad sobre un estereoisómero *b* de la clorofila o de un derivado de la clorofila, en comparación con un estereoisómero *b'* de la clorofila o del derivado de la clorofila, de menos de 10, de menos de 5 o de menos de 2.

15 En una realización, después del tratamiento con la enzima, el aceite comprende al menos el 50% de los estereoisómeros *a* de la clorofila o del derivado de la clorofila, basándose en la cantidad total de los estereoisómeros *a* y *a'* de la clorofila o del derivado de la clorofila en el aceite. En una realización alternativa, después del tratamiento con la enzima, el aceite comprende al menos el 50% de los estereoisómeros *b* de la clorofila o del derivado de la clorofila, basándose en la cantidad total de los estereoisómeros *b* y *b'* de la clorofila o del derivado de la clorofila en el aceite.

20 En otras realizaciones, la enzima tiene una razón de actividad sobre la feofitina en comparación con la pirofeofitina de menos de 10, de menos de 8 o de menos de 5.

En otras realizaciones, la enzima comprende la actividad clorofilasa, feofitinasas y/o pirofeofitinasas, a saber, actividad hidrolítica sobre clorofila, feofitina y/o pirofeofitina.

En otras realizaciones, la enzima procede de *Ricinus communis*.

25 En otro aspecto más, la presente invención da a conocer el uso de una enzima que es capaz de hidrolizar la clorofila o un derivado de la clorofila, para retirar un estereoisómero *a'* o *b'* de la clorofila o del derivado de la clorofila, a partir de un aceite vegetal, en donde la enzima tiene una actividad hidrolítica de al menos 1000 U/g, basándose en las unidades de actividad por gramo de enzima purificada, sobre un estereoisómero con prima de la clorofila o de un derivado de la clorofila, y en donde una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza un micromol de sustrato por minuto a 40°C, en donde el ensayo para medir la actividad hidrolítica es como sigue:

a) se añaden 170 µl de HEPES a 50 mM, pH 7, a 20 µl de clorofila, feofitina o pirofeofitina a 10,3 mM disuelta en acetona;

b) la enzima se disuelve en HEPES a 50 mM, pH 7;

35 c) se añaden 10 µl de la solución enzimática a 190 µl de la solución con el sustrato para iniciar la reacción, y se incuba a 40°C durante diferentes periodos de tiempo;

d) se para la reacción mediante la adición de 350 µl de acetona;

40 e) después de la centrifugación durante 2 min a 18.000g, el sobrenadante se analiza por HPLC y se determina la cantidad de (i) clorofila y clorofilida, (ii) feofitina y feoforbida, o (iii) pirofeofitina y pirofeoforbida; en donde la enzima comprende un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 2 o la SEQ ID n.º 13.

45 Tal y como se describe en la presente memoria, se han identificado enzimas que muestran, de forma sorprendente, actividad hidrolítica sobre formas con la prima, así como sobre las formas sin la prima, de los derivados de la clorofila. Además, tales enzimas también podrían mostrar un incremento de la actividad hidrolítica sobre la pirofeofitina en comparación con las enzimas utilizadas en los métodos conocidos. Tales enzimas se pueden utilizar ventajosamente para potenciar la retirada de las diferentes formas de los derivados de la clorofila a partir de los aceites vegetales.

Breve descripción de los dibujos

50 En la figura 1 se muestran las reacciones en las que intervienen la clorofila, sus derivados, y las enzimas que se utilizan en la presente invención (tal y como está definido en las reivindicaciones 1 y 10).

En la figura 2 se muestra la feofitina a, en donde el C-13² de acuerdo con el sistema de numeración de la IUPAC está marcado con un asterisco.

En la figura 3 se muestra la epimerización de las moléculas de feofitina a y la conversión en la pirofeofitina a.

En la figura 4 se muestra la secuencia de aminoácidos y la de nucleótidos que muestran la fusión de un gen de clorofilasa a una etiqueta de His y el sitio de la trombina.

5 En la figura 5 se muestra una presentación esquemática de pET28-TRI_CHL, un vector de expresión de *E. coli* que contiene el gen de TRI_CHL que codifica una clorofilasa de *Triticum aestivum* (n.º de acceso de la base de datos BT009214).

En la figura 6 se muestra la secuencia de aminoácidos y la de nucleótidos que muestran la fusión de un gen de clorofilasa a una secuencia señal de AprE y a una secuencia AGK.

10 En la figura 7 se muestra una presentación esquemática de pBN-TRI_CHL, un vector de expresión de *B. subtilis* que contiene el gen de TRI_CHL que codifica una clorofilasa de *Triticum aestivum* (n.º de acceso de la base de datos BT009214).

En la figura 8 se muestra la secuencia de aminoácidos y la de nucleótidos que muestran la fusión directa de un gen de clorofilasa a un promotor de AprE.

15 En la figura 9 se muestra una representación esquemática de pBN-Spe-TRI_CHL, un vector de expresión de *B. subtilis* que contiene el gen de TRI_CHL que codifica una clorofilasa de *Triticum aestivum* (n.º de acceso de la base de datos BT009214).

En la figura 10 se muestra la secuencia de aminoácidos y la de nucleótidos que muestran la fusión de un gen de clorofilasa a la secuencia señal de Cel A.

20 En la figura 11 se muestra la representación esquemática de pKB-TRI_CHL, un vector de expresión de *S. lividans* que contiene el gen de TRI_CHL que codifica una clorofilasa de *Triticum aestivum* (n.º de acceso de la base de datos BT009214).

En la figura 12 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID n.º 1).

En la figura 13 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Arabidopsis thaliana* (SEQ ID n.º 2).

En la figura 14 se muestra la secuencia de aminoácidos de la clorofilasa de *Citrus sinensis* (SEQ ID n.º 3).

25 En la figura 15 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Triticum aestivum* (SEQ ID n.º 4).

En la figura 16 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Triticum aestivum* (SEQ ID n.º 5).

En la figura 17 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Brassica oleracea* (SEQ ID n.º 6).

En la figura 18 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Brassica oleracea* (SEQ ID n.º 7).

En la figura 19 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Brassica oleracea* (SEQ ID n.º 8).

30 En la figura 20 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Zea mays* (SEQ ID n.º 9).

En la figura 21 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Zea mays* (SEQ ID n.º 10).

En la figura 22 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Phyllostachys edulis* (SEQ ID n.º 11).

En la figura 23 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Chenopodium album* (SEQ ID n.º 12).

En la figura 24 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Ricinus communis* (SEQ ID n.º 13).

35 En la figura 25 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Glycine max* (SEQ ID n.º 14).

En la figura 26 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Ginkgo biloba* (SEQ ID n.º 15).

En la figura 27 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Pachira macrocarpa* (SEQ ID n.º 16).

En la figura 28 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Populus trichocarpa* (SEQ ID n.º 17).

En la figura 29 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Sorghum bicolor* (SEQ ID n.º 18).

40 En la figura 30 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Sorghum bicolor* (SEQ ID n.º 19).

En la figura 31 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Vitis vinifera* (SEQ ID n.º 20).

En la figura 32 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Physcomitrella patens* (SEQ ID n.º 21).

En la figura 33 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Aquilegia* (SEQ ID n.º 22).

En la figura 34 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Brachypodium distachyon* (SEQ ID n.º 23).

En la figura 35 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Medicago truncatula* (SEQ ID n.º 24).

5 En la figura 36 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Piper betle* (SEQ ID n.º 25).

En la figura 37 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Lotus japonicus* (SEQ ID n.º 26).

En la figura 38 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Oryza sativa Indica* (SEQ ID n.º 27).

En la figura 39 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Oryza sativa Japonica* (SEQ ID n.º 28).

En la figura 40 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Oryza sativa Japonica* (SEQ ID n.º 29).

10 En la figura 41 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Picea sitchensis* (SEQ ID n.º 30).

En la figura 42 se muestra la secuencia de aminoácidos de una clorofilasa de *Chlamydomonas* (SEQ ID n.º 31).

En la figura 43 se muestra un árbol filogenético de las clorofilasas vegetales y de la clorofilasa de *Chlamydomonas* (CHL_CHL) descritas en la presente memoria.

15 En la figura 44 se muestra un análisis de transferencia de tipo Western de extractos de *E. coli* que contienen clorofilasas recombinantes procedentes de diferentes especies. Carril 1: BAM_CHL CoRe 112. Carril 2: CIT_CHL CoRe 113A. Carril 3: ARA_CHL CoRe 114A. Carril 4: CB_CHL CoRe 127. Carril 5: GlyMax_CHL CoRe 133. Carril 6: Sor_CHL CoRe 134. Carril 7: ARA_CHL2 CoRe 135. Carril 8: BRA_CHL1 CoRe 136. Véanse las tablas 1 y 2 que vienen a continuación para las definiciones de las especies originarias de las enzimas que corresponden a las abreviaturas anteriores.

20 En la figura 45 se muestra un análisis de transferencia de tipo Western de extractos de *E. coli* que contienen clorofilasas recombinantes procedentes de diferentes especies. Carril 1: SORG_CHL CoRe 137A. Carril 2: TRI_CHL2 CoRe 138A. Carril 3: ZEA_CHL2 CoRe 139. Carril 4: TRI_CHL CoRe 20. Carril 5: BRACH_CHL CoRe 156. Carril 6: PIP_CHL CoRe 158. Carril 7: PICEA_CHL CoRe 163. Carril 8: control con vector. Véanse las tablas 1 y 2 que vienen a continuación para las definiciones de las especies originarias de las enzimas que corresponden a las abreviaturas anteriores.

25 En la figura 46 se muestra la actividad de las enzimas recombinantes procedentes de diferentes especies sobre la feofitina a, tal y como se demuestra por la cantidad total de feofitina a (feofitina a + a') en ppm que queda a diferentes tiempos después del tratamiento con cada enzima.

30 En la figura 47 se muestra la actividad de las enzimas recombinantes procedentes de diferentes especies sobre la feofitina a, tal y como se demuestra por la cantidad de pirofeofitina a en ppm que queda a diferentes tiempos después del tratamiento con cada enzima.

En la figura 48 se muestra el porcentaje de estereoisómeros a de la feofitina en una muestra de aceite después del tratamiento con las enzimas recombinantes procedentes de diferentes especies, basándose en la cantidad total de los estereoisómeros de feofitina a y feofitina a' en la muestra de aceite después del tratamiento.

35 En la figura 49 se muestra un cromatograma de HPLC mediante detección de absorbancia (430 nm) en la que se indica la numeración de los picos asociados a: 1: clorofilida b; 2 = clorofilida a; 3 = neoxantina; 3' = isómero de neoxantina; 4 = neocromo; 5 = violaxantina; 6 = luteoxantina; 7 = auroxantina; 8 = anteraxantina; 8' = isómero de anteraxantina; 9 = mutatoxantina; 10 = luteína; 10' = isómero de luteína; 10'' = isómero de luteína; 11 = feoforbida b; 12 = feoforbida a; 13 = clorofila b; 13' = clorofila b'; 14 = clorofila a; 14' = clorofila a'; 15 = feofitina b; 15' = feofitina b'; 16 = β-caroteno; 17 = feofitina a; 17' = feofitina a'; 18 = pirofeofitina b; 19 = pirofeofitina a.

40 En la figura 50 se muestra una representación esquemática de un procedimiento de refinado de aceite de acuerdo con una realización de la presente invención.

En la figura 51 se muestra el logaritmo de la concentración de sustrato para las feofitinas a y a' después de media hora en función de la dosis de ARA_CHL2 (clorofilasa de *Arabidopsis*).

45 Descripción detallada

En un aspecto, la presente invención hace referencia a un procedimiento para el tratamiento de un aceite vegetal, que comprende una etapa de poner en contacto el aceite con una enzima, en donde la enzima es capaz de hidrolizar un estereoisómero a' o b' de la clorofila o de un derivado de la clorofila, y en donde la enzima comprende un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 13. En otro aspecto, la presente invención hace referencia al uso de una enzima que es capaz de hidrolizar la clorofila o un derivado de la

clorofila, para retirar un estereoisómero *a'* o *b'* de la clorofila o del derivado de la clorofila a partir de un aceite vegetal, en donde la enzima tiene una actividad hidrolítica de al menos 1000 U/g, basándose en las unidades de actividad por gramo de la enzima purificada, sobre un estereoisómero con la prima de la clorofila o de un derivado de la clorofila, y en donde una unidad de la actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza un micromol de sustrato por minuto a 40°C, en donde el ensayo para medir la actividad hidrolítica es tal y como sigue: a) se añaden 170 µl de HEPES a 50 mM, pH 7, a 20 µl de clorofila, feofitina o pirofeofitina disuelta a 0,3 mM en acetona; b) se disuelve la enzima en HEPES a 50 mM, pH 7; c) se añaden 10 µl de la solución enzimática a 190 µl de la solución de sustrato para iniciar la reacción y se incuba a 40°C durante diferentes periodos de tiempo, d) la reacción se para con la adición de 350 µl de acetona; e) después de la centrifugación durante 2 min a 18.000g, se analiza el sobrenadante por HPLC y se determina la cantidad de (i) clorofila y clorofilida, (ii) feofitina y feoforbida, o (iii) pirofeofitina y pirofeoforbida, en donde la enzima comprende un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 2 o la SEQ ID n.º 13.

Clorofila y derivados de la clorofila

Con «derivado de la clorofila» se quiere hacer referencia a los compuestos que comprenden tanto un anillo de porfirina (clorina) como un grupo fitol (cola), que incluyen los derivados sin magnesio que contienen fitol, tales como feofitina y pirofeofitina. La clorofila y los derivados de la clorofila (que contienen fitol) son típicamente de color verdusco, como resultado del anillo de porfirina (clorina) presente en la molécula. La pérdida del magnesio presente en el anillo de porfirina significa que la feofitina y la pirofeofitina son de color más pardusco que la clorofila. Así pues, la presencia de clorofila y de derivados de la clorofila en un aceite pueden dar a tal aceite un color verde, verdusco o pardusco indeseables. En una realización, el presente procedimiento se podría realizar para retirar o reducir el color verde o pardo presente en el aceite. De acuerdo con esto, el presente proceso se podría denominar un procedimiento de blanqueo o decoloración.

Las enzimas utilizadas en el procedimiento podrían hidrolizar la clorofila y los derivados de la clorofila que contienen fitol para escindir la cola de fitol unida al anillo de clorina. La hidrólisis de la clorofila y de los derivados de la clorofila da lugar típicamente a compuestos tales como clorofilida, feoforbida y pirofeoforbida, que son derivados de la clorofila que no contienen fitol. Estos compuestos siguen conteniendo el anillo de porfirina que da color, de los que la clorofilida es verde, y la feoforbida y la pirofeoforbida son de color pardo rojizo. En algunas realizaciones, también puede ser deseable retirar estos derivados sin fitol y reducir el color verde/rojo/pardo del aceite. Así pues, en una realización de la invención, el procedimiento podría además comprender una etapa de retirada o de disminución de la cantidad de derivados sin fitol de la clorofila en el aceite. El procedimiento podría implicar el blanqueo o decoloración para retirar el color verde y/o rojo/pardo del aceite.

La clorofila o el derivado de la clorofila podrían ser formas tanto a como b. Así pues, tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «clorofila» incluye la clorofila a y la clorofila b. De una manera similar, ambas formas, a y b, quedan amparadas cuando se hace referencia a feofitina, pirofeofitina, clorofilida, feoforbida y pirofeoforbida.

Tal y como se describe en la presente memoria, la clorofila y los derivados de la clorofila podrían existir como una pareja de epímeros según se determina por la estereoquímica que rodea al carbono número 13² (numeración de acuerdo con el sistema de la IUPAC, marcado con asterisco en la figura 2). Así pues, la clorofila a existe como la pareja de epímeros clorofila a y clorofila a', y la clorofila b comprende las formas b y b'. La feofitina a comprende los epímeros a y a', y la feofitina b comprende las formas b y b'. Las formas con la prima (') tienen la estereoquímica S y las formas sin la prima tienen la estereoquímica R en torno al átomo de carbono 13². Cuando se utilizan por lo general en la presente memoria, la terminología «clorofila y derivados de la clorofila» incluye tanto las formas con las primas como las que no llevan prima.

Aceites vegetales

Cualquier aceite vegetal se podría tratar de acuerdo con el presente procedimiento para retirar contaminaciones indeseables debidas a la clorofila y/o a los derivados de la clorofila. El aceite podría proceder de cualquier tipo de planta y de cualquier parte de una planta, lo que incluye plantas enteras, hojas, tallos, flores, raíces, protoplastos vegetales, semillas y células vegetales, y su progenie. La clase de plantas cuyos productos se pueden tratar en el método de la invención incluye las plantas superiores, que incluyen las angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas) así como las gimnospermas. Incluye plantas con muy diferentes niveles de ploidía, entre ellos los estados poliploide, diploide, haploide y hemiciptoto.

En las realizaciones preferidas, el aceite comprende un aceite vegetal, incluidos los aceites procesados a partir de semillas oleosas o frutos oleosos (p. ej., aceites de semilla tales como aceite de colza (canola) y aceites de fruto tal como el aceite de palma). Los ejemplos de aceites idóneos incluyen salvado de arroz, soja, colza, palma, oliva, semilla de algodón, maíz, almendra de palma (palmiste), coco, cacahuete, sésamo (ajonjolí), moringa (narago, ben) o girasol. El procedimiento de la invención se puede utilizar junto con los métodos para procesar aceites esenciales, p. ej., los de aceites de semillas de frutas, p. ej., uva, albaricoque, borraja, etc. El procedimiento de la invención se puede utilizar junto con los métodos para procesar aceites con mucho fósforo (p. ej., aceite de soja). Preferiblemente, el aceite es un aceite vegetal bruto.

Clorofila y derivados de la clorofila en el aceite

La clorofila y/o los derivados de la clorofila (p. ej., clorofila, feofitina y/o pirofeofitina) podrían estar presentes en el aceite de forma natural, como un contaminante, o como un componente indeseable en un producto procesado. La clorofila y/o los derivados de la clorofila (p. ej., clorofila, feofitina y/o pirofeofitina) podrían estar presentes en cualquier cantidad en el aceite. Típicamente, la clorofila, la feofitina y/o la pirofeofitina podrían estar presentes como un contaminante natural del aceite a una concentración de 0,001 a 1000 mg/kg (de 0,001 a 1000 ppm, de 10^{-7} a 10^{-1} % en peso), basándose en el peso total del aceite. En otras realizaciones, la clorofila y/o los derivados de la clorofila podrían estar presentes en el aceite a una concentración de 0,1 a 100, de 0,5 a 50, de 1 a 50, de 1 a 30 o de 1 a 10 mg/kg, basándose en el peso total del aceite.

Los derivados de la clorofila que no contienen fitol también podrían estar presentes en el aceite. Por ejemplo, la clorofilida, la pirofeoforbida y/o la pirofeoforbida podrían estar presentes en cualquier cantidad en el aceite. Típicamente, la clorofilida, la feoforbida y/o la pirofeoforbida podrían estar presentes en el aceite, bien antes o bien después del tratamiento con una enzima de acuerdo con el método de la presente invención, a una concentración de 0,001 a 1000 mg/kg (de 0,001 a 1000 ppm, de 10^{-7} a 10^{-1} % en peso), basándose en el peso total del aceite. En otras realizaciones, la clorofilida, la feoforbida y/o la pirofeoforbida podrían estar presentes en la composición a una concentración de 0,1 a 100, de 0,5 a 50, de 1 a 50, de 1 a 30 o de 1 a 10 mg/kg, basándose en el peso total de la composición.

Enzimas que hidrolizan la clorofila o un derivado de la clorofila

El procedimiento de la presente invención comprende una etapa de poner en contacto el aceite con una enzima que tiene la capacidad de hidrolizar la clorofila o un derivado de la clorofila, en concreto los estereoisómeros con la prima (p. ej., *a'* o *b'*) de los mismos. Típicamente, «hidrolizar la clorofila o un derivado de la clorofila» significa que se hidroliza un enlace éster de la clorofila o de un derivado de la clorofila (que contiene fitol), p. ej., para escindir un grupo fitol del anillo de clorina en la clorofila o en el derivado de la clorofila. Así pues, la enzima tiene típicamente actividad esterasa o hidrolasa. Preferiblemente, la enzima tiene actividad esterasa o hidrolasa en una fase oleosa y, facultativamente, también en una fase acuosa.

Así pues, la enzima podría, por ejemplo, ser una clorofilasa, feofitinasas o pirofeofitinasas. Preferiblemente, la enzima es capaz de hidrolizar al menos una, al menos dos, o al menos las tres, de clorofila, feofitina y pirofeofitina. En una realización particularmente preferida, la enzima tiene actividad clorofilasa, feofitinasas y pirofeofitinasas. En otras realizaciones, se podrían utilizar en el método dos o más enzimas, en donde cada enzima tenga una especificidad de sustrato diferente. Por ejemplo, el método podría comprender el uso combinado de dos o tres enzimas seleccionadas de una clorofilasa, una feofitinasas y una pirofeofitinasas. Las enzimas para ser usadas en la presente invención son tal y como se definen en las reivindicaciones 1 a 10. La enzima tiene la capacidad de hidrolizar un estereoisómero *a'* o *b'* de la clorofila o de un derivado de la clorofila. Con esto se quiere decir que la enzima tiene actividad hidrolítica sobre una forma con la prima (') de la clorofila o de un derivado de la clorofila. La designación con la prima (') hace referencia a la estereoquímica en torno al carbono número 13² de la clorofila o del derivado de la clorofila.

Así pues, las formas con la prima de la clorofila o de los derivados de la clorofila que se podrían hidrolizar en las realizaciones de la presente invención incluyen clorofila *a'*, clorofila *b'*, feofitina *a'* y feofitina *b'*. Preferiblemente, la enzima es capaz de hidrolizar al menos una forma con la prima de un tipo de derivado de la clorofila, a saber, clorofila *a'* o feofitina *a'*.

Típicamente, la enzima también tiene actividad hidrolítica sobre las formas sin la prima de la clorofila o de los derivados de la clorofila. Las enzimas utilizadas en la presente invención podrían tener una estereoespecificidad reducida, a saber, las enzimas utilizadas en la presente memoria son menos específicas por las formas sin la prima de la clorofila o de los derivados de la clorofila que otras clorofilasas conocidas (tales como la clorofilasa de *Triticum aestivum*, véase la SEQ ID n.º 4).

En una realización, la enzima tiene una razón de actividad de menos de 100 sobre un estereoisómero sin la prima (p. ej., *a* o *b*) de la clorofila o de un derivado de la clorofila, en comparación con un estereoisómero con la prima (p. ej., *a'* o *b'*) de la clorofila o del derivado de la clorofila. Preferiblemente, la razón de actividad es de menos de 50, de menos de 10, de menos de 5, de menos de 3, de menos de 2, de menos de 1,5, de menos de 1 o de menos de 0,5. Con «razón de actividad» se quiere decir que se hace referencia a la actividad relativa de la enzima sobre la forma con la prima en comparación con la forma sin la prima en las mismas condiciones. Así pues, la razón de actividad se podría determinar mediante la determinación de (a) la actividad hidrolítica de la enzima sobre un estereoisómero sin la prima, y (b) la actividad hidrolítica de la enzima sobre el correspondiente estereoisómero con la prima, y dividiendo (a) por (b). Así pues, una razón de actividad baja es indicativa de una actividad relativamente elevada sobre las formas con la prima.

La actividad hidrolítica se podría determinar, por ejemplo, con los métodos que se describen a continuación. Típicamente, la razón de actividad se podría determinar en condiciones que no favorecen la epimerización (a saber, la transición entre los isómeros con la prima y sin la prima). Por ejemplo, la razón de actividad se podría determinar

con la medida de la actividad hidrolítica sobre los isómeros con la prima y sin la prima en un aceite bruto con la feofitina a más de 0,5 ppm, agua a aproximadamente el 2% y a pH de 5,0 a 5,5. En una realización, la actividad hidrolítica de la enzima sobre la feofitina a o la feofitina a' se calcula a la mitad de la concentración original de sustrato (véase, p. ej., ejemplo 4).

- 5 En otra realización, la enzima tiene una razón de actividad sobre la feofitina en comparación con la pirofeofitina de menos de 80, de menos de 50, de menos de 10, de menos de 8, de menos de 7 o de menos de 5. Por ejemplo, la enzima podría tener una razón de actividad feofitinasas por pirofeofitinasas de 0,1 a 10, de 1 a 10 o de 1 a 5. La razón de actividad feofitinasas por pirofeofitinasas se podría calcular con la determinación de la actividad feofitinasas y la actividad pirofeofitinasas en las mismas condiciones con los métodos que se describen a continuación, y la división de la actividad feofitinasas por la actividad pirofeofitinasas. Las razones de actividad dentro de las razones anteriores se podrían determinar con respecto a las especies correspondientes de feofitina y pirofeofitina, p. ej., la feofitina a (que comprende las formas a y a') por la pirofeofitina a.

Ensayo de la actividad enzimática (clorofilasa, feofitinasas o pirofeofitinasas)

- 15 La actividad hidrolítica sobre la clorofila o sobre un derivado de la clorofila, que incluye las formas con la prima y sin la prima de la misma, se podrían detectar con cualquier técnica de ensayo idónea, por ejemplo, basándose en un ensayo descrito en la presente memoria. Por ejemplo, la actividad hidrolítica se podría detectar con técnicas de fluorescencia. En un ensayo idóneo, un polipéptido al que analizarle su actividad hidrolítica sobre la clorofila o sobre un derivado de la clorofila se incubaba en presencia de un sustrato, y la cantidad de producto o de sustrato se siguen con la medición de la fluorescencia. Los sustratos idóneos incluyen, p. ej., clorofila, feofitina y/o pirofeofitina, entre ellos las formas a y b y las formas con la prima y sin la prima de las mismas. Los productos que se podrían detectar incluyen clorofilida, feoforbida, pirofeoforbida y/o fitol.

Los métodos de ensayo para detectar la hidrólisis de la clorofila o de un derivado de la clorofila están descritos en, por ejemplo, Ali Khamessan et al. (1994), *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 60 (1), páginas 73-81; Klein y Vishniac (1961), *J. Biol. Chem.* 236: 2544-2547; y Kiani et al. (2006), *Analytical Biochemistry* 353: 93-98.

- 25 Como alternativa, un ensayo idóneo se podría basar en la detección por HPLC y la cuantificación de la cantidad de sustrato o de producto después de añadir una posible enzima, p. ej., basándose en las técnicas que se describen a continuación. En una realización, el ensayo se podría realizar tal y como está descrito en Romero-Mendez et al. (2005), *Food Research International* 38 (8-9): 1067-1072. En otra realización, véase la reivindicación 10, se puede utilizar el siguiente ensayo:

- 30 Se añaden 170 µl de HEPES a 50 mM, pH 7,0, a 20 µl de clorofila, feofitina o pirofeofitina disuelta en acetona a 0,3 mM. La enzima se disuelve en HEPES a 50 mM, pH 7,0. Se añaden 10 µl de la solución enzimática a 190 µl de la solución de sustrato para iniciar la reacción y se incubaba a 40°C durante diferentes periodos de tiempo. La reacción se detiene con la adición de 350 µl de acetona. Después de centrifugar (2 min a 18.000g), el sobrenadante se analizó por HPLC y se determinó la cantidad de (i) clorofila y clorofilida, (ii) feofitina y feoforbida, o (iii) pirofeofitina y pirofeoforbida. Las formas con la prima y sin la prima de la clorofila y de los derivados de la clorofila se podrían distinguir mediante el análisis por HPLC, tal y como se muestra en la figura 49.

Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que hidroliza un micromol de sustrato (p. ej., clorofila, feofitina o pirofeofitina) por minuto a 40°C, p. ej., en un método de ensayo como el descrito en la presente memoria.

- 40 En las realizaciones preferidas, la enzima utilizada en el presente método tiene una actividad clorofilasa, feofitinasas y/o pirofeofitinasas de al menos 1000 U/g, al menos 5000 U/g, al menos 10.000 U/g o al menos 50.000 U/g, basándose en las unidades de actividad por gramo de la enzima purificada, p. ej., tal y como se determina mediante un método de ensayo descrito en la presente memoria. Preferiblemente, la enzima tiene una actividad hidrolítica de al menos 1000 U/g, al menos 5000 U/g, al menos 10.000 U/g o al menos 50.000 U/g, basándose en las unidades de actividad por gramo de la enzima purificada, sobre un estereoisómero con la prima (p. ej., a' o b) de la clorofila o de un derivado de la clorofila (p. ej., clorofila a', clorofila b', feofitina a' o feofitina b). La actividad hidrolítica sobre la clorofila o sobre un derivado de la clorofila se podría determinar con un método como el descrito en la patente europea EP 10159327.5.

Clorofilasas

- 50 En una realización, la enzima es capaz de hidrolizar al menos un estereoisómero con la prima (p. ej., a' o b) de la clorofila. Se puede utilizar en el procedimiento un polipéptido que cataliza la hidrólisis de un enlace de éster de la clorofila a' o b' para producir clorofilida a' o b' y fitol. En una realización, la enzima es una clorofilasa clasificada en la clasificación de la Nomenclatura de enzimas (E. C. 3.1.1.14). Se puede utilizar un polipéptido (p. ej., enzima o anticuerpo catalítico) aislado, recombinante o sintético, o quimérico (una combinación de sintético y recombinante), véase, p. ej., Marchler-Bauer (2003) *Nucleic Acids Res.* 31: 383-387.

En otra realización, la clorofilasa procede del ricino, p. ej., *Ricinus communis*. Por ejemplo, la clorofilasa podría ser un polipéptido que comprende la secuencia de la SEQ ID n.º 13 (véase la figura 24).

Variantes y fragmentos

5 Las variantes y fragmentos funcionales que hidrolizan las formas con la prima de la clorofila o de un derivado de la clorofila también se podrían emplear en la presente invención. Con «funcional» se quiere decir que el fragmento o la variante conserva una actividad hidrolítica detectable sobre un estereoisómero con la prima (p. ej., a' o b') de la clorofila o un derivado de la clorofila. Tales variantes y fragmentos tienen una identidad de secuencia de al menos el 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más con la SEQ ID n.º 13, a lo largo de toda la longitud de la secuencia.

El porcentaje de identidad de secuencia se podría determinar mediante el análisis con un algoritmo de comparación de secuencias o mediante inspección visual. En un aspecto, el algoritmo de comparación de secuencias es un algoritmo BLAST, p. ej., un algoritmo BLAST versión 2.2.2.

10 Otras enzimas que tienen actividad sobre las formas con la prima de la clorofila o de un derivado de la clorofila que son idóneas para ser usadas en el procedimiento se podrían identificar con la determinación de la presencia de los motivos de secuencia conservados que están presentes, p. ej., en las secuencias conocidas de clorofilasas, feofitinasas o pirofeofitinasas. Por ejemplo, el motivo GHSRG (SEQ ID n.º 32) que contiene la Ser del centro activo está muy conservado en la secuencia de las clorofilasas. En algunas realizaciones, una enzima para ser usada en la presente invención podría comprender tal secuencia. Las secuencias polipeptídicas que tienen la actividad idónea se podrían identificar mediante la búsqueda de la presencia de estos motivos en las bases de datos de genomas, p. ej., la base de datos del metagenoma del microbioma (JGI-DOE, EE.UU.).

Aislamiento y producción de las enzimas

20 Las enzimas para ser usadas en la presente invención, tal y como está definido en las reivindicaciones 1 y 10, se podrían aislar de sus fuentes naturales o podrían, por ejemplo, producirse con las técnicas de ADN recombinante. Se podrían aislar o construir secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tengan actividad clorofilasa, feofitinasas y/o pirofeofitinasas, y se podrían utilizar para producir los polipéptidos correspondientes.

25 Por ejemplo, se podría construir una genoteca de ADN genómico y/o ADNc con el ADN cromosómico o el ARN mensajero del organismo que produce el polipéptido. Si se conoce la secuencia de aminoácidos del polipéptido, se podrían sintetizar sondas oligonucleotídicas marcadas y se podrían utilizar para identificar clones que codifican polipéptidos en la genoteca preparada del organismo. Como alternativa, se pudo utilizar una sonda oligonucleotídica marcada que contenía secuencias homólogas a otro gen de polipéptido conocido para identificar clones que codificaban el polipéptido. En el último caso, se utilizan condiciones de hibridación y lavado poco rigurosas.

30 Como alternativa, los clones que codifican el polipéptido se pudieron identificar con la inserción de fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, la transformación de bacterias que no tienen la enzima con la genoteca de ADN genómico resultante y, a continuación, la siembra de las bacterias transformadas en placas de agar que contienen una enzima inhibida por el polipéptido, con lo que se permite la identificación de los clones que expresan el polipéptido.

35 Aún en otra alternativa, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido se podría preparar por medios sintéticos mediante los métodos estándares consagrados, p. ej., el método de fosforamiditas descrito por Beucage S. L. et al. (1981) *Tetrahedron Letters* 22, páginas 1859-1869, o el método descrito por Matthes et al. (1984) *EMBO J.* 3, págs. 801-805. En el método de las fosforamiditas, se sintetizan los oligonucleótidos, p. ej., en un sintetizador automático de ADN, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en los vectores adecuados.

40 La secuencia de nucleótidos podría tener origen mixto de genómico y sintético, origen mixto de sintético y ADNc, u origen mixto de genómico y ADNc, preparada por la ligación de fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea lo adecuado) de acuerdo con las técnicas estándares. Cada fragmento ligado corresponde a diferentes partes de la secuencia de nucleótidos completa. La secuencia de ADN se podría preparar mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por su nombre en inglés) con el uso de cebadores específicos, por ejemplo, como está descrito en la patente de los EE. UU. n.º US 4.683.202 o en Saiki R K et al. (*Science* (1988) 239, págs. 487-491).

45 La terminología «secuencia nucleotídica» o «secuencia de nucleótidos» tal y como se utiliza en la presente memoria hace referencia a una secuencia oligonucleotídica o polinucleotídica, y a las variantes, homólogos, fragmentos y derivados de la misma (tal como porciones de la misma). La secuencia de nucleótidos podría ser de origen genómico o sintético o recombinante, que podría ser bicatenaria o monocatenaria tanto si representa la hebra sentido como la antisentido.

50 Típicamente, la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene actividad clorofilasa, feofitinasas y/o pirofeofitinasas se prepara con las técnicas de ADN recombinante. Sin embargo, la secuencia de nucleótidos se pudo sintetizar, entera o en parte, con métodos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers M H et al. (1980) *Nuc Acids Res. Symp. Ser* 215-23 y Horn T et al. (1980) *Nuc. Acids. Res. Symp. Ser* 225-232).

55

Modificación de la secuencia de las enzimas

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

Se podrían introducir las mutaciones mediante oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados. Un método idóneo se describe en Morinaga et al. (*Biotechnology* (1984), 2, págs. 646-649). Otro método para introducir mutaciones en las secuencias de nucleótidos que codifican enzimas se describe en Nelson y Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, págs. 147-151).

En vez de la mutagénesis específica de sitio, tal como la descrita más arriba, se pueden introducir mutaciones al azar, por ejemplo, con un kit comercial tal como el kit de mutagénesis por PCR GeneMorph de Stratagene, o el kit de mutagénesis aleatoria por PCR Diversify de Clontech. La patente europea EP 0.583.265 hace referencia a los métodos de optimización de la mutagénesis por PCR, que también se puede combinar con el uso de análogos mutagénicos del ADN, tales como los descritos en la patente europea EP 0.866.796. Las tecnologías por PCR propensa a error son idóneas para producir variantes de enzimas que hidrolizan la clorofila y/o los derivados de la clorofila con características preferidas. La solicitud de patente internacional WO 0206457 hace referencia a la evolución molecular de las lipasas.

Un tercer método para obtener secuencias nuevas es fragmentar secuencias de nucleótidos no idénticas, bien mediante un número cualquiera de enzimas de restricción o con una enzima tal como la ADNasa I, y volver a ensamblar las secuencias de nucleótidos completas que codifican proteínas funcionales. Como alternativa, se puede utilizar una o varias secuencias de nucleótidos no idénticas e introducir mutaciones durante el reensamblaje de la secuencia de nucleótidos completa. Las tecnologías del barajado de ADN y de barajado de familias son idóneas para producir variantes de enzimas con las características preferidas. Los métodos idóneos para realizar el «barajado» se pueden encontrar en las patentes europeas n.º EP 0752008, EP 1138763, EP 1103606. El barajado también se puede combinar con otras formas de mutagénesis del ADN, tal y como está descrito en la patente de los EE. UU. n.º US 6.180.406 y en la solicitud de patente internacional WO 01/34835.

Así pues, en una secuencia de nucleótidos se pueden introducir muchas mutaciones a lazar o específicas de sitio, bien *in vivo* o *in vitro*, y posteriormente se puede cribar por la mejora de la funcionalidad del polipéptido codificado por diferentes medios. Mediante el uso de métodos de recombinación *in silico* y mediados por exo (véanse la solicitud de patente internacional WO 00/58517, y las patentes de los EE. UU. n.º US 6.344.328 y US 6.361.974), por ejemplo, se puede realizar la evolución molecular en donde la variante producida conserva una homología muy baja con las enzimas o las proteínas conocidas. Gracias a esto, tales variantes obtenidas podrían tener una analogía estructural significativa con las enzimas conocidas de clorofilasa, feofitinasas o pirofeofitinasas, pero tienen una homología de secuencia de aminoácidos muy baja.

Como un ejemplo no limitante, además, las mutaciones o variantes naturales de una secuencia polinucleotídica se pueden recombinar con el tipo silvestre o bien con otras mutaciones o variantes naturales para producir nuevas variantes. Tales nuevas variantes también se pueden cribar por la mejora de la funcionalidad del polipéptido codificado.

La aplicación de los métodos de evolución molecular antes mencionados y similares permite la identificación y la selección de variantes de las enzimas para ser usadas en la presente invención que tienen características preferidas sin ningún conocimiento previo de la estructura ni de la función de la proteína, y permite la producción de mutaciones o variantes impredecibles pero beneficiosas. Hay numerosos ejemplos de la aplicación de la evolución molecular en la técnica para optimizar o alterar la actividad enzimática, en donde tales ejemplos incluyen, pero sin limitarse a ellos, uno o varios de los siguientes: expresión y/o actividad optimizadas en una célula hospedadora o *in vitro*, incremento de la actividad enzimática, alteración de la especificidad de sustratos y/o productos, incremento o disminución de la estabilidad enzimática o estructural, alteración de la actividad/especificidad enzimática en las condiciones medioambientales preferidas, p. ej., temperatura, pH, sustrato.

Tal y como será evidente para el experto en la técnica, con el uso de herramientas de evolución molecular se podría alterar una enzima para mejorar la funcionalidad de la enzima. Idóneamente, una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima (p. ej., clorofilasa, feofitinasas y/o pirofeofitinasas) que se utiliza en la invención podría codificar una enzima variante, a saber, la enzima variante podría contener al menos una sustitución, delección o adición de aminoácido cuando se compara con la enzima original. Las enzimas variantes conservan una identidad de al menos el 90%, 95%, 97% o 99% con la SEQ ID n.º 13.

Secuencias polipeptídicas

La presente invención también abarca el uso de las secuencias de aminoácidos codificadas por una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima para ser usada en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención, siempre y cuando estas enzimas sean tal y como está definido en las reivindicaciones 1 y 10. Tal y como se utiliza

en la presente memoria, la terminología «secuencia aminoacídica» o «secuencia de aminoácidos» es sinónima del término «polipéptido» y/o del término «proteína». En algunos casos, la terminología «secuencia aminoacídica» o «secuencia de aminoácidos» es sinónima del término «péptido». La secuencia de aminoácidos se podría preparar/aislar de una fuente idónea, o se podría fabricar por medios sintéticos, o se podría preparar mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. Idóneamente, las secuencias de aminoácidos se podrían obtener de los polipéptidos aislados que se enseñan en la presente memoria mediante técnicas estándares.

Un método idóneo para determinar la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos aislados es como sigue. El polipéptido purificado se podría liofilizar y 100 µg del material liofilizado se podrían disolver en 50 µl de una mezcla de urea a 8 M e hidrogenocarbonato de amonio a 0,4 M, pH 8,4. La proteína disuelta se podría desnaturalizar y reducir durante 15 minutos a 50°C tras el recubrimiento con nitrógeno y la adición de 5 µl de ditioneitol a 45 mM. Después del enfriamiento a temperatura ambiente, se podrían añadir 5 µl de yodoacetamida a 100 mM para que los restos de cisteína se modifiquen durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad y en nitrógeno.

A la mezcla de reacción anterior se le podrían añadir 135 µl de agua y 5 µg de la endoproteinasa Lys-C en 5 µl de agua, y la digestión se podría llevar a cabo a 37°C en nitrógeno durante 24 horas. Los péptidos resultantes se podrían separar por HPLC en fase inversa en una columna C18 VYDAC (0,46 × 15 cm; 10 µm; The Separation Group, California, EE.UU.) mediante el solvente A: TFA al 0,1% en agua, y el solvente B: TFA al 0,1% en acetonitrilo. Los péptidos seleccionados se podrían volver a cromatografiar en una columna C18 Develosil con el mismo sistema de solventes, antes de la secuenciación del extremo amino. La secuenciación se podría realizar con un secuenciador Applied Biosystems 476A que utiliza ciclos rápidos de pulsos de líquidos de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, California, EE.UU.).

Comparación de secuencias

Aquí, el término «homólogo» significa una entidad que tiene una determinada homología con las secuencias de aminoácidos en cuestión y las secuencias de nucleótidos en cuestión. Aquí, el término «homología» se puede igualar a «identidad». La secuencia de aminoácidos y/o la secuencia de nucleótidos homólogas deben dar a conocer y/o codificar un polipéptido que conserva la actividad funcional y/o mejora la actividad de la enzima.

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para que incluya una secuencia de aminoácidos que es al menos idéntica al 90%, preferiblemente idéntica al menos al 95 o 98%, a la secuencia en cuestión. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos centros activos, etc., que la secuencia de aminoácidos en cuestión. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (a saber, los restos aminoacídicos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para que incluya una secuencia de nucleótidos que es al menos idéntica al 90%, preferiblemente idéntica al menos al 95 o 98%, a una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido para ser usado en la presente invención (la secuencia en cuestión). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los centros activos, etc., que la secuencia en cuestión. Aunque la homología también se puede considerar en términos de similitud (a saber, restos aminoacídicos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de la homología se pueden llevar a cabo a simple vista, o con más frecuencia, con la ayuda de programas de comparación de secuencias disponibles con facilidad. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular un porcentaje (%) de homología entre dos o más secuencias. El porcentaje de homología se podría calcular a lo largo de secuencias contiguas, a saber, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido de una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido de la otra secuencia, de resto en resto. Esto se denomina un alineamiento «sin huecos». Típicamente, tales alineamientos sin huecos se llevan a cabo solo durante un número de restos relativamente pequeño.

Aunque este sea un método muy simple y repetitivo, falla a la hora de tener en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias que de otro modo serían idénticas, una inserción o delección ocasionará que los siguientes restos aminoacídicos no queden bien alineados, con lo que es probable que se dé lugar a una gran reducción del porcentaje de la homología cuando se lleva a cabo un alineamiento global. En consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias están diseñados para producir alineamientos óptimos que tienen en cuenta posibles inserciones y delecciones sin penalizar indebidamente la puntuación global de la homología. Esto se consigue mediante la inserción de «huecos» en el alineamiento de las secuencias para intentar elevar al máximo la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan «penalizaciones por huecos» a cada hueco que se produce en el alineamiento, por lo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencia con el menor número de huecos posible (lo que refleja un parentesco mayor entre las dos secuencias comparadas) conseguirá una puntuación más elevada que una con muchos huecos. Se utiliza típicamente «Refinar el coste de los huecos», que carga un coste relativamente elevado por la existencia de un hueco y una penalización más pequeña

para cada resto adicional del hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos que se utiliza con más frecuencia. Las penalizaciones de huecos elevadas producirán, por supuesto, alineamientos optimizados con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por huecos. Sin embargo, se prefiere el uso de los valores por defecto cuando se utilizan tales programas informáticos para la comparación de secuencias.

Así pues, el cálculo del porcentaje máximo de homología requiere primero la producción de un alineamiento óptimo que tenga en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa informático idóneo para llevar a cabo tal alineamiento es Vector NTI Advance™ 11 (Invitrogen Corp.). Los ejemplos de otros programas informáticos que pueden llevar a cabo las comparaciones de secuencia incluyen, pero sin limitarse a ellos, el paquete BLAST (véase Ausubel et al., 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, 4.ª ed., capítulo 18), y FASTA (Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.* 403-410). Tanto BLAST como FASTA están disponibles para la búsqueda en línea y sin conexión (*offline*) (véase Ausubel et al., 1999, páginas 7-58 a 7-60). No obstante, para algunas aplicaciones, se prefiere utilizar el programa Vector NTI Advance™ 11. Una nueva herramienta, denominada BLAST 2 Sequences, también está disponible para comparar secuencias de proteínas y nucleótidos (véase *FEMS Microbiol Lett* 1999, 174 (2): 247-50; y *FEMS Microbiol Lett*, 1999, 177 (1): 187-8).

Aunque el porcentaje de homología final se puede medir en términos de identidad, el procedimiento de alineamiento por sí mismo no se basa típicamente en una comparación por parejas de todo o nada. En su lugar, se utiliza por lo general una matriz de puntuación de similitud escalonada que asigna puntuaciones a cada comparación por parejas basándose en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz de uso corriente es la matriz BLOSUM62, que es la matriz por defecto para la *suite* de programas de BLAST. Los programas de Vector NTI utilizan por lo general los valores públicos por defecto o bien una tabla de comparación de símbolos personalizada, si se suministra (véase el manual de usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere el uso de los valores por defecto para el paquete Vector NTI Advance™ 11.

Como alternativa, el porcentaje de homología se podría calcular con la característica de alineamientos múltiples en Vector NTI Advance™ 11 (Invitrogen Corp.), que se basa en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins D G y Sharp P M (1988), *Gene* 73 (1), 237-244). Una vez que el programa ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el porcentaje de homología, preferiblemente el porcentaje de identidad de las secuencias. El programa informático realiza esto típicamente como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

Al tener que usar las penalizaciones por huecos cuando se determina la identidad de las secuencias, entonces el programa utiliza preferiblemente los parámetros por defecto para el alineamiento de dos en dos. Por ejemplo, los parámetros siguientes son los parámetros por defecto actuales para el alineamiento de dos en dos para BLAST 2:

| PARA BLAST2 | ADN | PROTEÍNA |
|-------------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| UMBRAL ESPERADO | 10 | 10 |
| TAMAÑO DE PALABRA | 11 | 3 |
| PARÁMETROS DE PUNTUACIÓN | | |
| Puntuaciones de concordancia/discordancia | 2, -3 | n/a |
| Matriz | n/a | BLOSUM62 |
| Coste de los huecos | Existencia: 5 Extensión: 2 | Existencia: 11 Extensión: 1 |

Preferiblemente, la identidad de secuencia para las secuencias de nucleótidos y/o las secuencias de aminoácidos se determina mediante BLAST2 (blastn) con los parámetros de puntuación determinados tal y como está definido más arriba.

Para los propósitos de la presente invención, el grado de identidad se basa en el número de elementos de la secuencia que son idénticos. El grado de identidad de acuerdo con la presente invención para las secuencias de aminoácidos se podría determinar idóneamente por medio de programas informáticos conocidos en la técnica, tales como Vector NTI Advance™ 11 (Invitrogen Corp.). Para el alineamiento de dos en dos, los parámetros de puntuación utilizados son preferiblemente BLOSUM62 con penalización por existencia de huecos de 11 y la penalización de extensión de huecos de 1. El grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se determina a lo largo de toda la secuencia.

Mutaciones aminoacídicas

Lo siguiente se aplica a la magnitud que tienen las secuencias resultantes, tal y como se presenta en las reivindicaciones 1 y 13, respectivamente. Las secuencias podrían tener también delecciones, inserciones o sustituciones de restos aminoacídicos que producen un cambio silencioso y dan lugar a una sustancia equivalente desde el punto de vista funcional. Se podrían realizar sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de la polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos, siempre y cuando se conserve la actividad de fijación secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos con carga positiva incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares sin carga que tienen valores de hidrofilia similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Se podrían realizar sustituciones conservativas, por ejemplo, de acuerdo con la tabla que viene a continuación. Los aminoácidos del mismo bloque de la segunda columna y, preferiblemente, en la misma línea de la tercera columna, se podrían sustituir unos por otros:

| | | |
|-----------|-----------------|---------|
| ALIFÁTICO | Apolar | G A P |
| | | I L V |
| | Polar sin carga | C S T M |
| | | N Q |
| | Polar con carga | D E |
| | | K R |
| AROMÁTICO | | H F W Y |

La presente invención también engloba la sustitución homóloga (sustitución y remplazo se utilizan en la presente memoria para hacer referencia al intercambio de un resto aminoacídico existente por un resto alternativo) que se podría producir, a saber, sustitución entre similares, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución heteróloga también se podría producir, a saber, de una clase de resto por otro o, como alternativa, que intervenga la inclusión de aminoácidos no naturales, tales como ornitina (en adelante citada como Z), ornitina diaminobutírica (en adelante citada como B), ornitina norleucínica (en adelante citada como O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina. Los reemplazos también podrían realizarse por aminoácidos que no sean naturales.

Las secuencias aminoacídicas variantes podrían incluir grupos espaciadores idóneos que se podrían insertar entre cualesquiera dos restos de aminoácidos de la secuencia, que incluye grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de aminoácidos espaciadores, tales como restos de glicina o β -alanina. Otra forma de variación que implica la presencia de uno o varios restos de aminoácidos en forma peptoide será bien conocido por los expertos en la técnica. Para evitar las dudas, se utiliza la «forma peptoide» para hacer referencia a los restos aminoacídicos variantes, en donde el grupo sustituyente del carbono α está sobre el átomo de nitrógeno del resto en vez del carbono α . Los procedimientos para preparar péptidos en la forma peptoide se conocen en la técnica, por ejemplo, Simon R J et al., *PNAS* (1992) 89 (20), 9367-9371, y Horwell D C, *Trends Biotechnol.* (1995), 13 (4), 132-134.

30 Secuencias de nucleótidos

Las secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria podrían incluir dentro de ellas nucleótidos sintéticos o modificados. Se conocen en la técnica una serie de tipos diferentes de modificaciones para oligonucleótidos. Estas incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato, y/o la adición de acridina o de cadenas polilisina en los extremos en 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, se ha de saber que las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria se podrían modificar mediante cualquier método disponible en la técnica. Tales modificaciones se podrían llevar a cabo para mejorar la actividad *in vivo* o la vida útil de las secuencias de nucleótidos.

La presente descripción engloba el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias debatidas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de las mismas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma, entonces tal secuencia se puede utilizar como una sonda para identificar las secuencias codificantes similares en otros organismos, etc.

Existen distintas formas de obtener polinucleótidos que no son homólogos al 100% con las secuencias descritas. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria se podrían obtener, por ejemplo, al sondear genotecas de ADN hechas de un margen de individuos, por ejemplo individuos de diferentes poblaciones. Además,

se podrían obtener otros homólogos víricos/bacterianos o celulares, en concreto los homólogos celulares hallados en las células vegetales, y tales homólogos y fragmentos de los mismos en general serán capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias mostradas en la lista de secuencias de la presente memoria. Tales secuencias se podrían obtener al sondear genotecas de ADNc o genotecas de ADN genómico hechas de otras especies vegetales, y al sondear tales genotecas con sondas que comprenden toda o parte de cualquiera de las secuencias de las listas de secuencias adjuntas en las condiciones de rigor medio a elevado. Se aplican unas consideraciones similares para obtener homólogos de especie y variantes alélicas de las secuencias de polipéptidos o nucleótidos. También se podrían obtener variantes y homólogos de cepa/especie por PCR degenerada que utilizaría cebadores diseñados que se dirigen selectivamente a secuencias dentro de variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas se pueden predecir, por ejemplo, mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de varios variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencia se pueden realizar con los programas informáticos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se utiliza ampliamente el programa PileUp del GCG de Wisconsin.

Los cebadores utilizados para la PCR degenerada contendrán una o varias posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de rigor más bajas que las usadas para clonar secuencias con cebadores de secuencias únicas frente a secuencias conocidas.

Como alternativa, tales polinucleótidos se podrían obtener mediante mutagénesis específica de sitio de las secuencias caracterizadas. Esto podría ser útil cuando, por ejemplo, se necesitan cambios silenciosos de la secuencia de codones para optimizar la preferencia de codones para una célula hospedadora concreta en la que se van a expresar las secuencias polinucleotídicas. Se podría desear la realización de otros cambios de secuencia para introducir sitios de reconocimiento de polipéptidos de restricción, o para alterar la propiedad o la función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) se podrían utilizar para producir un cebador, p. ej., un cebador para PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, p. ej., marcada con un marcador de revelado por los medios convencionales con el uso de marcadores radioactivos o no radioactivos, o los polinucleótidos se podrían clonar en vectores. Tales cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán al menos 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 o 40, nucleótidos de longitud, y también están englobados en el término polinucleótidos tal y como se utiliza en la presente memoria.

Los polinucleótidos tales como los polinucleótidos y sondas de ADN se podrían producir de manera recombinante, sintética o mediante cualquier medio disponible para el experto en la técnica. También se pueden clonar mediante técnicas estándares.

En general, los cebadores se producirán mediante medios sintéticos, lo que implica una fabricación por etapas, un nucleótido cada vez, de la secuencia deseada del ácido nucleico. Las técnicas para llevar a cabo esto que utilizan técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

Los polinucleótidos más largos se producirán por lo general por medios recombinantes, por ejemplo con técnicas de clonación de una PCR (reacción de la cadena de la polimerasa). Esto implicará la fabricación de una pareja de cebadores (p. ej., de unos 15 a 30 nucleótidos) que flanqueen una región de la secuencia de la enzima que se desea clonar, la puesta en contacto los cebadores con el ARNm o el ADNc obtenido de una célula vegetal, la realización de una reacción de la cadena de la polimerasa en condiciones que dan lugar a la amplificación de la región deseada, el aislamiento del fragmento amplificado (p. ej., por purificación de la mezcla de reacción en un gel de agarosa), y la recuperación del ADN amplificado. Los cebadores se podrían diseñar para que contengan sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción idóneas para que el ADN amplificado se pueda clonar en un vector de clonación idóneo.

Formulación y dosificación de las enzimas

Las enzimas utilizadas en los métodos de la invención se pueden formular o modificar, p. ej., modificar químicamente, para mejorar la solubilidad en aceite, la estabilidad, la actividad o para la inmovilización. Por ejemplo, las enzimas utilizadas en los métodos de la invención se pueden formular para ser anfipáticas o más lipófilas. Por ejemplo, las enzimas utilizadas en los métodos de la invención se pueden encapsular, p. ej., en liposomas o geles, p. ej., hidrogeles de alginato o perlas de alginato o equivalentes. Las enzimas utilizadas en los métodos de la invención se pueden formular en sistemas micelares, p. ej., un medio de sistema micelar ternario (SMT) o de sistema micelar inverso (SMI). Las enzimas utilizadas en los métodos de la invención se pueden formular tal y como se describe en Yi (2002) *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 19, págs. 319-325.

Las reacciones enzimáticas de los métodos de la invención, p. ej., la etapa de poner en contacto el aceite con una enzima que hidroliza un estereoisómero con la prima (p. ej., *a'* o *b'*) de la clorofila o de un derivado de la clorofila se puede efectuar en un recipiente de reacción o en varios recipientes. En un aspecto, las reacciones enzimáticas de los métodos de la invención se hacen en una unidad o instalación de refinado de aceite vegetal.

El método de la invención se puede llevar a la práctica con enzimas inmovilizadas, p. ej., una clorofilasa, feofitinasas y/o pirofeofitinasas inmovilizadas. La enzima se puede inmovilizar en cualquier soporte orgánico o inorgánico. Los

soportes inorgánicos de ejemplo incluyen alúmina, Celite®, cloruro de Dowex-1, perlas de cristal y gel de sílice. Los soportes orgánicos de ejemplo incluyen DEAE-celulosa, hidrogeles de alginato o perlas de alginato o equivalentes. En diferentes aspectos de la invención, la inmovilización de la enzima se puede optimizar mediante la adsorción física sobre el soporte inorgánico. Las enzimas utilizadas para llevar a la práctica la invención se pueden inmovilizar en diferentes medios, entre ellos agua, solución tamponada con Tris-HCl y un sistema micelar ternario que contiene la solución tamponada con Tris-HCl, hexano y tensioactivo. La enzima se puede inmovilizar en cualquier tipo de sustrato, p. ej., filtros, fibras, columnas, perlas, coloides, geles, hidrogeles, mallas y similares.

La enzima se podría dosificar en el aceite en cualquier cantidad idónea. Por ejemplo, la enzima se podría dosificar en un margen de unos 0,001 a 10 U/g de la composición, preferiblemente de 0,01 a 1 U/g, p. ej., de 0,01 a 0,1 U/g del aceite. Una unidad se define como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de sustrato (p. ej., clorofila a o b, feofitina a o b y/o pirofeofitina a o b, o un estereoisómero con la prima (p. ej., a' o b') de las mismas) por minuto a 40°C, en las condiciones de ensayo que están descritas en *J. Biol. Chem.* (1961) 236: 2544-2547.

Condiciones de las reacciones enzimáticas

En general, el aceite se podría incubar (o mezclar) con la enzima entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 100°C, más preferiblemente entre 10°C y aproximadamente 90°C, más preferiblemente entre aproximadamente 15°C y aproximadamente 80°C, más preferiblemente entre aproximadamente 20°C y aproximadamente 75°C.

A temperaturas más elevadas, la feofitina se descompone en pirofeofitina, lo que por lo general es menos preferido porque algunas clorofilasas son menos activas sobre la pirofeofitina que sobre la feofitina. Además, la pirofeoforbida, que es el producto de degradación de la pirofeofitina por acción de la clorofilasa, es menos hidrosoluble que la feoforbida y, así pues, más difícil de retirar después del aceite. La velocidad de la reacción enzimática se incrementa a temperaturas más elevadas, pero es favorable para mantener al mínimo la conversión de la feofitina en pirofeofitina.

A tenor de lo anterior, en las realizaciones particularmente preferidas, el aceite se incuba con la enzima por debajo de aproximadamente 80°C, preferiblemente por debajo de aproximadamente 70°C, preferiblemente a aproximadamente 68°C o por debajo, preferiblemente a aproximadamente 65°C o por debajo, para reducir la cantidad que se convierte en pirofeofitina. Sin embargo, para mantener una buena velocidad de reacción, se prefiere mantener la temperatura del aceite por encima de 50°C durante la incubación con la enzima. En consonancia, los márgenes de temperatura preferidos para la incubación de la enzima con el aceite incluyen de aproximadamente 50°C a por debajo de aproximadamente 70°C, de aproximadamente 50°C a aproximadamente 65°C y de aproximadamente 55°C a aproximadamente 65°C.

Preferiblemente, la temperatura del aceite podría ser la temperatura de reacción deseada cuando la enzima se mezcla con éste. El aceite podría calentarse y/o enfriarse a la temperatura deseada antes y/o durante la adición de la enzima. Por lo tanto, en una realización se contempla que una etapa más del proceso de acuerdo con la presente invención podría ser el enfriamiento y/o calentamiento del aceite.

Idóneamente, el tiempo de reacción (a saber, el periodo de tiempo en el que la enzima se incuba con el aceite), preferiblemente con agitación, dura un periodo de tiempo suficiente para permitir la hidrólisis de la clorofila y de los derivados de la clorofila, en especial de los estereoisómeros con la prima (p. ej., a' o b') de los mismos, para formar, p. ej., fitol y clorofilida, feoforbida y/o pirofeoforbida. Por ejemplo, el tiempo de reacción podría ser de al menos aproximadamente 1 minuto, más preferiblemente de al menos aproximadamente 5 minutos, más preferiblemente de al menos aproximadamente 10 minutos. En algunas realizaciones, el tiempo de reacción podría estar entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 6 horas, preferiblemente entre aproximadamente 15 minutos y aproximadamente 60 minutos, preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 120 minutos. En algunas realizaciones, el tiempo de reacción podría ser de hasta 6 horas.

Preferiblemente, el proceso se realiza entre aproximadamente pH 4,0 y aproximadamente pH 10,0, más preferiblemente entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 10,0, más preferiblemente entre aproximadamente pH 6,0 y aproximadamente pH 10,0, más preferiblemente entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 7,0, más preferiblemente entre aproximadamente pH 5,0 y aproximadamente pH 7,0, p. ej., a aproximadamente pH 7,0 (a saber, pH neutro). En una realización, el procedimiento se lleva a cabo preferiblemente entre aproximadamente pH 5,5 y pH 6,0.

Idóneamente, el contenido del agua del aceite cuando se incuba (o mezcla) con la enzima está entre aproximadamente el 0,5% y aproximadamente el 5% de agua, más preferiblemente entre aproximadamente el 1% y aproximadamente el 3%, y más preferiblemente entre aproximadamente el 1,5% y aproximadamente el 2%.

Cuando se utiliza una enzima inmovilizada, idóneamente, la actividad en agua de la enzima inmovilizada podría estar en el margen de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,98, preferiblemente entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 0,9, más preferiblemente entre aproximadamente 0,6 y aproximadamente 0,8.

Separación del aceite

Después de una etapa del tratamiento enzimático en el que se utiliza una enzima de acuerdo con la presente invención, en una realización el líquido tratado (p. ej., aceite) se separa con medios adecuados, tales como un separador por centrifugación, y se obtiene el aceite procesado. Tras la compleción del tratamiento enzimático, si es necesario, el aceite procesado se puede lavar adicionalmente con agua o un ácido orgánico o inorgánico, tal como, p. ej., ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido succínico, y similares, o con soluciones salinas.

Retirada de la clorofila y/o de derivados de la clorofila

El procedimiento de la presente invención que implica un tratamiento enzimático reduce típicamente la cantidad de clorofila y/o de derivados de la clorofila en el aceite, en especial de los estereoisómeros con la prima (p. ej., *a'* o *b'*) de los mismos. Por ejemplo, el procedimiento podría reducir la concentración de clorofila *a* o *b*, feofitina *a* o *b* y/o pirofeofitina *a* o *b*, o los estereoisómeros con la prima (p. ej., *a'* o *b'*) de los mismos cerca de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99%, en comparación con la concentración de clorofila, feofitina y/o pirofeofitina (en peso) presente en el aceite antes del tratamiento. Así pues, en realizaciones concretas, la concentración de clorofila y/o de derivados de la clorofila, o de los estereoisómeros con la prima (p. ej., *a'* o *b'*) de los mismos, en el aceite después del tratamiento podría ser de menos de 100, de menos de 50, de menos de 30, de menos de 10, de menos de 5, de menos de 1, de menos de 0,5, de menos de 0,1 mg/kg o de menos de 0,02 mg/kg, basándose en el peso total del aceite.

Si se utiliza una enzima que es estereoespecífica para las formas sin la prima de la clorofila o de los derivados de la clorofila, después del tratamiento con la enzima, el aceite comprende típicamente una proporción reducida de los estereoisómeros sin la prima, en comparación con la cantidad total de estereoisómeros con la prima y sin la prima que quedan en el aceite (véanse el ejemplo 3 y la figura 48 que vienen a continuación). En cambio, en las realizaciones de la presente invención, las enzimas utilizadas en el presente método tienen típicamente menos estereoespecificidad por las formas sin la prima de la clorofila y de los derivados de la clorofila, a saber, las enzimas son típicamente capaces de hidrolizar tanto las formas con la prima como sin la prima. Por consiguiente, después de una etapa de tratamiento de la presente invención, la proporción de los estereoisómeros sin la prima que quedan en el aceite cae típicamente menos que cuando se utiliza una enzima estereoespecífica.

Se ha hallado que, en las condiciones típicas, los aceites brutos (p. ej., aceite de soja o aceite de colza brutos) podrían comprender aproximadamente el 70% de estereoisómeros sin la prima (p. ej., feofitina *a*) y el 30% de estereoisómeros con la prima (p. ej., feofitina *a'*). En una realización, después del tratamiento con la enzima, el aceite comprende al menos el 50% de estereoisómeros sin la prima (p. ej., *a* y/o *b*) de la clorofila o del derivado de la clorofila, basándose en la cantidad total de estereoisómeros sin la prima (p. ej., *a* y/o *b*) y con la prima (p. ej., *a'* y/o *b'*) de la clorofila o del derivado de la clorofila que contiene el aceite. Más preferiblemente, el aceite comprende al menos el 55%, al menos el 60% o al menos el 65% de estereoisómeros sin la prima de la clorofila o del derivado de la clorofila después del tratamiento.

En una realización, después del tratamiento con la enzima, el aceite comprende al menos el 50%, al menos el 60% o al menos el 65% de feofitina *a*, basándose en la cantidad total de feofitina *a* y feofitina *a'* que contiene el aceite. En una realización, después del tratamiento con la enzima, el aceite comprende al menos el 50%, al menos el 60% o al menos el 65% de feofitina *b*, basándose en la cantidad total de feofitina *b* y feofitina *b'* que contiene el aceite.

En estas realizaciones, las condiciones típicas podrían ser, por ejemplo, de aproximadamente 20°C a aproximadamente 70°C (p. ej., aproximadamente 40°C o aproximadamente 60°C), pH de 5 a 8 (p. ej., aproximadamente pH 6,0 o aproximadamente pH 7,0) y el contenido de agua del 1 al 3% (p. ej., aproximadamente el 2%). El tiempo del tratamiento podría comprender, por ejemplo, al menos 1 hora, preferiblemente 2 horas o más, más preferiblemente 4 horas o más.

Otras etapas del procedimiento

En un método típico de procesamiento de aceites vegetales, el aceite se extrae en hexano, se desgoma el aceite vegetal bruto, se realiza facultativamente la neutralización cáustica, se blanquea con, p. ej., adsorción en arcilla con desecho posterior de la arcilla, y se desodoriza para producir el aceite refinado, blanqueado y desodorizado (RBD) (véase la figura 50). La necesidad de la etapa de desgomado depende del contenido de fósforo y de otros factores. El procedimiento de la presente invención se puede utilizar junto con procedimientos basados en la extracción mediante el uso de hexano y/o enzimas para la extracción del aceite (véase *Journal of American Oil Chemists' Society* (2006), 83 (11), 973-979). En general, el procedimiento de la invención se podría realizar con las etapas de procesamiento de aceites tal y como se describe en *Bailey's Industrial Oil and Fat Products* (2005), 6.ª edición, ed. por Fereidoon Shahidi, John Wiley & Sons.

En las realizaciones de la presente invención, una reacción enzimática que implica la aplicación de la enzima capaz de hidrolizar la clorofila o un derivado de la clorofila se podría realizar en diferentes etapas de este procedimiento, y se muestran en la figura 50. En realizaciones concretas, la enzima se pone en contacto con el aceite antes de la etapa de desgomado. En otra realización, la enzima se podría poner en contacto con el aceite durante una etapa de

desgomado con agua. En otra realización, la enzima se pone en contacto con el aceite desgomado con agua, pero antes de que el desgomado sea completo (p. ej., antes de un desgomado total o de una etapa de neutralización cáustica).

- 5 Otras etapas del procedimiento, después del tratamiento con la enzima, podrían ayudar a la retirada de los productos de la hidrólisis enzimática de la clorofila y/o de los derivados de la clorofila. Por ejemplo, otras etapas del procedimiento podrían retirar la clorofilida, la feoforbida, la pirofeoforbida y/o el fitol.

Desgomado

10 La etapa del desgomado en el refinado del aceite sirve para separar los fosfátidos mediante la adición de agua. El material precipitado mediante el desgomado se separa y se procesa adicionalmente en mezclas de lecitinas. Las lecitinas comerciales, tales como la lecitina de soja y la lecitina de girasol, son materiales semisólidos o muy viscosos. Consisten en una mezcla de lípidos polares, principalmente fosfolípidos, tales como la fosfatidilcolina, con un componente menor de triglicéridos. Así pues, tal y como se utiliza en la presente memoria, el término «desgomado» significa el refinado del aceite mediante la retirada de los fosfolípidos del aceite. En algunas realizaciones, el desgomado podría comprender una etapa de convertir los fosfátidos (tales como la lecitina y los fosfolípidos) en fosfátidos hidratables.

15 El procedimiento de la invención se puede utilizar con cualquier procedimiento de desgomado, en concreto en las realizaciones donde la enzima que hidroliza la clorofila o el derivado de la clorofila se pone en contacto con el aceite antes de la etapa de desgomado. Así pues, los métodos de desgomado idóneos incluyen el desgomado con agua, el desgomado con aceite ALCON (p. ej., para las sojas), el desgomado Safinco, el «superdesgomado», el desgomado UF, el desgomado TOP, el unidesgomado, el desgomado seco y el desgomado ENZYMAX™. Véanse, p. ej., las patentes de los EE. UU. n.ºs 6.355.693; 6.162.623; 6.103.505; 6.001.640; 5.558.781; 5.264.367; 5.558.781; 5.288.619; 5.264.367; 6.001.640; 6.376.689; las solicitudes de patente internacional WO 0229022; WO 98118912; y similares. En Bockisch, M. (1998), «Fats and Oils Handbook», *The Extraction of Vegetable Oils* (capítulo 5); 345-445, AOCS Press, Champaign, Illinois, se describen diferentes procedimientos de desgomado.

20 El desgomado con agua típicamente hace referencia a una etapa en la que el aceite se incuba con agua (p. ej., del 1 al 5% en peso) para retirar los fosfátidos. Típicamente, el desgomado con agua se podría realizar a una temperatura elevada, p. ej., de 50 a 90°C. La mezcla de aceite/agua se podría agitar, por ejemplo, de 5 a 60 minutos para permitir la separación de los fosfátidos en la fase acuosa, que a continuación se retira del aceite.

25 También se podría realizar el desgomado ácido. Por ejemplo, el aceite se podría poner en contacto con ácido (p. ej., del 0,1 al 0,5% de una solución al 50% de ácido cítrico o de ácido málico) a una temperatura de 60 a 70°C, se mezcla, se pone en contacto con agua del 1 al 5%, y se enfría de 25 a 45°C.

30 Otros procedimientos de desgomado idóneos para ser usados con el procedimiento de la presente invención se describen en la solicitud de patente internacional WO 2006/008508. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto la enzima que hidroliza la clorofila o el derivado de la clorofila con el aceite y, posteriormente, realizar una etapa de desgomado enzimático con una aciltransferasa, tal y como está descrito en la patente internacional WO 2006/008508. Las aciltransferasas idóneas para ser usadas en el procedimiento también están descritas en las solicitudes de patente internacional WO 2004/064537, WO 2004/064987 y WO 2009/024736. Se podría utilizar cualquier enzima que tenga actividad aciltransferasa (generalmente están clasificadas como E. C. 2.3.1.), en concreto las enzimas que comprenden el motivo de secuencia de aminoácidos GDSX, en donde X es uno o varios de los siguientes restos aminoacídicos: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S. En una realización, la aciltransferasa es una lípido-aciltransferasa madura de *Aeromonas salmonicida* mutante (GCAT) con una mutación de Asn80Asp.

35 En otra realización, el procedimiento comprende una etapa de desgomado con el uso de una fosfolipasa. Se podría utilizar cualquier enzima que tenga, p. ej., una actividad de fosfolipasa A1 (E. C. 3.1.1.32) o de fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4), por ejemplo, Lecitase Ultra® o fosfolipasa A2 pancreática (Novozymes, Dinamarca). En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto la enzima que hidroliza la clorofila o el derivado de clorofila con el aceite antes de una etapa de desgomado enzimático que utiliza una fosfolipasa, por ejemplo, que utiliza una etapa de desgomado como la descrita en la patente de los EE. UU US 5.264.367, la patente europea EP 0.622.446, la solicitud de patente internacional WO 00/32758 o Clausen (2001) «Enzymatic oil degumming by a novel microbial phospholipase», *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 103: 333-340.

40 En otra realización, la etapa de desgomado podría ser una etapa de desgomado con agua. En otra realización, se podría utilizar una etapa de desgomado enzimático que utiliza una enzima tal como la fosfolipasa C (IUB 3.1.4.1). Los polipéptidos que tienen actividad fosfolipasa C que se podrían utilizar en una etapa de desgomado se describen, por ejemplo, en las solicitudes de patente internacional WO 2008143679, WO 2007092314, WO 2007055735, WO 2006009676 y WO 03089620. Una fosfolipasa C idónea para ser usada en la presente invención es Purifine®, disponible de Verenum Corporation, Cambridge, MA.

Tratamiento ácido/neutralización cáustica

En algunas realizaciones, se podría realizar una etapa de tratamiento ácido/neutralización cáustica para reducir más la cantidad de fosfolípidos en el aceite después del desgomado con agua. En otra realización, se podría realizar una sola etapa de desgomado que comprende el tratamiento ácido/neutralización cáustica. Tales métodos se denominan típicamente desgomado total o refinado con álcali.

Se ha encontrado que una etapa de tratamiento ácido/neutralización cáustica es particularmente eficaz para retirar los productos de la hidrólisis enzimática de la clorofila, p. ej., clorofilida, feoforbida y pirofeoforbida. Así pues, esta etapa se podría realizar en cualquier estadio en el procedimiento después de la etapa del tratamiento enzimático. Por ejemplo, tal etapa podría comprender la adición de un ácido, tal como el ácido fosfórico, seguido de la neutralización con un álcali, tal como el hidróxido de sodio. Después de un tratamiento ácido/neutralización cáustica, los compuestos tales como la clorofilida, la feoforbida y la pirofeoforbida se extraen del aceite en una fase acuosa.

En tales métodos, el aceite se pone típicamente en contacto primero con el 0,05 al 0,5% en peso de ácido fosfórico concentrado, p. ej., a una temperatura de 50 a 90°C, y se mezcla para ayudar a precipitar los fosfátidos. El tiempo de contacto podría ser, p. ej., de 10 s a 30 min. Posteriormente, se le añade una solución acuosa de un álcali (p. ej., hidróxido de sodio acuoso del 1 al 20%), p. ej., a una temperatura de 50 a 90°C, seguido de la incubación y la mezcla durante 10 s a 30 min. A continuación, el aceite se podría calentar a aproximadamente 90°C y la fase acuosa jabonosa se separaría del aceite por centrifugación.

Facultativamente, también se pueden realizar más etapas de lavado con, p. ej., hidróxido de sodio o agua.

Retirada de la clorofilida, la feoforbida y la pirofeoforbida

El método de la presente invención podría facultativamente implicar una etapa de retirada de los derivados sin fitol de la clorofila, tales como la clorofilida, la feoforbida o la pirofeoforbida, que incluyen las formas con la prima y sin la prima de los mismos. Tales productos podrían estar presentes en la composición debido a la hidrólisis de la clorofila o de un derivado de la clorofila por la acción de la enzima de la invención, o podrían estar presentes de forma natural, como contaminantes, o como componentes indeseados en un producto procesado. La pirofeoforbida también podría estar presente en la composición debido a la degradación de la feoforbida, que podría ella misma producirse por la acción de una enzima que tenga actividad feofitinasas sobre la feofitina, o la feoforbida se podría formar a partir de la clorofilida después de la acción de la clorofilasa sobre la clorofila (véase la figura 1). Las condiciones del procedimiento utilizadas en el refinado del aceite, en particular calor, podrían favorecer la formación de la pirofeoforbida como componente dominante, por ejemplo al favorecerse la conversión de la feofitina en pirofeofitina, que posteriormente se hidrolizaría en pirofeoforbida.

En una realización, el procedimiento de la presente invención reduce la concentración de clorofilida, feoforbida y/o pirofeoforbida en el aceite, en comparación con cualquiera, o ambas, concentraciones antes y después del tratamiento enzimático. Así pues, en algunas realizaciones, la concentración de clorofilida, feoforbida y/o pirofeoforbida se podría incrementar después del tratamiento con la enzima. Típicamente, el procedimiento implica una etapa de retirada de la clorofilida, de la feoforbida y/o de la pirofeoforbida, de tal manera que la concentración de tales productos es menor que después del tratamiento con la enzima. Preferiblemente, se retiran del aceite la clorofilida, la feoforbida y/o la pirofeoforbida producidas por esta etapa enzimática, para que la concentración final de estos productos en el aceite sea menor que antes del tratamiento enzimático.

Por ejemplo, el procedimiento podría reducir la concentración de clorofilida, feoforbida y/o pirofeoforbida, entre ellas las formas con la prima y sin la prima de las mismas, cerca de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos el 95% o al menos el 99%, en comparación con la concentración de clorofilida, feoforbida y/o pirofeoforbida (en peso) presente en el aceite antes de la etapa de retirada de clorofilida, feoforbida y/o pirofeoforbida, a saber, antes o después del tratamiento enzimático. Así pues, en realizaciones concretas, la concentración de clorofilida, feoforbida y/o pirofeoforbida en el aceite después de la etapa de retirada podría ser de menos de 100, de menos de 50, de menos de 30, de menos de 10, de menos de 5, de menos de 1, de menos de 0,5, de menos de 0,1 mg/kg, o de menos de 0,02 mg/kg, basándose en el peso total de la composición (p. ej., un aceite vegetal).

Es una ventaja del presente procedimiento que los productos de la reacción, tales como clorofilida, feoforbida y/o pirofeoforbida, se puedan retirar del aceite de manera sencilla y fácil mediante una etapa tal como el tratamiento ácido/neutralización cáustica. Así pues, en las realizaciones preferidas, la clorofila y los derivados de la clorofila se podrían retirar sustancialmente del aceite sin necesidad de más etapas de procesamiento, tales como el tratamiento con arcilla y/o sílice y la desodorización (tal y como se indica mediante las cajas discontinuas mostradas en la figura 50).

Tratamiento con arcilla

Es particularmente preferido que el procedimiento no comprenda una etapa de tratamiento con arcilla. Es ventajoso evitar el uso de la arcilla por las razones descritas anteriormente, en particular la reducción de costes, la reducción

de las pérdidas de aceite por adherencia a la arcilla y el incremento de la retención de los compuestos útiles, tales como los carotenoides y el tocoferol.

5 En algunas realizaciones, el procedimiento se podría realizar sin ninguna etapa de tratamiento con arcilla y sin ninguna etapa de desodorización, lo que da lugar a un incremento de la concentración de tales compuestos útiles en el aceite refinado, en comparación con un procedimiento que implica el tratamiento con arcilla.

Tratamiento con sílice

10 Aunque no siempre resulta necesario, en algunas realizaciones, el procedimiento podría comprender una etapa de tratamiento con sílice, preferiblemente después del tratamiento con la enzima. Por ejemplo, el método podría comprender el uso de dispositivos y procedimientos de refinado con sílice poco absorbente o sin adsorbente, que se conocen en la técnica, p. ej., mediante los procedimientos de refinado con sílice de TriSyl (Grace Davison, Columbia, MD) o sílices SORBSIL RTM (INEOS Silicas, Joliet, IL).

15 La etapa del tratamiento con sílice se podría utilizar para retirar del aceite cualquier residuo de clorofilida, feoforbida y/o pirofeoforbida, u otros componentes polares. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se podría utilizar una etapa de tratamiento con sílice como una alternativa a una etapa de tratamiento ácido/neutralización cáustica (desgomado total o refinado con álcali).

20 En una realización, el procedimiento comprende un tratamiento con sílice en dos etapas, p. ej., que comprende dos etapas de tratamiento con sílice separadas por una etapa de separación en la que se retira el sílice, p. ej., una etapa de filtración. El tratamiento con sílice se podría realizar a una temperatura elevada, p. ej., por encima de aproximadamente 30°C, más preferiblemente de aproximadamente 50 a 150°C, de aproximadamente 70 a 110°C, de aproximadamente 80 a 100°C, o de aproximadamente 85 a 95°C, lo más preferiblemente de aproximadamente 90°C.

Desodorización

25 En algunas realizaciones, el procedimiento podría comprender una etapa de desodorización, típicamente como la etapa final de refinado del procedimiento. En una realización, la desodorización hace referencia a una destilación del aceite con vapor, lo que típicamente retira los compuestos volátiles con olor y sabor, el tocoferol, los esteroides, los estanoles, los carotenoides y otros nutrientes. Típicamente, el aceite se calienta de 220 a 260°C a presión baja (p. ej., de 0,1 a 1 kPa) para excluir el aire. El vapor (p. ej., 1-3% en peso) se sopla por el aceite para retirar los compuestos volátiles, por ejemplo, durante 15 a 120 minutos. Se podría recoger el destilado acuoso.

30 En otra realización, la desodorización se podría realizar con un gas inerte (p. ej., nitrógeno) en vez de vapor. Así pues, la etapa de desodorización podría comprender el refinado con burbujas o el rociado de un gas inerte (p. ej., nitrógeno), por ejemplo, tal y como está descrito en A. V. Tsiadi et al. en «Nitrogen bubble refining of sunflower oil in shallow pools», *Journal of the American Oil Chemists' Society* (2001), volumen 78 (4), páginas 381-385. Se podría recoger la fase gaseosa que se hizo pasar por el aceite y, facultativamente, se podría condensar, y/o se le podrían extraer los compuestos volátiles en una fase acuosa.

35 En algunas realizaciones, el procedimiento de la presente invención se realiza sin ningún tratamiento con arcilla, sino que comprende una etapa de desodorización. Los compuestos útiles (p. ej., carotenoides, esteroides, estanoles y tocoferol) podrían extraerse al menos parcialmente del aceite en un destilado (p. ej., un destilado acuoso o nitrogenoso) obtenido de la etapa de desodorización. Este destilado proporciona una fuente valiosa de compuestos tales como los carotenoides y el tocoferol, que podrían perderse al menos parcialmente por arrastre en un procedimiento que comprende el tratamiento con arcilla.

45 La pérdida del tocoferol durante el blanqueo depende de las condiciones del blanqueo y el tipo de arcilla aplicada, pero se ha descrito una retirada del 20 al 40% del tocoferol en la etapa del blanqueo (K. Boki, M. Kubo, T. Wada y T. Tamura, *ibid.*, 69, 323 (1992)). Durante el procesamiento del aceite de soja, se ha descrito una pérdida de tocoferol del 13% en la etapa del blanqueo (S. Ramamurthi, A. R. McCurdy y R. T. Tyler en S. S. Koseoglu, K. C. Rhee y R. F. Wilson, eds. *Proc. World. Conf. Oilseed Edible Oils Process*, vol. 1. AOCS Press, Champaign, Illinois, 1998, págs. 130-134).

50 Los carotenoides se podrían retirar del aceite durante la desodorización tanto del aceite tratado con arcilla como del aceite sin tratar con arcilla. Típicamente, la retirada de los carotenoides coloreados está controlada para producir un aceite que tenga un color predeterminado dentro de un margen específico de valores. La concentración de carotenoides y de otros compuestos volátiles en el aceite refinado se puede hacer variar mediante la modificación de la etapa de desodorización. Por ejemplo, en una realización donde se desea conservar una concentración de carotenoides más elevada en el aceite, la etapa de desodorización se podría realizar a una temperatura más baja (p. ej., con vapor a 200°C o por debajo). En tales realizaciones, es particularmente preferible evitar una etapa de tratamiento con arcilla, ya que esto dará lugar a una concentración más elevada de carotenoides en el aceite refinado.

55

Otros tratamientos enzimáticos

En otros aspectos, los procedimientos de la invención comprenden además el uso de aciltransferasas de lípidos, fosfolipasas, proteasas, fosfatasas, fitasas, xilanasas, amilasas (p. ej., α -amilasas), glucanasas, poligalacturonasas, galactolipasas, celulasas, hemicelulasas, pectinasas y otras enzimas que degradan la pared celular vegetal, así como preparaciones enzimáticas mixtas y lisados celulares. En aspectos alternativos, los procedimientos de la invención se pueden llevar a la práctica junto con otros procedimientos, p. ej., tratamientos enzimáticos, p. ej., con carbohidrasas, entre ellos celulasa, hemicelulasa y otras actividades de degradación secundarias, o procedimientos químicos, p. ej., la extracción con hexano del aceite de soja. En una realización, el método de la presente invención se puede llevar a la práctica junto con un método como el que está definido en la solicitud de patente internacional WO 2006031699.

La invención se ilustrará adicionalmente a continuación con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Identificación y clonación de las clorofilasas

Mediante el uso de diferentes estrategias (que incluyen BLAST) para la búsqueda en las bases de datos del NCBI, se identificaron varias secuencias que eran clorofilasas o secuencias que tenían homología con las clorofilasas. El nombre de las secuencias, su origen y el número de acceso a la base de datos del NCBI se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Clorofilasas con los números de acceso y nombres utilizados en la presente memoria

| Organismo | N.º de acceso en la base de datos | Nombre de CHL |
|-----------------------------|-----------------------------------|---------------|
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | AAG12547 | ARA_CHL |
| <i>Arabidopsis thaliana</i> | NP_199199 | ARA_CHL2 |
| <i>Citrus sinensis</i> | AAF59834 | CIT_CHL |
| <i>Triticum aestivum</i> | BT009214 | TRI_CHL |
| <i>Triticum aestivum</i> | BT008923 | TRI_CHL2 |
| <i>Brassica oleracea</i> | AAN51935 | BRA_CHL |
| <i>Brassica oleracea</i> | AAN51933 | BRA_CHL1 |
| <i>Brassica oleracea</i> | AAN51934 | Brass_CHL2 |
| <i>Zea mays</i> | ACN32030 | ZEA_CHL |
| <i>Zea mays</i> | ACG44273 | ZEA_CHL2 |
| <i>Phyllostachys edulis</i> | FP092915 | BAM_CHL |
| <i>Chenopodium album</i> | Q9LE89 | CHE_CHL |
| <i>Ricinus communis</i> | XP_002517075 | CB_CHL |
| <i>Glycine max</i> | BAF43704 | GlyMax_CHL |
| <i>Ginkgo biloba</i> | AAP44978 | Gin_CHL |
| <i>Pachira macrocarpa</i> | ACO50429 | PAC_CHL2 |
| <i>Populus trichocarpa</i> | XP_002315752 | POP_CHL |
| <i>Sorghum bicolor</i> | XP_002459848 | Sor_CHL |
| <i>Sorghum bicolor</i> | XP_002445588 | SORG_CHL |

| Organismo | N.º de acceso en la base de datos | Nombre de CHL |
|--------------------------------|-----------------------------------|---------------|
| <i>Vitis vinifera</i> | XP_002273926 | Vitis_CHL |
| <i>Physcomitrella patens</i> | EDQ81786 | PHYS_CHL |
| <i>Aquilegia</i> | | AQU_CHL |
| <i>Brachypodium distachyon</i> | ADDN01001446 | BRACH_CHL |
| <i>Medicago truncatula</i> | ACJ85964 | MED_CHL |
| <i>Piper betle</i> | ABI96085 | PIP_CHL |
| <i>Lotus japonicus</i> | AK338339 | LOTUS_CHL |
| <i>Oryza sativa Indica</i> | EEC66959 | ORYI_CHL |
| <i>Oryza sativa Japonica</i> | NP_001064620 | ORYJ2_CHL |
| <i>Oryza sativa Japonica</i> | EEE50970 | ORYJ2_CHL |
| <i>Picea sitchensis</i> | ACN40275 | PICEA_CHL |
| <i>Chlamydomonas</i> | XP_001695577 | CHL_CHL |

Secuencia de las clorofilasas

La secuencia de las clorofilasas identificadas a partir de la búsqueda en las bases de datos del NCBI se recogen en la tabla 1 y las secuencias de aminoácidos se muestran en las figuras 12 a 42 (SEQ ID n.ºs 1 a 31). El alineamiento múltiple de secuencias de la selección de secuencias de aminoácidos de clorofilasas mostró varios restos conservados distribuidos a lo largo de las secuencias. El motivo GHSRG (SEQ ID n.º 32) que contiene la Ser del centro activo está muy conservado. El alineamiento dio lugar a un árbol filogenético que se muestra en la figura 43.

Clonación en *E. coli*

Se prepararon los genes sintéticos que codifican las clorofilasas mostradas en la tabla 1. En cada gen, se optimizaron los codones para la expresión en *E. coli*. Para los propósitos de la clonación, se extendió el extremo 5' de los genes para que contuviera un sitio de restricción para NheI y se extendió el extremo 3' para que contuviera un sitio de restricción para XhoI.

Después de la digestión con las enzimas de restricción NheI y XhoI, el ADN sintético se introdujo por ligación en el vector de expresión de *E. coli* pET-28a(+) (Novagen) digerido con las mismas enzimas de restricción. Este vector incluye un promotor de T7 con un operador Lac para controlar la expresión de los genes insertados. Los genes de las clorofilasas se fusionaron en fase a una etiqueta de His y con un sitio de escisión de la trombina para la purificación (ejemplo mostrado en la figura 4). Las construcciones resultantes (en la figura 5 se muestra un pET28-TRI_CHL de ejemplo) se introdujeron por transformación en las células competentes TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), se aislaron los plásmidos de las colonias transformadas y se sometieron a la secuenciación de nucleótidos para verificar que la secuencia era correcta y que todas las fusiones eran como se esperaba.

Expresión en *E. coli*

Para la expresión, los plásmidos se introdujeron por transformación en el hospedador de expresión BL21 (DE3) de *E. coli* (Novagen). Las células se cultivaron a 37°C en LB que contenía carbenicilina (50 mg/ml) hasta una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. Para la inducción, al cultivo se le añadió IPTG a 1 mM y se incubó a 25°C durante otras 20 a 24 h antes de recoger las células por centrifugación. Las clorofilasas recombinantes se liberaron por sonicación del sedimento de células y el residuo celular se retiró por centrifugación.

Clonación en *B. subtilis*

Para la clonación y la expresión en *B. subtilis*, a los genes sintéticos que codifican las clorofilasas (tabla 1) se les optimizaron los codones para *B. subtilis*. Los genes se clonaron en dos plásmidos diferentes, uno para la expresión intracelular y otro para la secreción en el medio de cultivo (expresión extracelular).

Expresión extracelular

Se extendió el extremo 5' de los genes para que contuviera un sitio de restricción para BssHII y parte de una secuencia señal de AprE para la fusión en fase con la secuencia señal de AprE, así como una secuencia que codifica los aminoácidos A G K para facilitar la escisión de la secuencia señal. Se extendió el extremo 3' de los genes con un sitio de restricción para PacI. Los genes digeridos con BssHII y PacI se introdujeron por ligación en el vector de expresión para *B. subtilis* pBN digerido con las mismas enzimas de restricción. El vector pBN contiene un promotor de AprE y una secuencia señal de AprE. Un ejemplo de la fusión resultante de los genes de las clorofilasas con la secuencia señal de AprE se muestra en la figura 6. Las construcciones finales (en la figura 7 se muestra un pBN-TRI_CHL de ejemplo) se introdujeron por transformación en las células competentes TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), se aislaron los plásmidos de las colonias transformadas y se sometieron a la secuenciación de nucleótidos para verificar que la secuencia era correcta y que todas las fusiones eran como se esperaba.

Para la expresión, los plásmidos se introdujeron por transformación en el hospedador de expresión BG6002 de *B. subtilis*. Las células se cultivaron a 33°C en el medio II de Grant durante 68 h. Las clorofilasas recombinantes se aislaron del medio de cultivo después de la precipitación de las células por centrifugación.

15 Expresión intracelular

Se extendió el extremo 5' de los genes para que contuviera un sitio de restricción para SpeI para permitir la fusión de los genes directamente al promotor de AprE en un vector de expresión de *B. subtilis* pBN sin la secuencia señal de AprE. Se extendió el extremo 3' de los genes con un sitio de restricción para HindIII. La fusión de un gen de clorofilasa con el promotor de AprE se muestra en la figura 8. Las construcciones resultantes (en la figura 9 se muestra un pBN-Spe-TRI_CHL de ejemplo) se introdujeron por transformación en las células competentes TOP10 de *E. coli* (Invitrogen) y se aislaron los plásmidos de las colonias transformadas y se sometieron a la secuenciación de nucleótidos para verificar que la secuencia era correcta y que todas las fusiones eran como se esperaba.

Para la expresión, los plásmidos se introdujeron por transformación en el hospedador de expresión BG6002 de *B. subtilis*. Las células se cultivaron a 33°C en el medio II de Grant durante 68 h. Las clorofilasas recombinantes se liberaron de los cultivos mediante el tratamiento con lisozima a 1 mg/ml durante 1 h a 30°C. El residuo celular se retiró por centrifugación y las clorofilasas se recuperaron del sobrenadante.

Clonación en *S. lividans*

Para la clonación y la expresión en *S. lividans*, a los genes sintéticos que codifican las clorofilasas (tabla 1) se les optimizaron los codones para *S. lividans*. Para los propósitos de clonación, se extendió el extremo 5' de los genes para que contuviera un sitio de restricción para NheI y parte de una secuencia señal de Cel A para la fusión en fase con la secuencia señal de Cel A. Se extendió el extremo en 3' para que contuviera un sitio de restricción para BamHI. En la figura 10 se muestra la fusión de un gen de clorofilasa (TRI_CHL) con la secuencia señal de Cel A. Las construcciones resultantes (en la figura 11 se muestra un pKB-TRI_CHL de ejemplo) se introdujeron por transformación en las células competentes TOP10 de *E. coli* (Invitrogen), los plásmidos se aislaron de las colonias transformadas y se sometieron a la secuenciación de nucleótidos para verificar que la secuencia era correcta y que todas las fusiones eran como se esperaba.

Expresión en *S. lividans*

Para la expresión, los plásmidos se introdujeron por transformación en protoplastos del hospedador de expresión de la cepa g3s3 de *S. lividans*. Las células se cultivaron previamente durante 48 h a 30°C en el medio TSG complementado con tioestreptón. Los precultivos se diluyeron 10x en el medio modificado Strept Pdxn2 y se incubaron a 30°C durante 96 h. Las clorofilasas recombinantes se aislaron del medio de cultivo después de la precipitación de las células por centrifugación.

Ejemplo 2

Actividad de las clorofilasas

Se identificaron una serie de clorofilasas mediante minería genómica, tal y como está descrito más arriba, y se expresaron en *E. coli*. A los extractos de *E. coli* que albergaban los plásmidos que contenían el gen de la clorofilasa se les analizó la actividad feofitinasas. El ensayo se podría realizar tal y como está descrito en la patente europea EP 10159327.5. Como alternativa, la actividad feofitinasas se podría determinar mediante un método como el descrito más arriba p. ej., con los métodos basados en la HPLC. Los resultados se muestran en la tabla 2.

La actividad feofitinasas se podría determinar basándose en la hidrólisis de la feofitina a en un tampón de reacción seguido por la medición fluorescente de la feoforbida a generada. El ensayo también se puede adaptar para utilizar la pirofeofitina como sustrato. Se define 1 U de actividad enzimática como la hidrólisis de 1 μmol de feofitina o una pirofeofitina por minuto a 40°C.

Tabla 2: Actividad feofitinasas de las enzimas

| Enzima | Fermento | Actividad U/ml |
|-------------------|---------------------|----------------|
| BAM_CHL | CoRe 112 | 0,32 |
| CIT_CHL | CoRe 113-A | 0,25 |
| ARA_CHL | CoRe 114-A | 5,19 |
| CB_CHL | CoRe 127 | 0,10 |
| GlyMax_CHL | Core133 | 0,010 |
| Sor_CHL | Core134 | 6,14 |
| ARA_CHL2 | Core135 | 0,94 |
| BRA_CHL1 | Core136 | 1,21 |
| SORG_CHL | CoRe 137-A | 0,78 |
| TRI_CHL2 | Core138-A | 0,19 |
| ZEA_CHL2 | Core139 | 0,03 |
| TRI_CHL | CoRe 20 | 0,18 |
| BRACH_CHL | CoRe 156 | 1,50 |
| PIP_CHL | CoRe 158 | 0,01 |
| PICEA_CHL | CoRe 163 | 0,05 |
| Control | Vector vacío | 0,000 |

Las enzimas descritas en la tabla 2 se analizaron mediante análisis de transferencia de tipo Western con un anticuerpo primario generado en conejos contra la TRI_CHL purificada. Las figuras 44 y 45 muestran que todas las enzimas de la tabla 2 reaccionan con el anticuerpo generado.

5 Ejemplo 3

Hidrólisis de los derivados de la clorofila en los aceites vegetales

A algunas de las enzimas se les analizó la capacidad para degradar los componentes de la clorofila en un sistema oleoso. La receta se muestra en la tabla 3. El aceite de colza bruto se escala en un vidrio de Wheaton y se calienta con agitación magnética a 60°C. Se le añaden agua y enzima. La muestra se trata con un mezclador de alta cizalla durante 20 s y se incuba a 60°C con agitación magnética. Se extraen muestras transcurrido un tiempo de reacción de 0,5, 2 y 4 horas. Las muestras se centrifugan y se analizan por HPLC-MS.

Tabla 3: Receta para analizar las clorofilasas en el sistema oleoso

| | Unidades/ml | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|-----------------------------------------------|-------------|----|-------|--------|-------|-------|-------|-------|
| Aceite de colza bruto extraído con AKK n.º 11 | | | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Agua | | ml | 0,200 | 0,152 | 0,159 | 0,011 | 0,191 | 0,162 |
| | | | | | | | | |
| ARA_CHL2 | 0,62 | ml | | 0,0484 | | | | |

| | Unidades/ml | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|----------------------|-------------|----|-------|--------|--------|--------|--------|--------|
| BRA_CHL1 | 3,62 | ml | | | 0,0414 | | | |
| CB_CHL | 2,11 | ml | | | | 0,189 | | |
| TRI_CHL | 54,19 | ml | | | | | 0,009 | |
| SORG_CHL | 0,78 | ml | | | | | | 0,0385 |
| | | | | | | | | |
| Unidades/g de aceite | | | 0,000 | 0,0030 | 0,0150 | 0,0400 | 0,0500 | 0,003 |
| % de agua | | | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 |
| Temperatura | | °C | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |

Las cantidades totales de feofitina a (feofitina $a + a'$) que se determinó por HPLC-MS se muestran en la figura 46. La degradación de la pirofeofitina a se muestra en la figura 47. Las 5 enzimas candidatas pueden degradar la feofitina y la feofitina, pero, en especial, la actividad sobre la pirofeofitina varía significativamente entre las 5 enzimas analizadas.

- 5 En las muestras de aceite tratadas con clorofilasa, también analizamos la distribución de los estereoisómeros de feofitina a y a' . Sorprendentemente, hallamos grandes diferencias de distribución según la enzima aplicada (véase la figura 48). Para BRA_CHL1 y TRI_CHL, el porcentaje de feofitina a cae a aproximadamente la mitad de la cantidad inicial, mientras que ARA_CHL2 y CB_CHL muestran una distribución que se puede comparar con la de la cantidad inicial y del control. La conservación de la distribución inicial de los estereoisómeros a lo largo de la reacción es una ventaja clara, ya que significa que la velocidad de reacción global no depende de la epimerización de la feofitina a' en a. Estos hallazgos también indican que ARA_CHL2 y CB_CHL no son muy sensibles a los grupos en C-13². Estas dos enzimas también muestran una actividad mucho mejor sobre la pirofeofitina, que tiene 2 átomos de hidrógeno en el C-13² (véase la figura 47).

Especificidad de sustrato en un ensayo *in vitro*

- 15 Se midió la actividad relativa de las enzimas anteriores sobre la feofitina y la pirofeofitina en un sistema de ensayo *in vitro*, p. ej., tal y como está descrito en la patente europea EP 10159327.5. En la tabla 4 se muestra la razón de la actividad de la feofitina por la pirofeofitina.

Tabla 4. Razón de la actividad de la feofitina por la pirofeofitina

| Enzima | Razón de la actividad de la feofitina por la pirofeofitina |
|----------|------------------------------------------------------------|
| SORG_CHL | 173 |
| ARA_CHL2 | 4 |
| CB_CHL | 4 |
| TRI_CHL | 45 |

- 20 Está claro que SORG_CHL tiene una actividad relativamente más baja sobre la pirofeofitina que TRI-CHL. CB_CHL y ARA2_CHL muestran una especificidad de sustrato diferente que es mucho mejor por la pirofeofitina. Estos hallazgos se correlacionan con lo que se muestra en las figuras 46 a 48.

Ejemplo 4

Actividad relativa de las clorofilasas sobre las feofitinas a y a'

La respuesta a la dosis de las clorofilasas en aceite de colza bruto se analizó de acuerdo con la receta de la tabla 5.

Tabla 5

| Unidades /g | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|--------------------------------------|----|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| Aceite de colza bruto n.º 11, AAK | | 100 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| agua | ml | 0,200 | 0,176 | 0,153 | 0,106 | 0,011 | 0,184 | 0,173 | 0,147 | 0,047 | 0,006 | 0,091 | 0,187 | 0,162 | 0,072 |
| CB_CHL CoRe 127- A . 2. 12 U/ml | ml | | 0,0236 | 0,0472 | 0,0943 | 0,1887 | | | | | 0,0943 | | | | |
| ARA_CHL CoRe 135 | ml | | | | | | 0,0160 | 0,0266 | 0,0532 | 0,0532 | | | | | |
| CoRe 137-A SORG_CHL | | | | | | | | | | | | | 0,0128 | 0,0385 | 0,1282 |
| Unidades/g de aceite | | 0,000 | 0,005 | 0,010 | 0,020 | 0,040 | 0,0015 | 0,003 | 0,005 | 0,005 | 0,020 | 0,050 | 0,001 | 0,003 | 0,010 |
| Agua | % | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 2,000 | 2,000 | 2,000 |
| Temperatura | °C | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 | 60 |
| pH | | 4,85 | 5,52 | 5,29 | 5,56 | 5,55 | 5,40 | 5,36 | 5,28 | 4,99 | 5,06 | 4,82 | 5,01 | 5,49 | 5,55 |

5 Se tomaron muestras después de 0,5, 2 y 4 horas de tiempo de reacción y se analizaron por HPLC-MS. Para comparar la actividad de las diferentes clorofilasas en los dos isómeros, la actividad enzimática sobre ambos isómeros se calculó a una concentración de sustrato que es la mitad de la concentración original. El logaritmo natural de la concentración del sustrato se representa gráficamente en función de la dosis de enzima (Unidades/g), tal y como se muestra en la figura 51 para la clorofilasa de *Arabidopsis* (ARA_CHL2).

Basándose en el gráfico de la figura 51, la actividad de la enzima sobre las feofitinas *a* y *a'* se calcula para la concentración de sustrato que es la mitad de la concentración original, tal y como se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Cálculo de la actividad de ARA_CHL2 sobre la feofitina *a* y la feofitina *a'*.

| | Feofitina <i>a'</i> | Feofitina <i>a'</i> | | Feofitina <i>a</i> | Feofitina <i>a</i> |
|------------------------|----------------------|---------------------|------------------------|----------------------|--------------------|
| | Unidades/g de aceite | Ln (sustrato µg/g) | | Unidades/g de aceite | Ln (sustrato µg/g) |
| | 0 | -0,203 | | 0 | 0,766 |
| | 0,0015 | -0,541 | | 0,0015 | 0,409 |
| | 0,0025 | -0,685 | | 0,0025 | 0,259 |
| Conc. 1/2 | | -0,896 | Conc. 1/2 | | 0,073 |
| | | | | | |
| Pendiente | | -195,3 | Pendiente | | -205,5 |
| Punto de corte | | -0,216 | Punto de corte | | 0,752 |
| Unidades por conc. 1/2 | | 0,003 | Unidades por conc. 1/2 | | 0,003 |
| Reciproc. µg/u | | 287,1 | Reciproc. µg/u | | 302,5 |
| Reciproc. µg/u/h | | 574,2 | Reciproc. µg/u/h | | 605,0 |

10 Basándose en la actividad enzimática a la mitad de la concentración original de sustrato, es posible comparar diferentes enzimas en las mismas condiciones. En la tabla 7 se comparan los resultados de dos clorofilasas diferentes.

Tabla 7. Actividad clorofilasa sobre los isómeros *a* y *a'* de la feofitina en aceite de ricino bruto

| | Feofitina <i>a'</i> | Feofitina <i>a</i> | Actividad relativa |
|--------------------|---------------------|--------------------|--------------------|
| Enzima | µg/unidad/h | µg/unidad/h | <i>a'/a</i> |
| ARA_CHL2, CoRe 135 | 574 | 605 | 0,95 |
| CB_CHL, CoRe 127-A | 141 | 343 | 0,41 |

15 Los resultados de la tabla 7 indican que ARA_CHL2 tiene casi la misma actividad sobre los isómeros *a* y *a'* de la feofitina. Esto concuerda con las observaciones de que la razón entre los dos isómeros no cambia durante la degradación enzimática con ARA_CHL2 (véase la figura 48). En cambio, CB_CHL también muestra una actividad hidrolítica significativa sobre la feofitina *a'*. Expresado en términos de las razones de actividad sobre la feofitina *a* en comparación con la feofitina *a'* (a saber, lo contrario de lo que se muestra en la tabla 7), ARA_CHL2 tiene una razón de actividad de 1,05 y CB_CHL tiene una razón de actividad de 2,44.

Conclusión

20 Hemos identificado 31 secuencias de clorofilasa y además las hemos clonado y expresado en *E. coli*, *B. subtilis* o *S. lividans*. Basándonos en la expresión en *E. coli*, hemos detectado actividad feofitinasa (tabla 2) en casi la mitad de las clorofilasas identificadas y todas ellas reaccionaron con el anticuerpo generado contra la TRI_CHL (figuras 44 y 45). En los extractos de proteínas sin actividad feofitinasa detectable, no pudimos detectar ninguna expresión de

enzima clorofilasa en las transferencias de tipo Western con el anticuerpo generado contra la TRI_CHL.

- 5 Cuando se analizan las clorofilasas candidatas en las aplicaciones con aceite, hallamos diferencias importantes con respecto a la especificidad por los sustratos feofitina y pirofeofitina. ARA_CHL2 y CB_CHL muestran una actividad mucho mejor sobre la pirofeofitina que las otras candidatas analizadas (figura 47). Para estas dos candidatas, también observamos que la razón de feofitina a por *a'* no cambió significativamente durante la incubación en los ensayos en aceite. Para las otras candidatas analizadas, observamos una clara disminución de esta razón durante la incubación. La actividad mejorada sobre la pirofeofitina para ARA_CHL2 y CB_CHL en el ensayo en aceite también se midió en el ensayo *in vitro* que utiliza la feofitina y la pirofeofitina como sustratos (tabla 4).

Análisis por HPLC

- 10 En los ejemplos en la presente memoria, los derivados de la clorofila podrían cuantificarse por lo general mediante el análisis por HPLC de acuerdo con el método que sigue. El análisis por HPLC se realiza con un método que se describe en términos generales en «Determination of chlorophylls and carotenoids by high-performance liquid chromatography during olive lactic fermentation», *Journal of Chromatography*, 585, 1991, 259-266.

- 15 La determinación de feofitina, feoforbida, pirofeofitina y pirofeoforbida se realiza por HPLC acoplada a un detector de matriz de fotodiodos. La columna empleada en el método está empaquetada con el material C18 y las clorofilas se separaron mediante elución en gradiente. Las concentraciones máximas se asignan con estándares de clorofila A y clorofila B de Sigma-Aldrich, p. ej., basándose en el cromatograma de HPLC representativo del *Journal of Chromatography*, 585, 1991, 259-266 que se muestra en la figura 49.

Listado de Secuencias

- 20 <110> Danisco A/S
 <120> Proceso
 <130> P042731WO
 <150> US 61/445665
 <151> 23-02-2011
- 25 <160> 41
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 324
 <212> PRT
- 30 <213> Arabidopsis thaliana
 <400> 1

ES 2 649 912 T3

Met Ala Ala Ile Glu Asp Ser Pro Thr Phe Ser Ser Val Val Thr Pro
 1 5 10 15

Ala Ala Phe Glu Ile Gly Ser Leu Pro Thr Thr Glu Ile Pro Val Asp
 20 25 30

Pro Val Glu Asn Asp Ser Thr Ala Pro Pro Lys Pro Val Arg Ile Thr
 35 40 45

Cys Pro Thr Val Ala Gly Thr Tyr Pro Val Val Leu Phe Phe His Gly
 50 55 60

Phe Tyr Leu Arg Asn Tyr Phe Tyr Ser Asp Val Leu Asn His Ile Ala
 65 70 75 80

Ser His Gly Tyr Ile Leu Val Ala Pro Gln Leu Cys Lys Leu Leu Pro
 85 90 95

Pro Gly Gly Gln Val Glu Val Asp Asp Ala Gly Ser Val Ile Asn Trp
 100 105 110

Ala Ser Glu Asn Leu Lys Ala His Leu Pro Thr Ser Val Asn Ala Asn
 115 120 125

Gly Lys Tyr Thr Ser Leu Val Gly His Ser Arg Gly Gly Lys Thr Ala
 130 135 140

Phe Ala Val Ala Leu Gly His Ala Ala Thr Leu Asp Pro Ser Ile Thr
 145 150 155 160

Phe Ser Ala Leu Ile Gly Ile Asp Pro Val Ala Gly Thr Asn Lys Tyr

ES 2 649 912 T3

165

170

175

Ile Arg Thr Asp Pro His Ile Leu Thr Tyr Lys Pro Glu Ser Phe Glu
180 185 190

Leu Asp Ile Pro Val Ala Val Val Gly Thr Gly Leu Gly Pro Lys Trp
195 200 205

Asn Asn Val Met Pro Pro Cys Ala Pro Thr Asp Leu Asn His Glu Glu
210 215 220

Phe Tyr Lys Glu Cys Lys Ala Thr Lys Ala His Phe Val Ala Ala Asp
225 230 235 240

Tyr Gly His Met Asp Met Leu Asp Asp Asp Leu Pro Gly Phe Val Gly
245 250 255

Phe Met Ala Gly Cys Met Cys Lys Asn Gly Gln Arg Lys Lys Ser Glu
260 265 270

Met Arg Ser Phe Val Gly Gly Ile Val Val Ala Phe Leu Lys Tyr Ser
275 280 285

Leu Trp Gly Glu Lys Ala Glu Ile Arg Leu Ile Val Lys Asp Pro Ser
290 295 300

Val Ser Pro Ala Lys Leu Asp Pro Ser Pro Glu Leu Glu Glu Ala Ser
305 310 315 320

Gly Ile Phe Val

<210> 2

<211> 318

<212> PRT

5 <213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Ser Ser Ser Ser Ser Arg Asn Ala Phe Glu Asp Gly Lys Tyr Lys
1 5 10 15

Ser Asn Leu Leu Thr Leu Asp Ser Ser Ser Arg Cys Cys Lys Ile Thr
20 25 30

Pro Ser Ser Arg Ala Ser Pro Ser Pro Pro Lys Gln Leu Leu Val Ala
35 40 45

Thr Pro Val Glu Glu Gly Asp Tyr Pro Val Val Met Leu Leu His Gly

ES 2 649 912 T3

Glu Asp Val Pro Val Glu Ile Gln Glu Phe Glu Val Ile Met
 305 310 315

<210> 3

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Citrus sinensis

<400> 3

Met Ala Ala Met Val Asp Ala Lys Pro Ala Ala Ser Val Gln Gly Thr
 1 5 10 15

Pro Leu Leu Ala Thr Ala Thr Leu Pro Val Phe Thr Arg Gly Ile Tyr
 20 25 30

Ser Thr Lys Arg Ile Thr Leu Glu Thr Ser Ser Pro Ser Ser Pro Pro
 35 40 45

Pro Pro Lys Pro Leu Ile Ile Val Thr Pro Ala Gly Lys Gly Thr Phe
 50 55 60

Asn Val Ile Leu Phe Leu His Gly Thr Ser Leu Ser Asn Lys Ser Tyr
 65 70 75 80

Ser Lys Ile Phe Asp His Ile Ala Ser His Gly Phe Ile Val Val Ala
 85 90 95

Pro Gln Leu Tyr Thr Ser Ile Pro Pro Pro Ser Ala Thr Asn Glu Leu
 100 105 110

Asn Ser Ala Ala Glu Val Ala Glu Trp Leu Pro Gln Gly Leu Gln Gln
 115 120 125

Asn Leu Pro Glu Asn Thr Glu Ala Asn Val Ser Leu Val Ala Val Met
 130 135 140

Gly His Ser Arg Gly Gly Gln Thr Ala Phe Ala Leu Ser Leu Arg Tyr
 145 150 155 160

Gly Phe Gly Ala Val Ile Gly Leu Asp Pro Val Ala Gly Thr Ser Lys
 165 170 175

Thr Thr Gly Leu Asp Pro Ser Ile Leu Ser Phe Asp Ser Phe Asp Phe
 180 185 190

Ser Ile Pro Val Thr Val Ile Gly Thr Gly Leu Gly Gly Val Ala Arg
 195 200 205

ES 2 649 912 T3

Cys Ile Thr Ala Cys Ala Pro Glu Gly Ala Asn His Glu Glu Phe Phe
 210 215 220

Asn Arg Cys Lys Asn Ser Ser Arg Ala His Phe Val Ala Thr Asp Tyr
 225 230 235 240

Gly His Met Asp Ile Leu Asp Asp Asn Pro Ser Asp Val Lys Ser Trp
 245 250 255

Ala Leu Ser Lys Tyr Phe Cys Lys Asn Gly Asn Glu Ser Arg Asp Pro
 260 265 270

Met Arg Arg Cys Val Ser Gly Ile Val Val Ala Phe Leu Lys Asp Phe
 275 280 285

Phe Tyr Gly Asp Ala Glu Asp Phe Arg Gln Ile Leu Lys Asp Pro Ser
 290 295 300

Phe Ala Pro Ile Lys Leu Asp Ser Val Glu Tyr Ile Asp Ala Ser Ser
 305 310 315 320

Met Leu Thr Thr Thr His Val Lys Val
 325

<210> 4

<211> 319

<212> PRT

5 <213> Triticum aestivum

<400> 4

Met Ala Ala Ala Ala Pro Ala Glu Thr Met Asn Lys Ser Ala Ala Gly
 1 5 10 15

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

Ala Val Glu Ala Ile Gln Val Asp Glu Asn Ala Ala Pro Thr Pro Pro
 35 40 45

Ile Pro Val Leu Ile Val Ala Pro Lys Asp Ala Gly Thr Tyr Pro Val
 50 55 60

Ala Met Leu Leu His Gly Phe Phe Leu His Asn His Phe Tyr Glu His
 65 70 75 80

Leu Leu Arg His Val Ala Ser His Gly Phe Ile Ile Val Ala Pro Gln
 85 90 95

ES 2 649 912 T3

Phe Ser Ile Ser Ile Ile Pro Ser Gly Asp Ala Glu Asp Ile Ala Ala
 100 105 110

Ala Ala Lys Val Ala Asp Trp Leu Pro Asp Gly Leu Pro Ser Val Leu
 115 120 125

Pro Lys Gly Val Glu Pro Glu Leu Ser Lys Leu Ala Leu Ala Gly His
 130 135 140

Ser Arg Gly Gly His Thr Ala Phe Ser Leu Ala Leu Gly His Ala Lys
 145 150 155 160

Thr Gln Leu Thr Phe Ser Ala Leu Ile Gly Leu Asp Pro Val Ala Gly
 165 170 175

Thr Gly Lys Ser Ser Gln Leu Gln Pro Lys Ile Leu Thr Tyr Glu Pro
 180 185 190

Ser Ser Phe Gly Met Ala Met Pro Val Leu Val Ile Gly Thr Gly Leu
 195 200 205

Gly Glu Glu Lys Lys Asn Ile Phe Phe Pro Pro Cys Ala Pro Lys Asp
 210 215 220

Val Asn His Ala Glu Phe Tyr Arg Glu Cys Arg Pro Pro Cys Tyr Tyr
 225 230 235 240

Phe Val Thr Lys Asp Tyr Gly His Leu Asp Met Leu Asp Asp Asp Ala
 245 250 255

Pro Lys Phe Ile Thr Cys Val Cys Lys Asp Gly Asn Gly Cys Lys Gly
 260 265 270

Lys Met Arg Arg Cys Val Ala Gly Ile Met Val Ala Phe Leu Asn Ala
 275 280 285

Ala Leu Gly Glu Lys Asp Ala Asp Leu Glu Ala Ile Leu Arg Asp Pro
 290 295 300

Ala Val Ala Pro Thr Thr Leu Asp Pro Val Glu His Arg Val Ala
 305 310 315

<210> 5

<211> 323

<212> PRT

5 <213> Triticum aestivum

<400> 5

ES 2 649 912 T3

Met Ala Ala Met Ala Thr Thr Val Phe Gln Ala Gly Pro Met Glu Val
1 5 10 15

Asp Val Lys His Val Asp Lys Ser Met Ile Pro Asn Leu Ala Arg Pro
20 25 30

Leu Met Val Val Ala Pro Lys Glu Thr Gly Ala Tyr Pro Val Ile Val
35 40 45

Phe Leu His Gly Trp Asn Met Leu Asn Ser Trp Tyr Glu Gln Leu Leu
50 55 60

Thr His Val Ala Ser His Gly Phe Ile Ala Val Ala Pro Gln Leu Tyr
65 70 75 80

Trp Met Val Ser Glu Pro Asp Ala Asp Asp Ile Asp Ala Thr Lys Arg
85 90 95

Ile Thr Asn Trp Leu Ala Asp His Asp Lys Gly Leu Ala His Val Leu
100 105 110

Lys Asp Val Leu Lys Leu Glu His Val Glu Pro Asp Leu Ser Lys Leu
115 120 125

Ala Leu Ala Gly His Ser Arg Gly Gly Gln Thr Ala Phe Ala Val Ala
130 135 140

Leu Gly Leu Gly Asp Ala Lys Thr Lys Leu Glu Leu Lys Phe Ser Ala
145 150 155 160

Leu Ile Gly Val Asp Pro Val Ala Gly Val Ser Arg Ala Gln Gln Leu
165 170 175

Glu Pro Lys Val Leu Thr Phe Glu Pro Asp Cys Leu Asp Val Gly Met
180 185 190

Pro Val Leu Val Met Gly Thr Gly Leu Gly Pro Lys His Ile Gly Gly
195 200 205

Phe Pro Cys Ala Pro Val Gly Val Asn His Ala Glu Phe Tyr Lys Glu
210 215 220

Cys Ala Pro Pro Arg Tyr His Leu Val Val Lys Asp Tyr Gly His Leu
225 230 235 240

Asp Met Leu Asp Asp Asn Val Pro Tyr Ile Ile Asn Asn Cys Met Cys
245 250 255

ES 2 649 912 T3

Met Arg Asn Gln His Asp Thr Lys Asp Leu Ala Arg Arg Thr Met Gly
260 265 270

Gly Ala Met Val Ala Phe Leu Arg Ala Lys Leu Arg Ile Asp Val Arg
275 280 285

Asp Leu Ile Ala Ile Tyr His Asn Pro Glu Ile Ala Pro Ala Val Leu
290 295 300

Asp Gln Val Asp Glu Phe Leu Pro Cys Phe Val Gly Arg Pro Asn Pro
305 310 315 320

Ser Ser Val

<210> 6

<211> 213

<212> PRT

5 <213> Brassica oleracea

<400> 6

Met Ser Pro Ser Phe Leu Phe Phe Thr Leu Phe Leu Ile Lys Glu Met
1 5 10 15

Ser Ser Ser Ser Ser Ala Asn Ser Phe Glu Asp Gly Lys Tyr Lys Thr
20 25 30

Asp Leu Leu Thr Val Gly Leu Ser Ser Cys Cys Trp Lys Lys Pro Ser
35 40 45

Ser Ser Pro Thr Pro Gln Ser Pro Pro Lys Arg Leu Leu Val Ala Thr
50 55 60

Pro Val Glu Glu Gly Glu Tyr Pro Val Val Met Leu Leu His Gly Tyr
65 70 75 80

Leu Leu Tyr Asn Ser Phe Tyr Ser Gln Leu Met Leu His Val Ser Ser
85 90 95

His Gly Phe Ile Val Ile Ala Pro Gln Leu Tyr Ser Ile Ala Gly Pro
100 105 110

Asp Thr Met Asp Glu Ile Lys Ser Thr Ala Glu Ile Ile Asp Trp Leu
115 120 125

Ser Val Gly Leu Asn His Phe Leu Pro Pro Gln Val Thr Pro Asn Leu
130 135 140

ES 2 649 912 T3

Ser Lys Phe Ala Leu Ser Gly His Ser Arg Gly Gly Lys Thr Ala Phe
145 150 155 160

Ala Leu Ala Leu Lys Lys Phe Gly Tyr Ser Ser Asp Leu Lys Ile Ser
165 170 175

Ala Leu Ile Gly Ile Asp Val Gly Thr Val Phe Trp Thr Asn Gly Tyr
180 185 190

Gly Gln Tyr Ser Gly Glu Phe Phe Glu Gln Phe Asp Cys Arg Asn Asp
195 200 205

Arg Ile Val Glu Ser
210

<210> 7

<211> 324

<212> PRT

5 <213> Brassica oleracea

<400> 7

Met Ala Gly Lys Glu Asp Ser Glu Thr Phe Phe Ser Ala Ala Thr Pro
1 5 10 15

Leu Ala Phe Glu Leu Gly Ser Leu Pro Thr Thr Val Ile Pro Ala Asp
20 25 30

Pro Ser Ala Thr Asp Leu Thr Ala Pro Pro Lys Pro Val Ile Ile Thr
35 40 45

Ser Pro Thr Val Ala Gly Thr Tyr Pro Val Val Leu Phe Phe His Gly
50 55 60

Phe Tyr Leu Arg Asn Tyr Phe Tyr Ser Asp Val Ile Asn His Val Ala
65 70 75 80

Ser His Gly Tyr Ile Val Val Ala Pro Gln Leu Cys Lys Ile Leu Pro
85 90 95

Pro Gly Gly Gln Val Glu Val Asp Asp Ala Gly Lys Val Ile Asn Trp
100 105 110

Thr Ser Lys Asn Leu Lys Ala His Leu Pro Ser Ser Val Asn Ala Asn
115 120 125

Gly Asn Tyr Thr Ala Leu Val Gly His Ser Arg Gly Gly Lys Thr Ala
130 135 140

ES 2 649 912 T3

Phe Ala Val Ala Leu Gly His Ala Ala Thr Leu Asp Pro Ser Ile Lys
145 150 155 160

Phe Ser Ala Leu Val Gly Ile Asp Pro Val Ala Gly Ile Ser Lys Cys
165 170 175

Ile Arg Thr Asp Pro Glu Ile Leu Thr Tyr Lys Pro Glu Ser Phe Asp
180 185 190

Leu Asp Met Pro Val Ala Val Ile Gly Thr Gly Leu Gly Pro Lys Ser
195 200 205

Asn Met Leu Met Pro Pro Cys Ala Pro Ala Glu Val Asn His Glu Glu
210 215 220

Phe Tyr Ile Glu Cys Lys Ala Thr Lys Gly His Phe Val Ala Ala Asp
225 230 235 240

Tyr Gly His Met Asp Met Leu Asp Asp Asn Leu Pro Gly Phe Val Gly
245 250 255

Phe Met Ala Gly Cys Met Cys Lys Asn Gly Lys Arg Lys Lys Ser Glu
260 265 270

Met Arg Ser Phe Val Gly Gly Ile Val Val Ala Phe Leu Lys Tyr Ser
275 280 285

Ile Trp Gly Glu Met Ser Glu Ile Arg Gln Ile Leu Lys Asp Pro Ser
290 295 300

Val Ser Pro Ala Arg Leu Asp Pro Ser Pro Glu Leu Glu Glu Ala Ser
305 310 315 320

Gly Tyr Leu Val

<210> 8

<211> 321

<212> PRT

5 <213> Brassica oleracea

<400> 8

Met Ser Ser Ser Ser Ser Arg Asn Ala Phe Val Asp Gly Lys Tyr Lys
1 5 10 15

Pro Asp Leu Leu Thr Val Asp Leu Ala Ser Arg Cys Arg Cys Tyr Lys
20 25 30

ES 2 649 912 T3

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

ES 2 649 912 T3

Met Ala Tyr Leu Glu Asp Asp Asp Cys Glu Leu Val Lys Ile Lys Ala
 290 295 300

Gly Cys His Glu Gly Val Pro Val Glu Ile Gln Glu Phe Glu Val Lys
 305 310 315 320

Lys

<210> 9

<211> 333

<212> PRT

5 <213> Zea mays

<400> 9

Met Ala Ala Ser Pro Val Ala Ile Gly Thr Ala Val Phe Gln Arg Gly
 1 5 10 15

Pro Leu Arg Val Glu Ala Arg His Val Asp Tyr Ser Gln Val Pro Ser
 20 25 30

Val Pro Lys Pro Leu Met Val Val Ala Pro Thr Asp Ala Gly Val Tyr
 35 40 45

Pro Val Ala Val Phe Leu His Gly Cys Asn Thr Val Asn Ser Trp Tyr
 50 55 60

Glu Ser Leu Leu Ser His Val Ala Ser His Gly Phe Ile Ala Val Ala
 65 70 75 80

Pro Gln Leu Tyr Cys Val Thr Leu Asn Met Asn Asp Leu Lys Asp Ile
 85 90 95

Asp Ala Thr Arg Gln Val Thr Ala Trp Leu Ala Asp Lys Gln Gln Gly
 100 105 110

Leu Ala His Val Leu Ala Asn Ile Leu Gln Leu His Gly Val Arg Pro
 115 120 125

Asp Leu Ser Arg Leu Ala Leu Ala Gly His Ser Arg Gly Gly Asp Thr
 130 135 140

Ala Phe Ala Val Ala Leu Gly Leu Gly Pro Ala Ala Ser Asp Asp Asp
 145 150 155 160

Asp Asn Asn Ala Asp Ala Gly Thr Ser Pro Ala Ala Leu Pro Leu Lys
 165 170 175

ES 2 649 912 T3

Phe Ser Ala Leu Ile Gly Val Asp Pro Val Ala Gly Leu Ser Lys Gln
 180 185 190

Ala Gln Val Glu Pro Lys Val Leu Thr Phe Arg Pro Arg Ser Leu Asp
 195 200 205

Pro Gly Met Pro Ala Leu Val Val Gly Thr Gly Leu Gly Pro Lys His
 210 215 220

Val Gly Gly Pro Pro Cys Ala Pro Ala Gly Val Asn His Ala Glu Phe
 225 230 235 240

Tyr Asp Glu Cys Ala Pro Pro Arg Tyr His Val Val Leu Arg Asp Tyr
 245 250 255

Gly His Met Asp Met Leu Asp Asp Asp Gly Val Pro Tyr Val Ile Asn
 260 265 270

Asn Cys Met Cys Met Arg Asn Thr Lys Asp Thr Lys Asp Leu Ala Arg
 275 280 285

Arg Ala Ile Gly Gly Ala Val Val Ala Phe Leu Arg Ala Thr Leu Glu
 290 295 300

Asp Asp Asp Glu Asp Leu Lys Val Val Leu Glu Asn Arg Pro Gly Leu
 305 310 315 320

Ser Pro Ala Val Leu Asp Pro Val Gly His Asp Leu Ala
 325 330

<210> 10
 <211> 346
 <212> PRT
 5 <213> Zea mays

<400> 10

Met Asn Leu Ala Ser Ala Val Arg Val Phe Leu Ser Tyr Cys Leu Leu
 1 5 10 15

Leu His Arg Trp Met Gly Ser Glu Gln Ala Gly Gly Val Phe Asp Gln
 20 25 30

Gly Gly His Ser Val Ser Leu Thr Arg Leu Asp Glu Ala Arg Ala Pro
 35 40 45

Pro Arg Cys Ala Val Gln Ser Ser Leu Ser Ser Ala Ala Ser Leu Pro
 50 55 60

ES 2 649 912 T3

Pro Lys Pro Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Glu Thr Gly Glu Tyr Pro
 65 70 75 80
 Val Ile Leu Phe Leu His Gly Tyr Leu Ala Val Asn Ser Phe Tyr Ser
 85 90 95
 Gln Leu Phe Glu His Val Ala Ser His Gly Phe Ile Val Val Gly Pro
 100 105 110
 Gln Leu Tyr Thr Ile Ser Gly Ala Asp Thr Thr Glu Glu Ile Asn Ser
 115 120 125
 Ala Ala Ala Val Ile Asp Trp Leu Ala Thr Gly Leu Pro Ser Thr Leu
 130 135 140
 Pro Leu Gly Val Arg Ala Asp Leu Thr Lys Val Ser Ile Ser Gly His
 145 150 155 160
 Ser Arg Gly Gly Lys Val Ala Phe Ala Leu Ala Leu Gly His Ala Lys
 165 170 175
 Ala Lys Leu Ala Val Pro Leu Ala Ala Val Val Ala Val Asp Pro Val
 180 185 190
 Asp Gly Met Gly Val Gly Lys Gln Thr Pro Pro Pro Ile Leu Thr Gly
 195 200 205
 Arg His Gly Ser Leu His Val Gly Ala Pro Thr Met Val Ile Gly Thr
 210 215 220
 Gly Leu Gly Glu Leu Pro Arg Gly Ser Leu Leu Pro Pro Cys Ala Pro
 225 230 235 240
 Arg Gly Val Ser His Ala Ala Phe Tyr Asp Glu Leu Asp Gly Ala Ala
 245 250 255
 Pro Ala Cys His Leu Val Ala Arg Asp Tyr Gly His Thr Asp Met Met
 260 265 270
 Asp Asp Asp Thr Pro Gly Ala Arg Gly Met Leu Thr Arg Thr Ile Cys
 275 280 285
 Arg Ser Gly Gly Ala Arg Ala Pro Met Arg Arg Phe Val Ala Gly Ala
 290 295 300
 Thr Val Ala Phe Leu Lys Lys Trp Val Ala Gly Asp Ala Ala Ala Met

ES 2 649 912 T3

180 185 190

Pro Val Leu Val Ile Gly Thr Gly Leu Gly Glu Glu Lys Lys Asn Val
195 200 205

Leu Phe Pro Pro Cys Ala Pro Lys Asp Val Asn His Arg Glu Phe Tyr
210 215 220

Tyr Glu Cys Lys Pro Pro Cys Tyr Tyr Phe Val Thr Lys Asp Tyr Gly
225 230 235 240

His Leu Asp Met Leu Asp Asp Asp Ala Pro Lys Phe Ile Thr Cys Leu
245 250 255

Cys Lys Asp Gly Asp Asn Cys Lys Asp Lys Met Arg Arg Ala Val Ala
260 265 270

Gly Ile Met Ile Ala Phe Leu Arg Ala Val Leu Asp Glu Lys Asp Gly
275 280 285

Asp Ile Lys Val Ile Leu Lys Asp Pro Gly Leu Ala Pro Val Thr Leu
290 295 300

Asp Pro Val Glu Cys Arg Leu Pro
305 310

<210> 12
<211> 347
<212> PRT
5 <213> Chenopodium album

<400> 12

Met Ala Lys Leu Leu Leu Leu Ile Phe Gly Val Phe Ile Phe Val Asn
1 5 10 15

Ser Gln Ala Gln Thr Phe Pro Thr Ile Leu Glu Lys His Asn Ser Glu
20 25 30

Lys Ile Thr Asp Val Phe His Lys Gly Asn Phe Gln Val Thr Asn Asn
35 40 45

Pro Ile Arg Val Lys Arg Tyr Glu Phe Ser Ala Pro Glu Pro Leu Ile
50 55 60

Ile Ile Ser Pro Lys Glu Ala Gly Val Tyr Pro Val Leu Leu Phe Ile
65 70 75 80

His Gly Thr Met Leu Ser Asn Glu Asp Tyr Ser Leu Phe Phe Asn Tyr

ES 2 649 912 T3

Asn Phe Gly Phe Ala Thr Thr Tyr Ala Gln Leu
 340 345

<210> 13

<211> 313

<212> PRT

5 <213> Ricinus communis

<400> 13

Met Ser Ser Ser Cys Ala Thr Val Thr Asn Val Tyr Glu Asn Gly Lys
 1 5 10 15

Tyr Thr Thr Val Val Ala Lys Ile Glu Ser Gly Ser Cys Ala Arg Ser
 20 25 30

Ser Leu Pro Leu Pro Leu Pro Pro Lys Pro Leu Leu Ile Ala Met Pro
 35 40 45

Ser Glu Ala Gly Glu Phe Pro Val Leu Ile Phe Leu His Gly Tyr Leu
 50 55 60

Leu Tyr Asn Ser Phe Tyr Ser Leu Leu Ile Gln His Val Ala Ser His
 65 70 75 80

Gly Phe Ile Val Ile Ala Pro Gln Leu Tyr Thr Val Ala Gly Ala Asp
 85 90 95

Ser Ala Asp Glu Ile Lys Cys Thr Ala Ala Ile Thr Asn Trp Leu Ser
 100 105 110

Lys Gly Leu His His Val Leu Pro Pro His Val Gln Pro Lys Leu Ser
 115 120 125

Lys Leu Gly Leu Ala Gly His Ser Arg Gly Gly Lys Ala Ala Phe Ala
 130 135 140

Leu Ala Leu Gln Lys Ala Gly Ile Ser Thr Ala Leu Lys Phe Ser Ala
 145 150 155 160

Leu Ile Gly Val Asp Pro Val Asp Gly Met Asp Lys Gly Lys Gln Thr
 165 170 175

Pro Pro Pro Val Leu Thr Tyr Thr Pro His Ser Phe Asp Leu Asp Met
 180 185 190

Ala Ala Met Val Ile Gly Ser Gly Leu Gly Glu Val Lys Arg Asn Pro
 195 200 205

ES 2 649 912 T3

Met Phe Pro Pro Cys Ala Pro Lys Gly Val Asn His Glu Asp Phe Phe
 210 215 220

Lys Glu Cys Lys Lys Pro Ala Tyr Tyr Phe Val Val Lys Asp Tyr Gly
 225 230 235 240

His Leu Asp Met Leu Asp Asp Asp Thr Asn Gly Ile Arg Gly Lys Ala
 245 250 255

Thr Tyr Cys Leu Cys Val Asn Gly Lys Ser Arg Glu Pro Met Arg Arg
 260 265 270

Phe Val Gly Gly Val Leu Val Ala Phe Leu Lys Ala Tyr Leu Gly Gly
 275 280 285

Asp Ser Ser Asp Leu Met Thr Ile Thr Asp Gly Gln Thr Gly Pro Val
 290 295 300

Glu Leu Gln Ala Ala Glu Cys Tyr Val
 305 310

<210> 14
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Glycine max

5

<400> 14

Met Ala Gln Arg Ala Gln Pro Ala Leu Ala Thr Thr Asp Val Phe Gln
 1 5 10 15

Lys Gly Asp Ile His Trp Lys Gln Phe Asn Val Glu Thr Ser Thr Ala
 20 25 30

Ser Ser Ser Pro Pro Lys Pro Leu Leu Ile Phe Thr Pro Thr Val Pro
 35 40 45

Gly Leu Tyr Pro Val Ile Leu Phe Cys His Gly Phe Cys Ile Arg Thr
 50 55 60

Ser Tyr Tyr Ser Lys Leu Leu Ala His Ile Val Ser His Gly Phe Ile
 65 70 75 80

Leu Val Ala Pro Gln Leu Phe Ser Ile Gly Val Pro Met Phe Gly Pro
 85 90 95

Glu Glu Val Lys Cys Glu Gly Arg Val Val Asp Trp Leu Asp Asn Gly
 100 105 110

ES 2 649 912 T3

Leu Gln Pro Leu Leu Pro Glu Ser Val Glu Ala Lys Leu Glu Lys Leu
 115 120 125

Val Leu Val Gly His Ser Lys Gly Gly Lys Thr Ala Phe Ala Val Ala
 130 135 140

Leu Gly Tyr Cys Lys Thr Lys Leu Lys Phe Ser Ala Leu Ile Gly Ile
 145 150 155 160

Asp Pro Val Ala Gly Val Ser Lys Cys Lys Pro Cys Arg Ser Leu Pro
 165 170 175

Asp Ile Leu Thr Gly Val Pro Arg Ser Phe Asn Leu Asn Ile Pro Val
 180 185 190

Ala Val Ile Gly Thr Gly Leu Gly Pro Glu Lys Ala Asn Ser Leu Phe
 195 200 205

Pro Pro Cys Ala Pro Asn Gly Val Asn His Lys Glu Phe Phe Ser Glu
 210 215 220

Cys Lys Pro Pro Ser Ala Tyr Phe Val Ala Thr Asp Tyr Gly His Met
 225 230 235 240

Asp Met Leu Asp Asp Glu Thr Pro Gly Val Ile Gly Thr Met Met Ser
 245 250 255

Lys Cys Met Cys Lys Asn Gly Lys Lys Gly Pro Arg Asp Leu Met Arg
 260 265 270

Arg Thr Val Gly Gly Leu Val Val Ala Phe Leu Arg Ala Gln Leu Asn
 275 280 285

Glu Gln Trp Lys Asp Phe Asp Ala Ile Leu Ala Ser Pro Asn Leu Ala
 290 295 300

Pro Ala Lys Leu Asp Asp Val Arg Tyr Leu Pro Thr
 305 310 315

<210> 15

<211> 342

<212> PRT

5 <213> Ginkgo biloba

<400> 15

Met Val Leu Val Lys Asp Val Phe Ser Glu Gly Pro Leu Pro Val Gln
 1 5 10 15

ES 2 649 912 T3

Ile Leu Ala Ile Pro Gln Ala Asn Ser Ser Pro Cys Ser Lys Leu Ala
 20 25 30

Asp Lys Asn Gly Thr Ala Thr Thr Pro Ser Pro Cys Arg Pro Pro Lys
 35 40 45

Pro Leu Leu Ile Ala Leu Pro Ser Gln His Gly Asp Tyr Pro Leu Ile
 50 55 60

Leu Phe Phe His Gly Tyr Val Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Ser Gln Leu
 65 70 75 80

Leu Arg His Val Ala Ser His Gly Tyr Ile Ala Ile Ala Pro Gln Met
 85 90 95

Tyr Ser Val Ile Gly Pro Asn Thr Thr Pro Glu Ile Ala Asp Ala Ala
 100 105 110

Ala Ile Thr Asp Trp Leu Arg Asp Gly Leu Ser Asp Asn Leu Pro Gln
 115 120 125

Ala Leu Asn Asn His Val Arg Pro Asn Phe Glu Lys Phe Val Leu Ala
 130 135 140

Gly His Ser Arg Gly Gly Lys Val Ala Phe Ala Leu Ala Leu Gly Arg
 145 150 155 160

Val Ser Gln Pro Ser Leu Lys Tyr Ser Ala Leu Val Gly Leu Asp Pro
 165 170 175

Val Asp Gly Met Gly Lys Asp Gln Gln Thr Ser His Pro Ile Leu Ser
 180 185 190

Tyr Arg Glu His Ser Phe Asp Leu Gly Met Pro Thr Leu Val Val Gly
 195 200 205

Ser Gly Leu Gly Pro Cys Lys Arg Asn Pro Leu Phe Pro Pro Cys Ala
 210 215 220

Pro Gln Gly Val Asn His His Asp Phe Phe Tyr Glu Cys Val Ala Pro
 225 230 235 240

Ala Tyr His Phe Val Ala Ser Asp Tyr Gly His Leu Asp Phe Leu Asp
 245 250 255

Asp Asp Thr Lys Gly Ile Arg Gly Lys Ala Thr Tyr Cys Leu Cys Lys
 260 265 270

ES 2 649 912 T3

Asn Gly Glu Ala Arg Glu Pro Met Arg Lys Phe Ser Gly Gly Ile Val
 275 280 285

Val Ala Phe Leu Gln Ala Phe Leu Gly Asp Asn Arg Gly Ala Leu Asn
 290 295 300

Asp Ile Met Val Tyr Pro Ser His Ala Pro Val Lys Ile Glu Pro Pro
 305 310 315 320

Glu Ser Leu Val Thr Glu Asp Val Lys Ser Pro Glu Val Glu Leu Leu
 325 330 335

Arg Arg Ala Val Cys Arg
 340

<210> 16

<211> 313

<212> PRT

5 <213> Pachira macrocarpa

<400> 16

Met Ala Gln Leu Leu Glu Thr Lys His Asp Leu Ser Thr Val Val Pro
 1 5 10 15

Val Phe Val Thr Gly Lys Tyr His Pro Thr Ser Val Ser Val Asp Pro
 20 25 30

Ser Asn Ser Ser Pro Ser Ser Pro Pro Lys Pro Leu Leu Ile Phe Thr
 35 40 45

Pro Ser Glu Gln Gly Thr Tyr Pro Val Ile Leu Phe Phe His Gly Phe
 50 55 60

Tyr Leu Arg Asn Asn Phe Tyr Thr Gly Leu Leu Leu His Ile Ser Ser
 65 70 75 80

His Gly Phe Ile Ile Val Ala Pro Gln Leu Ser Asn Ile Ile Pro Pro
 85 90 95

Ser Gly Thr Glu Glu Val Glu His Ala Ala Lys Val Ala Asp Trp Leu
 100 105 110

Pro Ser Gly Leu Pro Ser Val Leu Pro Gly Asn Val Glu Ala Asn Leu
 115 120 125

Ala Lys Leu Ala Leu Val Gly His Ser Arg Gly Gly Lys Thr Ala Phe
 130 135 140

ES 2 649 912 T3

Ala Leu Ala Leu Gly Arg Ala Lys Thr Ala Gln Asn Phe Ser Ala Leu
145 150 155 160

Val Gly Ile Asp Pro Val Ala Gly Asn Arg Phe Gly Glu Thr Ser Pro
165 170 175

Lys Ile Leu Thr Tyr Thr Pro Gly Ser Phe Asp Leu Ser Ile Pro Val
180 185 190

Ala Val Val Gly Thr Gly Leu Gly Pro Glu Ser Lys Gly Cys Met Pro
195 200 205

Cys Pro Cys Ala Pro Thr Gln Tyr Asn His Glu Glu Phe Phe Asn Glu
210 215 220

Cys Lys Pro Pro Arg Val His Phe Asp Ala Lys Asn Tyr Gly His Met
225 230 235 240

Asp Thr Leu Asp Asp Asn Pro Ser Gly Phe Ile Gly Lys Leu Ser Asp
245 250 255

Thr Ile Cys Val Asn Gly Glu Gly Pro Arg Asp Pro Met Arg Arg Cys
260 265 270

Val Gly Gly Ile Val Val Ala Phe Leu Asn Tyr Phe Phe Glu Ala Glu
275 280 285

Lys Glu Asp Phe Met Thr Ile Met Asn Glu Pro Tyr Val Ala Pro Val
290 295 300

Thr Leu Asp Gln Val Gln Phe Asn Val
305 310

<210> 17

<211> 318

<212> PRT

5 <213> Populus trichocarpa

<400> 17

Met Ser Ser Ser Ser Ala Ile Ala Thr Val Thr Thr Thr Val Phe Glu
1 5 10 15

Ala Gly Lys Tyr Thr Thr Val Leu Gln Lys Val Glu Ser Arg Thr Thr
20 25 30

Cys Cys Thr Ala Lys Thr Ser Pro Pro Leu Pro Val Pro Pro Pro Lys
35 40 45

ES 2 649 912 T3

Pro Leu Leu Ile Val Met Pro Cys Glu Ala Gly Glu Phe Pro Leu Leu
 50 55 60

Val Phe Leu His Gly Tyr Leu Leu Tyr Asn Ser Phe Tyr Ser Gln Leu
 65 70 75 80

Leu Gln His Ile Ala Ser His Gly Phe Ile Val Ile Ala Pro Gln Leu
 85 90 95

Tyr Leu Val Ala Gly Gln Asp Ser Ser Asp Glu Ile Lys Ser Val Ala
 100 105 110

Ala Thr Thr Asn Trp Leu Ser Glu Gly Leu His His Leu Leu Pro Pro
 115 120 125

His Val Lys Pro Asn Leu Ser Lys Leu Gly Leu Ala Gly His Ser Arg
 130 135 140

Gly Gly Lys Thr Ala Phe Ala Leu Ala Leu Glu Lys Ala Ala Ala Thr
 145 150 155 160

Leu Lys Phe Ser Ala Leu Ile Gly Val Asp Pro Val Asp Gly Met Asp
 165 170 175

Lys Gly Lys Gln Thr Pro Pro Pro Val Leu Thr Tyr Val Pro His Ser
 180 185 190

Phe Asp Leu Asp Met Ala Ile Met Val Ile Gly Ser Gly Leu Gly Glu
 195 200 205

Leu Lys Lys Asn Pro Leu Phe Pro Pro Cys Ala Pro Glu Gly Val Asn
 210 215 220

His Lys Asp Phe Phe Lys Glu Cys Lys Gly Pro Ala Ser Tyr Phe Val
 225 230 235 240

Val Lys Asp Tyr Gly His Leu Asp Met Leu Asp Asp Asp Thr Glu Gly
 245 250 255

Ile Arg Gly Lys Thr Thr Tyr Cys Leu Cys Lys Asn Gly Lys Ser Arg
 260 265 270

Glu Pro Met Arg Lys Phe Ile Gly Gly Val Val Val Ala Phe Met Lys
 275 280 285

Ala Tyr Leu Gly Gly Asp Ser Ser Asp Leu Met Ala Ile Lys Gly Gly
 290 295 300

ES 2 649 912 T3

Gln Thr Gly Pro Val Glu Leu Gln Thr Val Glu Tyr Ile Leu
 305 310 315

<210> 18
 <211> 318
 <212> PRT
 5 <213> Sorghum bicolor

<400> 18

Met Ala Thr Thr Pro Lys Val Leu Glu Glu Pro Pro Ser Ala Val Ile
 1 5 10 15

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

Glu His Asp Ala Arg Pro Thr Pro Pro Pro Ile Pro Ile Leu Ile Ala
 35 40 45

Ala Pro Lys Asp Ala Gly Thr Tyr Pro Val Ala Ile Leu Leu His Gly
 50 55 60

Phe Phe Leu Gln Asn Arg Tyr Tyr Glu Gln Leu Leu Lys His Val Ala
 65 70 75 80

Ser Phe Gly Phe Ile Met Val Ala Pro Gln Phe His Thr Ser Leu Ile
 85 90 95

Ser Asn Ser Asp Ala Asp Asp Ile Ala Ala Ala Ala Lys Val Thr Asp
 100 105 110

Trp Leu Pro Glu Gly Leu Pro Thr Val Leu Pro Thr Gly Val Glu Ala
 115 120 125

Asp Leu Ser Lys Leu Ala Leu Ala Gly His Ser Arg Gly Gly His Thr
 130 135 140

Ala Phe Ser Leu Ala Leu Gly Tyr Ala Lys Thr Asn Thr Ser Ser Leu
 145 150 155 160

Leu Lys Phe Ser Ala Leu Ile Gly Leu Asp Pro Val Ala Gly Thr Gly
 165 170 175

Lys Asn Ser Gln Leu Pro Pro Ala Ile Leu Thr Tyr Glu Pro Ser Ser
 180 185 190

Phe Asp Ile Ala Val Pro Val Leu Val Ile Gly Thr Gly Leu Gly Asp
 195 200 205

ES 2 649 912 T3

Glu Arg Glu Asn Ala Leu Phe Pro Pro Cys Ala Pro Val Glu Val Asn
 210 215 220

His Ala Glu Phe Tyr Arg Glu Cys Arg Ala Pro Cys Tyr His Leu Val
 225 230 235 240

Thr Lys Asp Tyr Gly His Leu Asp Met Leu Asp Asp Asp Ala Pro Lys
 245 250 255

Leu Val Thr Cys Leu Cys Lys Glu Gly Asn Thr Cys Lys Asp Val Met
 260 265 270

Arg Arg Thr Val Ala Gly Ile Met Val Ala Phe Leu Lys Ala Val Met
 275 280 285

Gly Glu Asp Glu Asp Gly Asp Leu Lys Ala Ile Leu Gln His Pro Gly
 290 295 300

Leu Ala Pro Thr Ile Leu Asp Pro Val Glu Tyr Arg Leu Ala
 305 310 315

<210> 19
 <211> 338
 <212> PRT
 5 <213> Sorghum bicolor

<400> 19

Met Ala Ser Pro Val Ala Ile Ser Thr Thr Ala Val Phe Lys Arg Gly
 1 5 10 15

Arg His Pro Val Asp Thr Lys His Val Asp His Ser Gln Val Pro Gly
 20 25 30

Val Pro Lys Pro Leu Met Val Val Thr Pro Thr Asp Ala Gly Val Tyr
 35 40 45

Pro Val Ala Val Phe Leu His Gly Cys Ser Met Tyr Asn Ser Trp Tyr
 50 55 60

Gln Thr Leu Leu Ser His Val Ala Ser His Gly Phe Ile Ala Val Ala
 65 70 75 80

Pro Gln Leu Gly Gly Ile Leu Pro Pro Leu Asp Met Lys Asp Leu Lys
 85 90 95

Asp Ile Asp Ala Thr Arg Lys Val Thr Ala Trp Leu Ala Asp Asn Leu
 100 105 110

ES 2 649 912 T3

Ala His Val Leu Thr Asn Ile Leu His Leu His Gly Val Thr Pro Asp
 115 120 125

Leu Ser Arg Leu Ala Leu Ala Gly His Ser Arg Gly Gly Asp Thr Ala
 130 135 140

Phe Ala Val Ala Leu Gly Leu Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser Asp Thr
 145 150 155 160

Thr Pro Leu Lys Phe Ser Ala Leu Ile Gly Val Asp Pro Val Ala Gly
 165 170 175

Leu Ser Lys Glu Leu Gln Leu Glu Pro Lys Val Leu Thr Phe Glu Pro
 180 185 190

Arg Ser Leu Asp Pro Gly Met Pro Ala Leu Val Val Gly Thr Gly Leu
 195 200 205

Gly Pro Lys Gly Leu Leu Pro Cys Ala Pro Ala Gly Val Ser His Gly
 210 215 220

Glu Phe Tyr Asp Glu Cys Ala Pro Pro Arg Tyr His Val Val Val Arg
 225 230 235 240

Asp Tyr Gly His Leu Asp Met Leu Asp Asp Asp Gly Val Pro Tyr Val
 245 250 255

Ile Ser Asn Cys Met Cys Lys Arg Asn Thr Asn Thr Thr Lys Asp Leu
 260 265 270

Ala Arg Arg Ala Ile Gly Gly Ala Met Val Ala Phe Leu Arg Ala Lys
 275 280 285

Leu Glu Asp Asp Asp Glu Asp Leu Arg Ala Val Leu Gln Asn Ser Pro
 290 295 300

Gly Leu Ser Pro Ala Val Leu Asp Pro Val Glu Tyr Asp Asp Asp Glu
 305 310 315 320

Ala Met Asp Gly Pro Gly Cys Ala Gly Asn Asn Gly Val Ala Gly Ala
 325 330 335

Ser Gly

<210> 20

<211> 319

<212> PRT

<213> Vitis vinifera

ES 2 649 912 T3

<400> 20

Met Ala Leu Leu Gly Gly Asn Pro Ser Thr Gln Gly Ile Lys Leu Asp
1 5 10 15

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

Cys Ile Arg Val Glu Thr Ser Asn Ile Ala Ser Pro Pro Lys Pro Leu
35 40 45

Leu Ile Val Thr Pro Thr Ile Gln Gly Thr Tyr Pro Val Leu Leu Phe
50 55 60

Leu His Gly Phe Glu Leu Arg Asn Thr Phe Tyr Thr Gln Leu Leu Gln
65 70 75 80

Leu Ile Ser Ser His Gly Tyr Ile Val Val Ala Pro Gln Leu Tyr Gly
85 90 95

Leu Leu Pro Pro Ser Gly Ile Gln Glu Ile Lys Ser Ala Ala Ala Val
100 105 110

Thr Asn Trp Leu Ser Ser Gly Leu Gln Ser Val Leu Pro Glu Asn Val
115 120 125

Lys Pro Asp Leu Leu Lys Leu Ala Leu Ser Gly His Ser Arg Gly Gly
130 135 140

Lys Thr Ala Phe Ala Leu Ala Leu Gly Tyr Ala Asp Thr Ser Leu Asn
145 150 155 160

Phe Ser Ala Leu Leu Gly Leu Asp Pro Val Gly Gly Leu Ser Lys Cys
165 170 175

Ser Gln Thr Val Pro Lys Ile Leu Thr Tyr Val Pro His Ser Phe Asn
180 185 190

Leu Ala Ile Pro Val Cys Val Ile Gly Thr Gly Leu Gly Asp Glu Pro
195 200 205

Arg Asn Cys Leu Thr Cys Pro Cys Ala Pro Asp Gly Val Asn His Val
210 215 220

Glu Phe Phe Ser Glu Cys Lys Pro Pro Cys Ser His Phe Val Thr Thr

ES 2 649 912 T3

130 135 140

Val Gly His Ser Arg Gly Ala Lys Val Val Phe Gly Leu Ala Leu Gly
 145 150 155 160

Val Arg Asn Ser Ile Leu Gln Tyr Ser Ala Val Val Gly Leu Asp Pro
 165 170 175

Val Asp Gly Met Gly Ile Gly Gln Gln Thr Asn Pro Pro Ile Leu Gln
 180 185 190

Phe Ser Glu Gly Ser Leu Asn Leu Gly Val Pro Thr Leu Ile Ile Gly
 195 200 205

Thr Gly Leu Gly Pro Leu Arg Lys Asn Phe Leu Phe Pro Ala Cys Ala
 210 215 220

Pro Ala Gly Val Ser His Glu Ala Phe Tyr Tyr Asp Ser Ala Ala Pro
 225 230 235 240

Ala Phe His Phe Val Ala Ser Lys Gln Gly His Met Asp Phe Leu Asn
 245 250 255

Asp Asp Cys Ser Gly Pro Thr Gly Met Phe Ser Tyr Cys Leu Cys Lys
 260 265 270

Asn Gly Pro Thr Arg Lys Pro Met Arg Arg Phe Ser Gly Gly Met Val
 275 280 285

Val Ala Phe Leu Arg Ala Ala Phe Phe Gly Glu Thr Ala Pro Leu Val
 290 295 300

Ala Ala Leu Ala Thr Pro Glu Leu Ala Pro Ile Pro Leu Asp Arg Pro
 305 310 315 320

Glu Phe Lys Gly Lys Leu Gly Asp Ala Phe Asn Lys Pro Met Leu Ala
 325 330 335

Pro Ala Leu Thr Pro
 340

<210> 22
 <211> 280
 <212> PRT
 <213> Aquilegia sp.

5

<400> 22

Met Thr Thr Ser Leu Pro Pro Pro Lys Pro Leu Leu Ile Ala Thr Pro

ES 2 649 912 T3

Arg Asp Leu Met Ala Ile Lys Glu Thr Gln Gly Met Ala Leu Ile Glu
 260 265 270

Leu Gln Ser Val Glu Phe Arg Leu
 275 280

<210> 23

<211> 324

<212> PRT

5 <213> Brachypodium distachyon

<400> 23

Met Ala Ala Thr Ala Ala Ala Ala Glu Leu Lys Lys Asn Ser Gly Ala
 1 5 10 15

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

Ala Val Glu Val Ile Gln Val Asp His Asn Ala Val Pro Thr Pro Pro
 35 40 45

Ile Pro Val Leu Ile Val Ala Pro Lys Asp Ala Gly Thr Tyr Pro Val
 50 55 60

Ala Met Leu Leu His Gly Phe Phe Leu Gln Asn His Tyr Tyr Lys Gln
 65 70 75 80

Leu Leu Arg His Val Ala Ser His Gly Phe Ile Met Val Ala Pro Gln
 85 90 95

Phe His Leu Ser Met Ile Pro Thr Gly Asp Thr Lys Asp Ile Glu Ala
 100 105 110

Ala Ala Lys Val Ser Asp Trp Leu Pro Glu Gly Leu Pro Ser Val Leu
 115 120 125

Pro Lys Gly Val Glu Pro Glu Leu Ser Lys Leu Ala Leu Ala Gly His
 130 135 140

Ser Arg Gly Gly His Thr Ala Phe Ser Leu Ala Leu Gly His Ala Lys
 145 150 155 160

Ser Asn Leu Ser Phe Ser Ala Leu Ile Gly Ile Asp Pro Val Ala Gly
 165 170 175

Thr Gly Lys Ser Ser Gln Leu Ala Pro Lys Ile Leu Thr Tyr Glu Pro
 180 185 190

ES 2 649 912 T3

Ser Ser Phe Asn Met Ser Ala Ala Met Pro Val Leu Val Ile Gly Thr
 195 200 205

Gly Leu Gly Glu Glu Lys Lys Asn Ile Phe Thr Pro Pro Cys Ala Pro
 210 215 220

Lys Asp Val Asn His Arg Glu Phe Tyr Leu Glu Cys Lys Pro Pro Cys
 225 230 235 240

Tyr Tyr Phe Val Thr Lys Asp Tyr Gly His Leu Asp Met Leu Asp Asp
 245 250 255

Asp Ala Pro Met Val Ile Thr Cys Leu Cys Lys Asp Gly Gly Ser Cys
 260 265 270

Lys Asp Lys Met Arg Arg Cys Val Ala Gly Ile Met Val Ala Phe Leu
 275 280 285

Asn Ser Ala Leu Gly Gly Lys Asp Asn Ala Ala His Asp Leu Glu Val
 290 295 300

Ile Val Lys Asp Pro Ala Leu Ala Pro Thr Thr Leu Asp Pro Val Glu
 305 310 315 320

Cys Arg Leu Glu

<210> 24

<211> 306

<212> PRT

5 <213> Medicago truncatula

<400> 24

Met Cys Ser Ser Val Ser Asn Val Phe Glu Thr Gly Asn Tyr Thr Thr
 1 5 10 15

Lys Leu Leu Arg Val Asp Ser Cys Ser His Ala Gln Asn Val Pro Pro
 20 25 30

Pro Lys Ser Leu Leu Ile Ala Thr Pro Ile Glu Gly Gly Glu Phe Pro
 35 40 45

Leu Leu Leu Phe Leu His Gly Tyr Leu Leu Leu Asn Ser Phe Tyr Ser
 50 55 60

Gln Leu Ile Gln His Val Ala Ser His Gly Phe Ile Val Ile Ala Pro
 65 70 75 80

ES 2 649 912 T3

Gln Leu Tyr Thr Val Ala Gly Pro Asp Ile Thr Glu Glu Ile Tyr Ser
85 90 95

Val Ala Ala Ile Thr Asn Trp Leu Ser Lys Gly Leu Ser Lys Ile Leu
100 105 110

Pro Leu Asn Ile Lys Pro Asn Phe His Lys Leu Ala Leu Gly Gly His
115 120 125

Ser Arg Gly Gly Lys Thr Ser Phe Ala Val Ala Leu Arg Lys Leu Asn
130 135 140

Met Thr Thr Asp Leu Lys Phe Ser Ala Ile Ile Gly Val Asp Pro Val
145 150 155 160

Asp Gly Met Asp Lys Gly Lys Gln Thr Ser Pro Pro Ile Phe Thr Tyr
165 170 175

Val Pro His Ser Phe Asp Tyr Asp Met Ala Thr Leu Val Ile Gly Phe
180 185 190

Gly Leu Gly Asp Val Lys Lys Asn Pro Leu Phe Pro Pro Cys Ala Pro
195 200 205

Lys Gly Val Asn His Glu Asp Phe Phe Ser Glu Cys Glu Lys Pro Ser
210 215 220

Trp Tyr Phe Val Ala Lys Asp Tyr Gly His Val Asp Met Leu Asp Asp
225 230 235 240

Asp Thr Lys Gly Val Arg Gly Lys Val Ser Tyr Cys Leu Cys Lys Asn
245 250 255

Gly Glu Ser Arg Lys Pro Met Arg Met Phe Val Gly Gly Val Met Val
260 265 270

Ala Phe Leu Lys Ala Tyr Leu His Gly Asp Asn Val Asp Leu Leu Ala
275 280 285

Ile Arg Asp Lys Asn Leu Ser Val Pro Ile Glu Met Lys Phe Asp Tyr
290 295 300

Phe Val
305

<210> 25
<211> 306
<212> PRT

ES 2 649 912 T3

<213> Piper betle

<400> 25

Met Ala Ala Ser Ser Val Phe Glu Met Gly Lys Leu Glu Val His Val
 1 5 10 15

Lys Ser Val Asn Gln Ser Asn Ser Ser Ser Pro Pro Lys Ser Leu Leu
 20 25 30

Ile Ser Tyr Pro Ser Gln Lys Gly Asp Tyr Gly Val Val Leu Phe Leu
 35 40 45

His Gly Phe Leu Ile Ser Asn Ser Phe Tyr Lys Glu Leu Ile Ser His
 50 55 60

Ile Ser Ser His Gly Tyr Ile Val Val Ala Pro Arg Ile Ile Tyr Pro
 65 70 75 80

Cys Leu Gln Asp Glu Ile Asn Ser Ala Ala Gln Val Ala Asn Trp Leu
 85 90 95

Pro Glu Gly Leu Gln Ala Ala Leu Pro Pro Asn Val Gln Pro Asn Thr
 100 105 110

Ser Lys Leu Thr Leu Ala Gly His Ser Arg Gly Gly Lys Ala Ala Phe
 115 120 125

Cys Met Leu Leu Gly Leu Ala Gly Ser Pro Leu Thr Val Gln Phe Ser
 130 135 140

Gly Leu Ile Gly Val Asp Pro Val Ala Gly Phe Gln Ile Pro Gly Ile
 145 150 155 160

Asn Tyr Lys Met Glu Ile Pro Pro Lys Ile Ile Thr Asn Asn Ser Lys
 165 170 175

Pro Phe Asp Ile Asn Val Pro Thr Leu Ile Ile Gly Thr Glu Leu Gly
 180 185 190

Glu Glu Ala Lys Gly Cys Leu Ala Pro Pro Tyr Ala Pro Ala Gly Leu
 195 200 205

Asn Tyr Glu Gln Phe Tyr Glu Lys Ser Lys Glu Pro Ser Tyr Gln Phe
 210 215 220

Val Ala Lys Gly Tyr Gly His Val Asp Met Leu Asp Asp Ile Ser Lys
 225 230 235 240

ES 2 649 912 T3

Asn Asp Leu Met Gly Lys Leu Thr Tyr Cys Val Cys Lys Asn Gly Lys
245 250 255

Glu Arg Glu Pro Met Arg Arg Thr Ala Gly Gly Leu Met Val Ala Phe
260 265 270

Leu Lys Ala Phe Ser Asp Gly Gln Arg Asp Asp Leu Asp Ala Ile Leu
275 280 285

Asn Asp Pro Glu Leu Ala Pro Ile Gln Leu Asp Ala Gly Ala Lys Leu
290 295 300

Ser Ser
305

<210> 26

<211> 327

<212> PRT

5 <213> Lotus japonicus

<400> 26

Met Ser Leu Ser Ile Ser Ser Val Thr His Pro Ser Ser Val Met Gly
1 5 10 15

Ser Asp Ala Ser Thr Ala Leu Thr Asn Val Phe Asp Ser Gly Lys Tyr
20 25 30

Thr Thr Lys Phe Gln Arg Ile Glu Ser Asn Ser Cys Asn Gly Thr His
35 40 45

Pro Asp Pro Pro Pro Pro Lys Ser Leu Leu Ile Ala Thr Pro Leu Glu
50 55 60

Gly Gly Glu Phe Pro Val Leu Leu Phe Leu His Gly Tyr Leu Leu Tyr
65 70 75 80

Asn Ser Phe Tyr Ser Gln Leu Ile Gln His Ile Ala Ser His Gly Phe
85 90 95

Ile Val Ile Ala Pro Gln Leu Tyr Ala Val Ala Gly Pro Asp Val Ser
100 105 110

Gly Glu Ile His Ser Thr Ala Ala Ile Lys Asn Trp Leu Ser Glu Gly
115 120 125

Leu Ser Lys Phe Leu Pro Pro Asn Val Thr Pro Asn Ser Ser Lys Leu
130 135 140

ES 2 649 912 T3

Ala Leu Ala Gly His Ser Arg Gly Gly Lys Thr Ala Phe Ala Val Ala
145 150 155 160

Leu Arg Lys Leu Asn Ile Thr Thr Asp Leu Lys Phe Ser Ala Leu Val
165 170 175

Gly Val Asp Pro Val Asp Gly Leu Asp Arg Gly Lys Gln Thr Pro Pro
180 185 190

Pro Val Leu Thr Tyr Val Pro His Ser Phe Asp Phe Asp Met Pro Ala
195 200 205

Met Val Ile Gly Ser Gly Leu Gly Asp Val Lys Arg Asn Pro Leu Phe
210 215 220

Pro Pro Cys Ala Pro Lys Thr Val Asn His Glu Asp Phe Phe Asn Glu
225 230 235 240

Cys Asn Lys Pro Ala Trp Tyr Phe Val Ala Lys Asp Tyr Gly His Val
245 250 255

Asp Met Leu Asp Asp Asp Thr Asn Gly Ile Ile Gly Lys Ala Thr Tyr
260 265 270

Cys Leu Cys Lys Asn Gly Glu Ser Arg Lys Pro Met Arg Thr Phe Val
275 280 285

Gly Gly Leu Val Val Ala Phe Leu Lys Ala Tyr Leu Gln Gly Asp Asn
290 295 300

Arg Asp Ser Leu Ala Ile Lys Asp Lys His Leu Ser Ala Pro Val Glu
305 310 315 320

Leu Lys Phe Asp Tyr Phe Val
325

<210> 27

<211> 337

<212> PRT

5 <213> Oryza sativa Indica

<400> 27

Met Ile Ala Phe Ala Ala Gln Ile Leu Ala Phe Cys Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Gln Thr Thr Met Ala Gly Asp Ser Ser
20 25 30

ES 2 649 912 T3

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

ES 2 649 912 T3

His Leu Val Ala Arg Asp Tyr Gly His Thr Asp Met Val Val Asp Val
 290 295 300

Thr Pro Gly Ser Trp Ala Ser Leu Arg Val Pro Cys Ala Gly Ala Ser
 305 310 315 320

Ala Pro Gly Arg Pro Cys Val Gly Ser Ser Ser Ala Pro Trp Ser Arg
 325 330 335

Ser

<210> 28

<211> 367

<212> PRT

5 <213> Oryza sativa Japonica

<400> 28

Met Ile Ala Phe Ala Ala Gln Ile Leu Ala Phe Cys Leu Leu Leu Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Gln Thr Thr Met Ala Gly Asp Ser Ser
 20 25 30

Phe Ser Gly Val Phe Asp His Gly Ser His Gly Val Thr Leu Val Lys
 35 40 45

Val Asp Glu Ala Pro Arg Lys Cys Ser Ser Ala Ala Ala Ala Lys Lys
 50 55 60

Thr Asp Asp Asp Thr Ala Pro Ala Gly Gly Ala Pro Pro Lys Pro Leu
 65 70 75 80

Leu Val Ala Ala Pro Cys Asp Ala Gly Val Tyr Pro Val Val Val Phe
 85 90 95

Leu His Gly Tyr Leu Ala Tyr Asn Ser Phe Tyr Ser Gln Leu Phe Glu
 100 105 110

His Val Ala Ser His Gly Phe Val Val Val Gly Pro Gln Leu Tyr Thr
 115 120 125

Met Ser Gly Pro Asp Thr Thr Asp Glu Ile Asn Ser Ala Ala Ala Val
 130 135 140

Ile Asn Trp Leu Ala Ala Gly Gly Leu Thr Ser Lys Leu Pro Pro Asn
 145 150 155 160

ES 2 649 912 T3

Val Arg Ala Asp Ala Thr Lys Ile Ser Ile Ser Gly His Ser Arg Gly
165 170 175

Gly Lys Val Ala Phe Ala Leu Ala Leu Gly His Ala Asn Val Ser Leu
180 185 190

Arg Gly Gly Ala Gly Gly Ala Thr Ile Ala Ala Leu Val Ala Val Asp
195 200 205

Pro Val Asp Gly Phe Ala Ala Gly Lys Gln Thr Pro Pro Pro Ile Leu
210 215 220

Thr Tyr Gly Gly Ala Asn Ser Leu Arg Val Pro Ala Pro Val Met Val
225 230 235 240

Ile Gly Thr Gly Leu Gly Gly Leu Ala Arg Ala Ala Pro Leu Leu Pro
245 250 255

Ala Cys Ala Pro Pro Gly Val Ser His Gly Glu Phe Tyr Gly Glu Cys
260 265 270

Ala Ala Pro Ala Cys His Leu Val Ala Arg Asp Tyr Gly His Thr Asp
275 280 285

Met Met Asp Asp Val Thr Pro Gly Ala Arg Gly Leu Ala Thr Arg Ala
290 295 300

Val Cys Arg Ser Gly Gly Ala Arg Ala Pro Met Arg Arg Phe Phe Gly
305 310 315 320

Gly Ala Met Val Ala Phe Val Lys Arg Trp Val Glu Gly Glu Pro Glu
325 330 335

Leu Leu Asp Cys Val Arg Ala Arg Pro Glu Thr Ala Pro Val Val Leu
340 345 350

Ser Ala Val Glu Phe Arg Asp Glu Ala Ile Ala Asn His Ser Tyr
355 360 365

<210> 29

<211> 356

<212> PRT

5 <213> Oryza sativa Japonica

<400> 29

Met Ile Ala Phe Ala Ala Gln Ile Leu Ala Phe Cys Leu Leu Leu Leu
1 5 10 15

ES 2 649 912 T3

Leu Leu Leu Leu Leu Gln Leu Gln Thr Thr Met Ala Gly Asp Ser Ser
 20 25 30
 Phe Ser Gly Val Phe Asp His Gly Ser His Gly Val Thr Leu Val Lys
 35 40 45
 Val Asp Glu Ala Pro Arg Lys Cys Ser Ser Ala Ala Ala Lys Lys
 50 55 60
 Thr Asp Asp Asp Thr Ala Pro Ala Gly Gly Ala Pro Pro Lys Pro Leu
 65 70 75 80
 Leu Val Ala Ala Pro Cys Asp Ala Gly Val Tyr Pro Val Val Val Phe
 85 90 95
 Leu His Gly Tyr Leu Ala Tyr Asn Ser Phe Tyr Ser Gln Leu Phe Glu
 100 105 110
 His Val Ala Ser His Gly Phe Val Val Val Gly Pro Gln Leu Phe Leu
 115 120 125
 Gly Cys Glu Leu Ile Leu Ser Asn Asn Phe Asp Ala Lys Met Leu Tyr
 130 135 140
 Thr Met Ser Gly Pro Asp Thr Thr Asp Glu Ile Asn Ser Ala Ala Ala
 145 150 155 160
 Val Ile Asn Trp Leu Ala Ala Gly Gly Leu Thr Ser Lys Leu Pro Pro
 165 170 175
 Asn Val Arg Ala Asp Ala Thr Lys Ile Ser Ile Ser Gly His Ser Arg
 180 185 190
 Gly Gly Lys Val Ala Phe Ala Leu Ala Leu Gly His Ala Asn Gln Thr
 195 200 205
 Pro Arg Pro Ile Leu Thr Tyr Gly Gly Ala Asn Ser Leu Arg Leu Pro
 210 215 220
 Ala Pro Val Met Val Ile Gly Thr Gly Leu Gly Gly Leu Ala Arg Ala
 225 230 235 240
 Ala Pro Leu Leu Pro Ala Cys Ala Pro Pro Gly Val Ser His Gly Glu
 245 250 255
 Phe Tyr Gly Glu Cys Ala Ala Pro Ala Cys His Leu Val Ala Arg Asp

ES 2 649 912 T3

260

265

270

Tyr Gly His Thr Asp Met Met Asp Asp Val Thr Pro Gly Ala Arg Gly
275 280 285

Leu Ala Thr Arg Ala Val Cys Arg Ser Gly Gly Ala Arg Ala Pro Met
290 295 300

Arg Arg Phe Phe Gly Gly Ala Met Val Ala Phe Val Lys Arg Trp Val
305 310 315 320

Glu Gly Glu Pro Glu Leu Leu Asp Cys Val Arg Ala Arg Pro Glu Thr
325 330 335

Ala Pro Val Val Leu Ser Ala Val Glu Phe Arg Asp Glu Ala Ile Ala
340 345 350

Asn His Ser Tyr
355

<210> 30

<211> 329

<212> PRT

5 <213> Picea sitchensis

<400> 30

Met Gly Gln Gln Gly Glu Glu Pro Trp Glu Asp Val Phe Lys Pro Gly
1 5 10 15

Arg Phe Pro Val Arg Ile Leu Lys Ile Pro Gln Arg Thr Thr His Gly
20 25 30

Ser Thr Thr Ala Ala Ala Pro Lys Pro Leu Leu Leu Ala Leu Pro Ala
35 40 45

Gln Pro Gly Glu Tyr Pro Val Leu Leu Phe Phe His Gly Tyr Leu Leu
50 55 60

Leu Asn Ser Phe Tyr Thr Gln Leu Leu Gln His Ile Ala Ser His Gly
65 70 75 80

Tyr Ile Ala Ile Ala Pro Gln Met Tyr Cys Val Thr Gly Ala Asp Ala
85 90 95

Thr Pro Glu Ile Ala Asp Ala Ala Ala Ile Cys Asn Trp Leu Leu Gln
100 105 110

Gly Leu Ser Ser Tyr Leu Pro Asp Asp Val Arg Pro Asp Phe Gln Asn

ES 2 649 912 T3

115 120 125

Val Ala Met Ala Gly His Ser Arg Gly Gly Lys Val Ala Phe Gly Leu
130 135 140

Ala Leu Asp Arg Thr Ser Gln Thr Thr Glu Leu Lys Phe Ser Ala Leu
145 150 155 160

Val Gly Val Asp Pro Val Asp Gly Met Ala Arg Gly Arg Gln Thr Gln
165 170 175

Pro Arg Ile Leu Thr Tyr Lys Pro His Ser Phe Asp Ser Val Ile Pro
180 185 190

Thr Leu Ile Val Gly Ser Gly Leu Gly Ala Val Lys Arg Asn Pro Leu
195 200 205

Phe Pro Pro Cys Ala Pro Glu Gly Val Ser His Arg Glu Phe Phe Ser
210 215 220

Glu Cys Ser Ala Pro Ala Tyr His Phe Val Ala Ser Asp Tyr Gly His
225 230 235 240

Met Asp Phe Leu Asp Asp Glu Thr Gly Gly Val Lys Gly Gln Ser Ser
245 250 255

Tyr Cys Leu Cys Lys Asn Gly Val Ala Arg Glu Pro Met Arg Arg Phe
260 265 270

Cys Gly Gly Ile Ile Val Ala Phe Leu Asn Val Cys Leu Gln Asn Asp
275 280 285

Ser Gly Ala Phe Asn Asp Leu Leu Val His Pro Ser His Ala Pro Val
290 295 300

Lys Leu Glu Pro Pro Glu Ser Phe Val Ser Glu Val Glu His Gln Ala
305 310 315 320

Val Glu Ser Leu Leu Pro Gln Thr Val
325

<210> 31

<211> 322

<212> PRT

5 <213> Chlamydomonas sp.

<400> 31

Met Pro Ser Thr Gln Phe Leu Gly Ala Ser Thr Leu Leu Leu Phe Gly

ES 2 649 912 T3

Asp Arg Leu Cys Gly Arg Gly Thr Met Met Ser Ser Asp Val Ile Thr
 260 265 270

Tyr Ser Ala Ala Phe Thr Val Ala Trp Phe Glu Gly Ile Phe Arg Pro
 275 280 285

Ala Gln Ser Gln Met Gly Ile Ser Asn Phe Lys Thr Trp Ala Asn Thr
 290 295 300

Gln Val Ala Ala Arg Ser Ile Thr Phe Asp Ile Lys Pro Met Gln Ser
 305 310 315 320

Pro Gln

<210> 32

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Motivo de secuencia conservado

<400> 32

Gly His Ser Arg Gly

1 5

10 <210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Motivo de secuencia de aminoácidos

<220>

<221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser Leu, Ala, Val, Ile, Phe, Tyr, His, Gln, Thr, Asn, Met o Ser

20 <400> 33

Gly Asp Ser Xaa

1

<210> 34

<211> 78

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que muestran la fusión de un gen de clorofilasa a una etiqueta de His y el sitio de la trombina

<400> 34

catgggcagc agccatcatc atcatcatca cagcagcggc ctggtgccgc gcggcagcca 60

30 tatggcagcg gctgcccc 78

<210> 35

<211> 26

<212> PRT

ES 2 649 912 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos que muestran la fusión de un gen de clorofilasa a una etiqueta de His y el sitio de la trombina

5 <400> 35

Met Gly Ser Ser His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro
1 5 10 15

Arg Gly Ser His Met Ala Ala Ala Ala Pro
20 25

<210> 36

<211> 155

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nucleótidos que muestran la fusión de un gen de clorofilasa a una secuencia señal de AprE y a una secuencia AGK

<400> 36

atTTTTTTaa aaggagagggg taaagagtga gaagcaaaaa attgtggatc agtttgctgt 60

ttgcttttagc gttaatcttt acgatggcgt tcggcagcac atccagcgcg caggctgctg 120

15 gaaaaatggc agcggctgcc ccggccgaaa caatg 155

<210> 37

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Secuencia de aminoácidos que muestran la fusión de un gen de clorofilasa a una secuencia señal de AprE y a una secuencia AGK

<400> 37

Met Arg Ser Lys Lys Leu Trp Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ala Leu
1 5 10 15

Ile Phe Thr Met Ala Phe Gly Ser Thr Ser Ser Ala Gln Ala Ala Gly
20 25 30

Lys Met Ala Ala Ala Ala Pro Ala Glu Thr Met

25 35 40

<210> 38

<211> 77

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> Secuencia de nucleótidos que muestran la fusión directa de un gen de clorofilasa a un promotor de AprE

<400> 38

taagtaagtc tactctgaat ttttttaaaa ggagagggta actagtggca ggggctgccc 60

cggccgaaac aatgaat 77

ES 2 649 912 T3

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

5 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos que muestran la fusión directa de un gen de clorofilasa a un promotor de AprE

<400> 39

Met Ala Ala Ala Ala Pro Ala Glu Thr Met Asn
1 5 10

10 <210> 40
<211> 156
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos que muestran la fusión de un gen de clorofilasa a la secuencia señal de Cel A

15 <400> 40

aaccatgggc tttgggagcg ctcccatcgc gttgtgtccg cttcgcacga ggaggaacgc 60

tttgaaacgc cttttggccc tgctcgcgac cggcgtgtcg atcgtcggcc tgactgcgct 120

agccggcccc ccggcacagg ccatggccgc cgccgc 156

<210> 41
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Secuencia de aminoácidos que muestran la fusión de un gen de clorofilasa a la secuencia señal de Cel A

<400> 41

Met Gly Phe Gly Ser Ala Pro Ile Ala Leu Cys Pro Leu Arg Thr Arg
1 5 10 15

Arg Asn Ala Leu Lys Arg Leu Leu Ala Leu Leu Ala Thr Gly Val Ser
20 25 30

Ile Val Gly Leu Thr Ala Leu Ala Gly Pro Pro Ala Gln Ala Met Ala
35 40 45

25 Ala Ala Ala
50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para el tratamiento de un aceite vegetal, que comprende una etapa de poner en contacto el aceite con una enzima, en donde la enzima es capaz de hidrolizar un estereoisómero *a'* o *b'* de la clorofila o de un derivado de la clorofila, y en donde la enzima comprende un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 13.
2. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el estereoisómero *a'* o *b'* comprende clorofila *a'*, feofitina *a'*, clorofila *b'* o feofitina *b'*.
3. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la enzima es capaz de hidrolizar un estereoisómero *a'* de la clorofila o del derivado de la clorofila.
4. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la enzima tiene una razón de actividad sobre (a) un estereoisómero *a* de la clorofila o de un derivado de la clorofila en comparación con un estereoisómero *a'* de la clorofila o del derivado de la clorofila; o (b) un estereoisómero *b* de la clorofila o de un derivado de la clorofila en comparación con un estereoisómero *b'* de la clorofila o del derivado de la clorofila; de menos de 10.
5. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde después del tratamiento con la enzima, el aceite comprende (a) al menos el 50% de estereoisómeros *a* de la clorofila o del derivado de la clorofila, basándose en la cantidad total de estereoisómeros *a* y *a'* de la clorofila o del derivado de la clorofila en el aceite; o (b) al menos el 50% de estereoisómeros *b* de la clorofila o del derivado de la clorofila, basándose en la cantidad total de estereoisómeros *b* y *b'* de la clorofila o del derivado de la clorofila en el aceite.
6. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la enzima tiene una razón de actividad sobre la feofitina en comparación con la pirofeofitina de menos de 10.
7. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la enzima comprende una actividad clorofilasa, feofitinasas y/o pirofeofitinasas.
8. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la enzima comprende la secuencia de aminoácidos GHSRG (SEQ ID n.º 32).
9. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la enzima procede de *Ricinus communis*.
10. Utilización de una enzima que es capaz de hidrolizar la clorofila o un derivado de la clorofila, para retirar un estereoisómero *a'* o *b'* de la clorofila o del derivado de la clorofila a partir de un aceite vegetal, en donde la enzima tiene una actividad hidrolítica de al menos 1000 U/g, basándose en las unidades de actividad por gramo de la enzima purificada, sobre un estereoisómero con la prima de la clorofila o de un derivado de la clorofila, y en donde una unidad de actividad enzimática está definida como la cantidad de enzima que hidroliza un micromol de sustrato por minuto a 40°C, en donde el ensayo para medir la actividad hidrolítica es como sigue:
 - a) se añaden 170 µl de HEPES a 50 mM, pH 7, a 20 µl de clorofila, feofitina o pirofeofitina a 0,3 mM disuelta en acetona;
 - b) se disuelve la enzima en HEPES a 50 mM, pH 7;
 - c) se añaden 10 µl de la solución de enzima a 190 µl de la solución de sustrato para iniciar la reacción y se incuba a 40°C durante diferentes periodos de tiempo;
 - d) se detiene la reacción por la adición de 350 µl de acetona;
 - e) después de la centrifugación durante 2 min a 18.000g, se analiza el sobrenadante por HPLC y se determinan las cantidades de (i) clorofila y clorofilida, (ii) feofitina y feoforbida o (iii) pirofeofitina y pirofeoforbida; en donde la enzima comprende un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con la SEQ ID n.º 2 o la SEQ ID n.º 13.
11. Utilización de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la enzima tiene una razón de actividad sobre (a) un estereoisómero *a* de la clorofila o de un derivado de la clorofila en comparación con un estereoisómero *a'* de la clorofila o del derivado de la clorofila; o (b) un estereoisómero *b* de la clorofila o de un derivado de la clorofila en comparación con un estereoisómero *b'* de la clorofila o del derivado de la clorofila; de menos de 10.
12. Utilización de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en donde la enzima tiene una razón de actividad sobre la feofitina en comparación con la pirofeofitina de menos de 10.
13. Utilización de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el estereoisómero *a'* o *b'* comprende clorofila *a'*, feofitina *a'*, clorofila *b'* o feofitina *b'*.

Figura 1

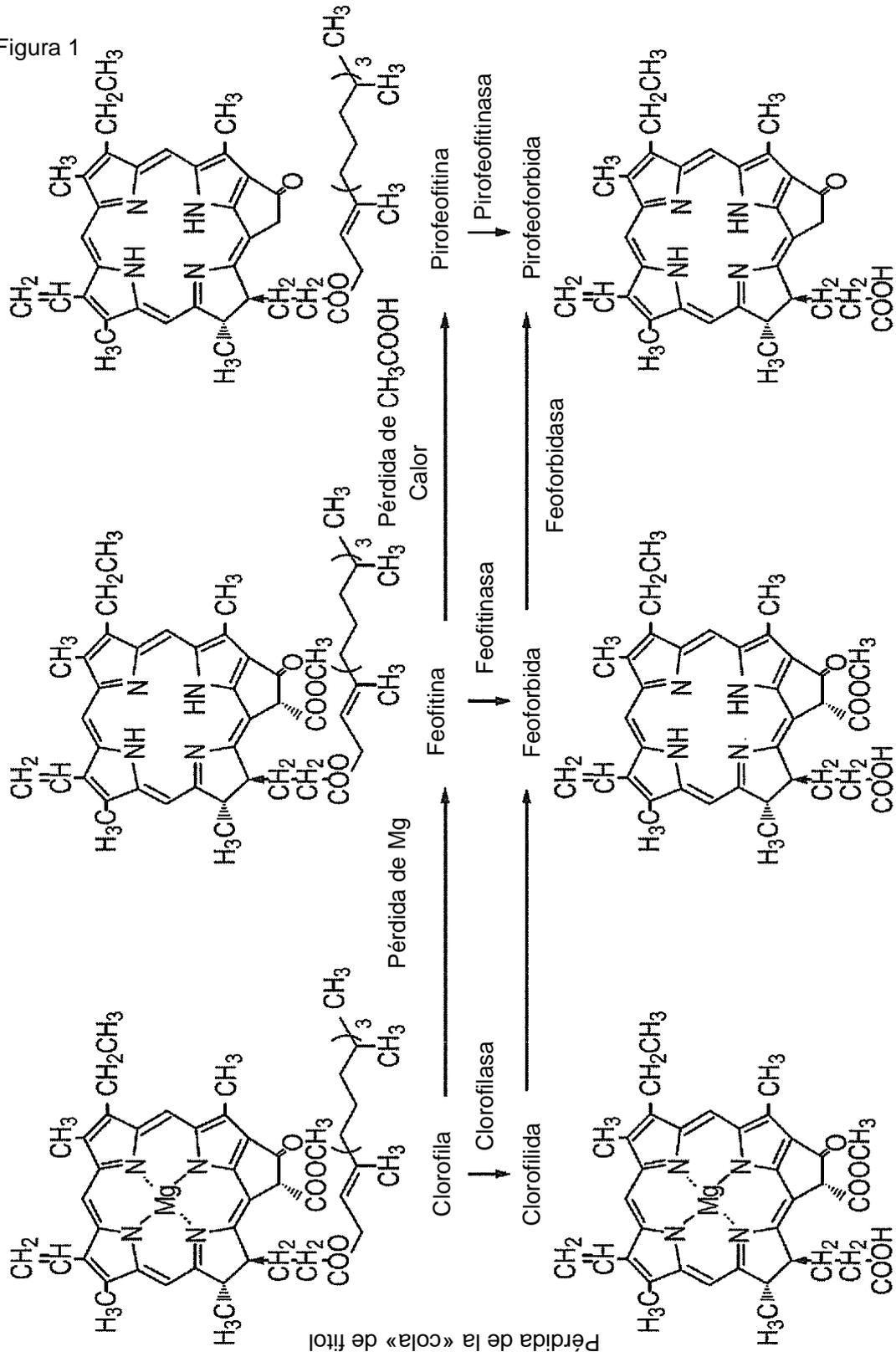


Figura 1

Figura 2

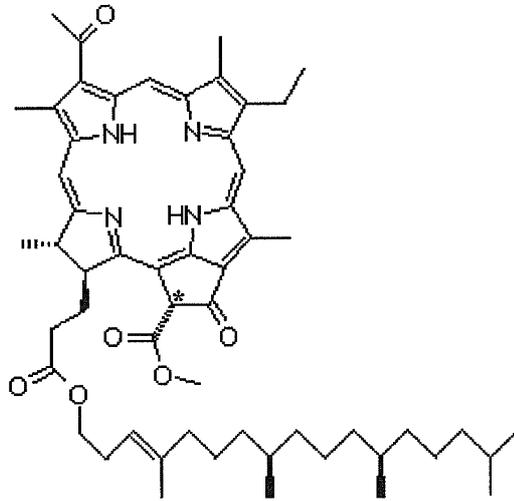


Figura 3

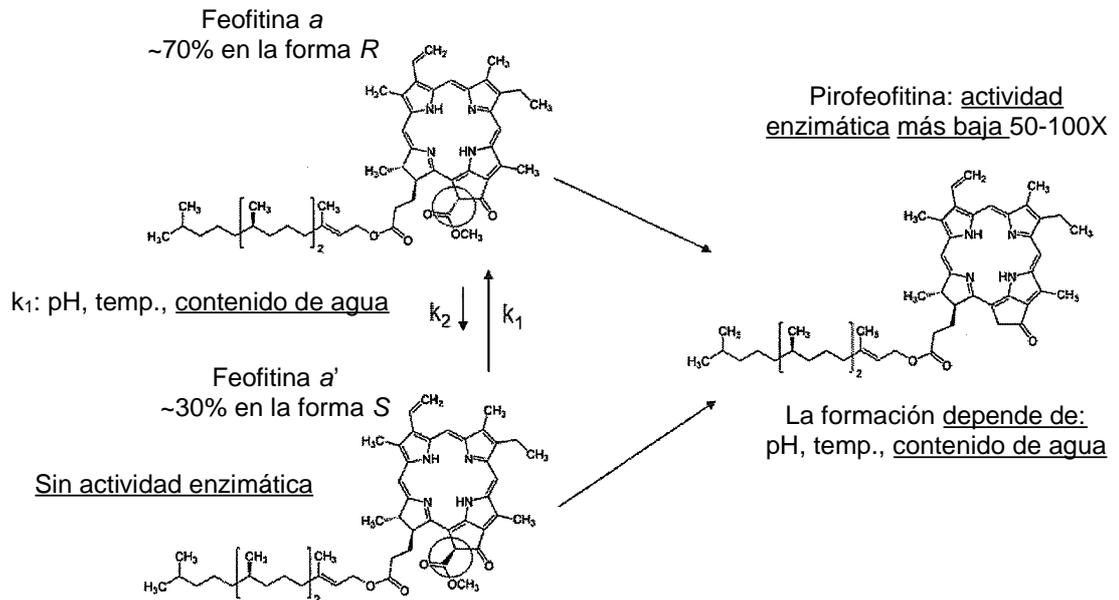


Figura 4

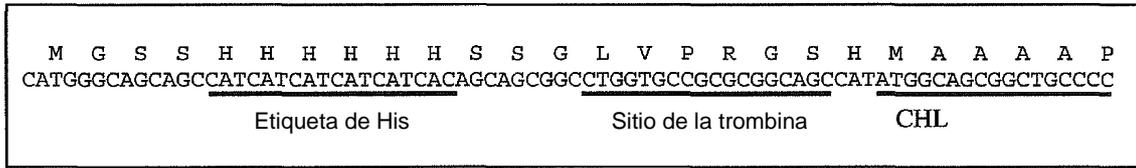


Figura 5

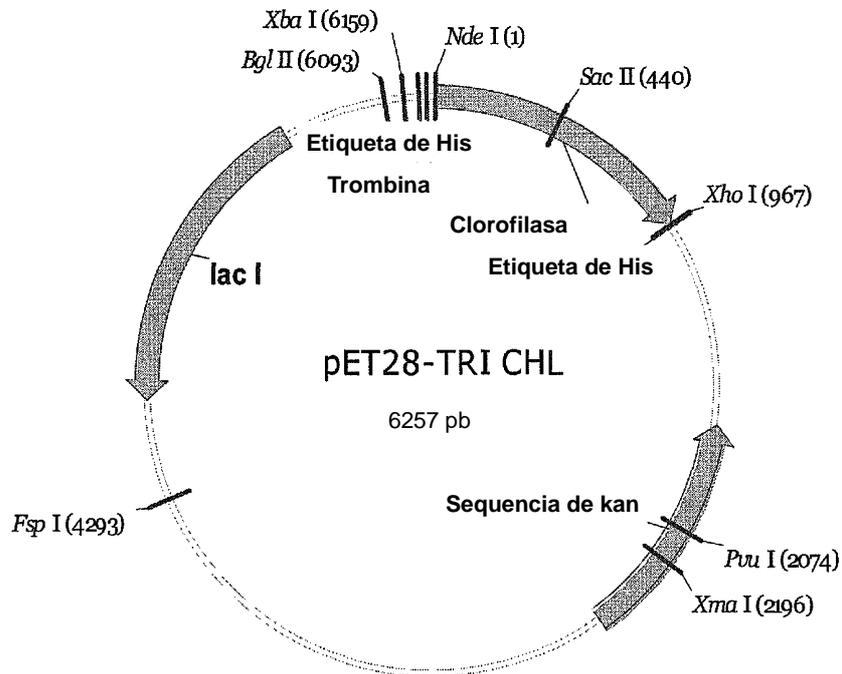


Figura 8

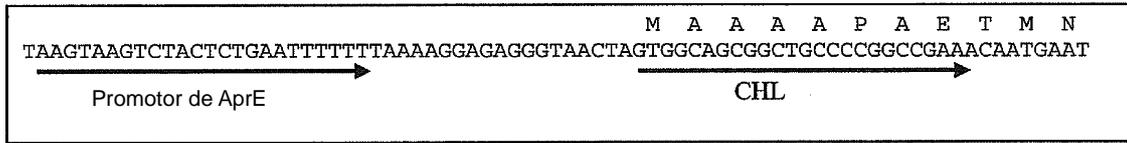


Figura 9

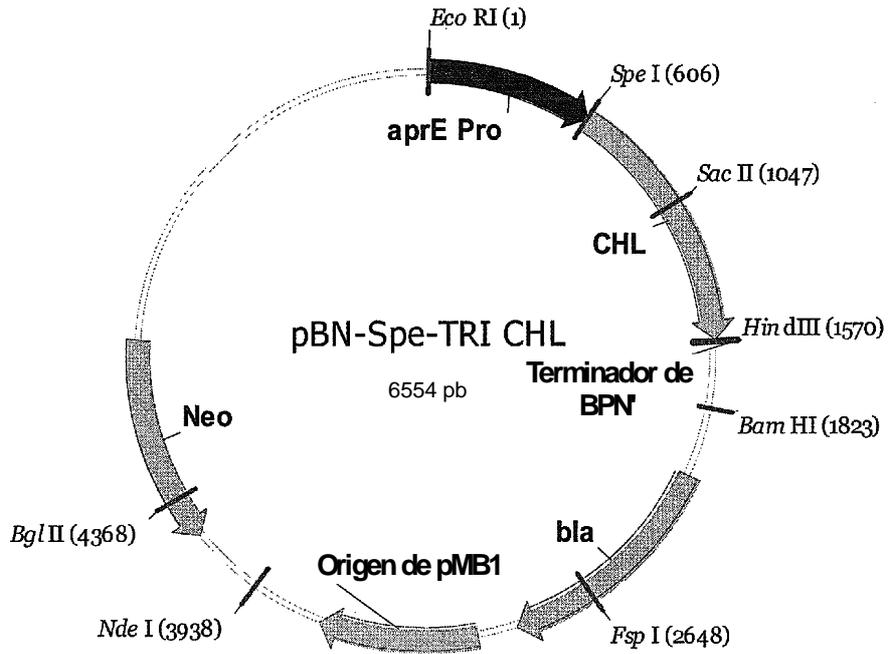


Figura 10

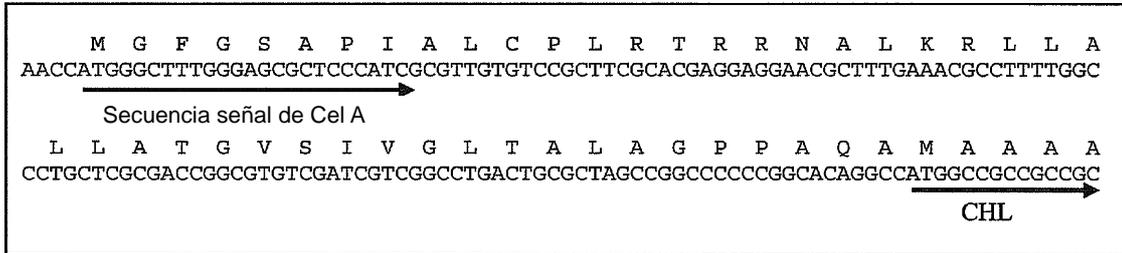


Figura 11

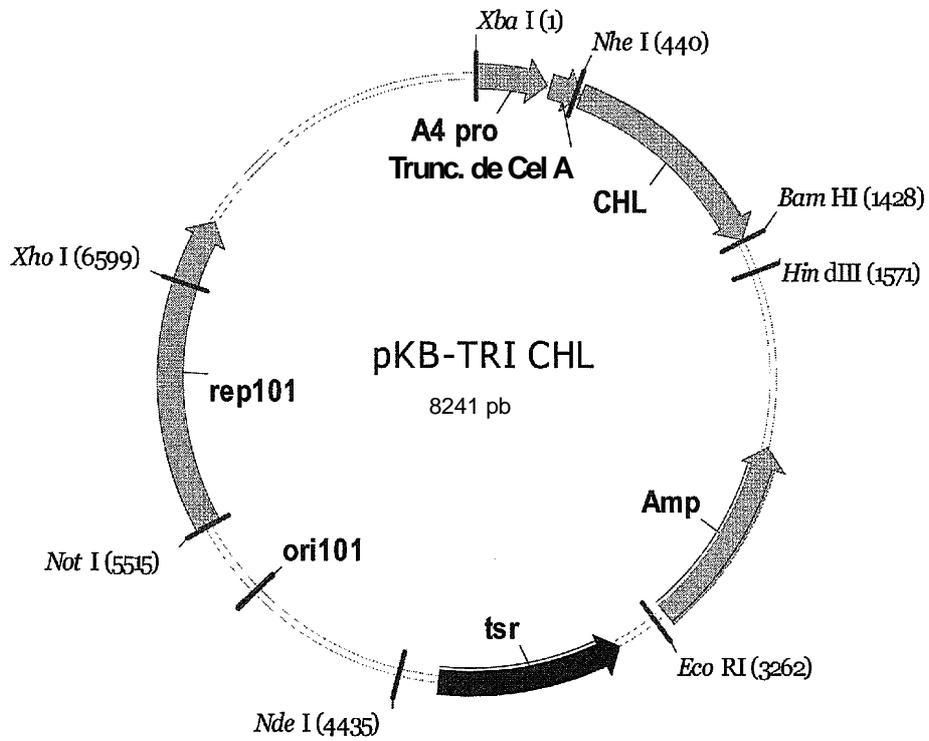


Figura 12 (SEQ ID n.º 1)

```

ARA_CHL
  1  MAAIEDSPTF SSVVTPAAFE IGSLPTTEIP VDPVENDSTA PPKPVTRITCP
 51  TVAGTYPVVL FFHGFYLRNY FYSDVLNHIA SHGYILVAPQ LCKLLPPGGQ
101  VEVDDAGSVI NWASENLKAH LPTSVNANGK YTSLVGHSRG GKTAFAVALG
151  HAATLDPSIT FSALIGIDPV AGTNKYIRTD PHILTYKPES FELDIPVAVV
201  GTGLGPKWNN VMPPCAPTDL NHEEFYKECK ATKAHFVAAD YGHMDMLDDD
251  LPGFVGF MAG CMCKNGQRKK SEMRSFVGGI VVAFLKYS LW GEKAEIRLIV
301  KDPSVSPAKL DPSPELEEAS GIFV

```

Figura 13 (SEQ ID n.º 2)

```

ARA_CHL2
  1  MSSSSSRNAF EDGKYKSNLL TLDSSSRCK ITPSSRASPS PPKQLLVATP
 51  VEEGDYPVVM LLHG YLLYNS FYSQMLHVS SHGFILVAPQ LYSIAGPDTM
101  DEIKSTAEIM DWLSVGLNH F LPAQVTPNLS KFALSGHSRG GKTAFAVALK
151  KFGYSSNLKI STLIGIDPVD GTGK GKQTPP PVLAYLPNSF DLDKTPILVI
201  GSGLGETARN PLFPPCAPP G VN HREFREC QGPAWHFVAK DYGHLDMLDD
251  DTKGIRGKSS YCLCKNGEER RPMRRFVGG L VVSFLKAYLE GDDRELVKIK
301  DGCHEDVPVE IQEFEVIM

```

Figura 14 (SEQ ID n.º 3)

```

CIT_CHL
  1  MAAMVDAKPA ASVQGTPLLA TATLPVFTRG IYSTKRITL E TSSPSSPPPP
 51  KPLIIVTPAG KGTFNVILFL HGTSLSNKSY SKIFDHIASH GFIVVAPQLY
101  TSIPPPSATN ELNSAAEVAE WLPQGLQONL PENTEANVSL VAVMGHSRGG
151  QTAFALSLRY GFGAVIGLDP VAGTSKTTGL DPSILSFDSF DFSIPVTVIG
201  TGLGGVARI TACAPEGANH EEFNRCNKS SRAHFVATDY GHMDILDDNP
251  SDVKSWALSK YFCKNGNESR DPMRRCVSGI VVAFLKDFFY GDAEDFRQIL
301  KDPSFAPIKL DSVEYIDASS MLTTHVKV

```

Figura 15 (SEQ ID n.º 4)

```

TRI_CHL
  1  MAAAAPAETM NKSAAGAEVP EAF TSVFQPG KLAVEAIQVD ENAAPTPIIP
 51  VLIVAPKDAG TYPVAMLLHG FFLHNHFYEH LLRHVASHGF IIVAPQFSIS
101  IIPSGDAEDI AAAAKVADWL PDGLPSVLPK GVEPELSKLA LAGHSRGGHT
151  AFSLALGHAK TQLTFSALIG LDPVAGTGKS SQLQPKILTY EPSSF GMAMP
201  VLVIGTGLGE EKKNIFPPC APKDVNHA EF YRECRPPCY FVTKDYGHLD
251  MLDDDAPKFI TCVCKDGNGC KGKMRRCVAG IMVAFLNAAL GEKDADLEAI
301  LRDPVAVPTT LDPVEHRVA

```

Figura 16 (SEQ ID n.º 5)

TRI_CHL2

| | | | | | |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1 | MAAMATTVFQ | AGPMEVDVKH | VDKSMIPNLA | RPLMVVAPKE | TGAYPVIVFL |
| 51 | HGWNMLNSWY | EQLLTHVASH | GFIHAVAPQLY | WMVSEPDADD | IDATKRITNW |
| 101 | LADHDKGLAH | VLKDVLKLEH | VEPDLSKLAL | AGHSRGGQTA | FAVALGLGDA |
| 151 | KTKLELKFS | LIGVDPVAGV | SRAQQLEPKV | LTFEPDCLDV | GMPVLVMGTG |
| 201 | LGPKHIGGFP | CAPVGVNHAE | FYKECAPPRY | HLVVKDYGHL | DMLDDNVPYI |
| 251 | INNCMCMRNQ | HDTKDLARRT | MGGAMVAFLR | AKLRIDVRDL | IAIYHNPEIA |
| 301 | PAVLQVDEF | LPCFVGRPNP | SSV | | |

Figura 17 (SEQ ID n.º 6)

BRA_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | MSPSFLFFTL | FLIKEMSSSS | SANSFEDGKY | KTDLLTVGLS | SCCWKKPSSS |
| 51 | PTPQSPKRL | LVATPVEEGE | YPVVMLLHGY | LLYNSFYSQL | MLHVSSHGFI |
| 101 | VIAPQLYSIA | GPDTMDEIKS | TAEIIDWLSV | GLNHFLPPQV | TPNLKSFALS |
| 151 | GHSRGGKTAF | ALALKKFGYS | SDLKISALIG | IDVGTVFWTN | GYGQYSGEFF |
| 201 | EQFDCRNDRI | VES | | | |

Figura 18 (SEQ ID n.º 7)

BRA_CHL1

| | | | | | |
|-----|-------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | MAGKEDSETF | FSAATPLAFE | LGSLPTTVIP | ADPSATDLTA | PPKVIITSP |
| 51 | TVAGTYPVVL | FFHGFYLRNY | FYSDVINHVA | SHGYIVVAPQ | LCKILPPGGQ |
| 101 | VEVDDAGKVI | NWTSKNLKAH | LPSSVNANGN | YTALVGHSRG | GKTAFVALG |
| 151 | HAATLDPSIK | FSALVGIDPV | AGISKCIRTD | PEILTYKPES | FDLMPVAVI |
| 201 | GTGLGPKSNM | LMPPCAPAEV | NHEEFYIECK | ATKGFVVAAD | YGHMDMLDDN |
| 251 | LPGFVGF MAG | CMCKNGKRKK | SEMRSFVGGI | VVAFLKYSIW | GEMSEIRQIL |
| 301 | KDPSVSPARL | DPSPELEEAS | GYLV | | |

Figura 19 (SEQ ID n.º 8)

Brass_CHL2

| | | | | | |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1 | MSSSSSRNAF | VDGKYKPDLL | TVDLASRCRC | YKTPSSSLT | PPPPPKSLLV |
| 51 | ATPVEEGEYP | VVMLLHGYLL | YNSFYSQLML | HVSSYGFIVI | APQLYNIAGP |
| 101 | DTIDEIKSTA | EIIDWLSVGL | NHFLPPQVTP | NLSKFALTGH | SRGGKTAFAV |
| 151 | ALKKFGYSSE | LKISAIIGVD | PVDGTGKGKQ | TPPPVLTYEP | NSFNLEKMPV |
| 201 | LVIGSGLGEL | ARNPLFPPCA | PTGVNHEREFF | QECQGPWFHF | VAKDYGHLDL |
| 251 | LDDDTKGLRG | KSSYCLCKNG | EERKPMRRFI | GGIVVSFLMA | YLEDDDCELV |
| 301 | KIKAGCHEGV | PVEIQEFVK | K | | |

Figura 20 (SEQ ID n.º 9)

ZEA_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | MAASPVAIGT | AVFQRGPLRV | EARHVDYSQV | PSVPKPLMVV | APTDAGVYPV |
| 51 | AVFLHGCNTV | NSWYESLLSH | VASHGFIAVA | PQLYCVTLNM | NDLKDIDATR |
| 101 | QVTAWLADKQ | QGLAHVLANI | LQLHGVRPDL | SRLALAGHSR | GGDTAFAVAL |
| 151 | GLGPAASDDD | DNNADAGTSP | AALPLKFSAL | IGVDPVAGLS | KQAQVEPKVL |
| 201 | TFRPRSLDPG | MPALVVGTGL | GPKHVGGPPC | APAGVNHAEF | YDECAPPRYH |
| 251 | VVLRDYGHMD | MLDDDGVYV | INNCMCMRNT | KDTKDLARRA | IGGAVVAFLR |
| 301 | ATLEDDDEDL | KVVLENRPGL | SPAVLDPVGH | DLA | |

Figura 21 (SEQ ID n.º 10)

ZEA_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | MNLASAVRVF | LSYCLLLHRW | MGSEQAGGVF | DQGGHSVSLT | RLDEARAPPR |
| 51 | CAVQSSLSSA | ASLPPKPLL | AAPRETGEYP | VILFLHGYLE | VNSFYSQLFE |
| 101 | HVASHGFIVV | GPQLYTISGA | DTTEEINSAA | AVIDWLATGL | PSTLPLGVRA |
| 151 | DLTKVVISGH | SRGGKVAFAL | ALGHAKAKLA | VPLAAVVAVD | PVDGMGVGKQ |
| 201 | TPPPILTGRH | GSLHVGAPTM | VIGTGLGELP | RGSLLPPCAP | RGVSHAIFYD |
| 251 | ELDGAAPACH | LVARDYGHTD | MDDDDTPGAR | GMLTRTICRS | GGARAPMRRF |
| 301 | VAGATVAFLK | KWVAGDAAAM | DSITARPDQA | PIALSVVEFG | DEKAIA |

Figura 22 (SEQ ID n.º 11)

BAM_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|-------------|
| 1 | MAATAEIKIP | STEALAVTS | VFRPGKLAVE | LVPVDHNAV | TPPIPIILIVA |
| 51 | PKDAGTYPVA | MLLHGFFLQN | HFYEHLKLV | ASHGFIMVAP | QFHAICTGET |
| 101 | EDIAAAAKVT | DWLPEGLPSV | LLKGVEADLS | KLALAGHSRG | GHTAFSLALG |
| 151 | HGKTNLNFAA | LIGLDPVAGT | GKSSQLPPKI | LTYKPSFVD | AMPVLVIGTG |
| 201 | LGEEKKNVLF | PPCAPKDVNH | REFYYECKPP | CYYFVTKDYG | HLDMMLDDAP |
| 251 | KFITCLCKDG | DNCKDKMRA | VAGIMIAFLR | AVLDEKGDGI | KVILKDPGLA |
| 301 | PVTLDPVECR | LP | | | |

Figura 23 (SEQ ID n.º 12)

CHE_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | MAKLLLLIFG | VFIFVNSQAQ | TFPTILEKHN | SEKITDVFHK | GNFQVTNNPI |
| 51 | RVKRYEFSAP | EPLIIISPKE | AGVYPVLLFI | HGTMLSNEDY | SLFFNYIASH |
| 101 | GFIVVAPKLF | RLFPPKLPSQ | QDEIDMAASV | ANWMPLYLQV | VLQRYVTGVE |
| 151 | GDLEKLAISG | HSRGGKSFA | LALGFSNIKL | DVTFSALIGV | DPVAGRSVDD |
| 201 | RTLPHVLTYP | PNSFNLSIPV | TVIGSGLGNH | TISCAPNHVS | HQQFYDECKE |
| 251 | NSSHVITKY | GHMDMLNEFR | LSPIAVTMSL | MCAQSERPKA | TMRRTLGGIM |
| 301 | VAFNLAYFRD | DGRQYYAIIA | NRSLAPTNL | AEKKGFNFGF | ATTYAQL* |

Figura 24 (SEQ ID n.º 13)

CB_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | MSSSCATVTN | VYENKYYTTV | VAKIESGSCA | RSSLPLPLPP | KPLLIAMPSE |
| 51 | AGEFPVLIFL | HGYLLYNSFY | SLLIQHVASH | GFIVIAPQLY | TVAGADSADE |
| 101 | IKCTAAITNW | LSKGLHHVLP | PHVQPKLSKL | GLAGHSRGGK | AAFALALQKA |
| 151 | GISTALKFSA | LIGVDPVDGM | DKGKQTPPPV | LYTTPHSFDL | DMAAMVIGSG |
| 201 | LGEVKRNPMF | PPCAPKGVNH | EDFFKECKKP | AYYFVVKDYG | HLDMLDDDTN |
| 251 | GIRGKATYCL | CVNGKSREPM | RRFVGGVLVA | FLKAYLGGDS | SDLMTITDGQ |
| 301 | TGPVELQAAE | CYV | | | |

Figura 25 (SEQ ID n.º 14)

GlyMax_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | MAQRAQPALA | TTDVFQKGGI | HWKQFNVETS | TASSSPKPL | LIFTPTVPGL |
| 51 | YPVILFCHGF | CIRTSYYSKL | LAHIVSHGFI | LVAPQLFSIG | VPMFGPEEVK |
| 101 | CEGRVVDWLD | NGLQPLLPES | VEAKLEKLVL | VGHSGGGKTA | FAVALGYCKT |
| 151 | KLKFSALIGI | DPVAGVSKCK | PCRS�PDILT | GVPRSFNLNI | PVAVIGTGLG |
| 201 | PEKANSLFPP | CAPNGVNHKE | FFSECKPPSA | YFVATDYGHM | DMLDDETPGV |
| 251 | IGTMMSKCMC | KNGKKGPRDL | MRRTVGGLVV | AFLRAQLNEQ | WKDFDAILAS |
| 301 | PNLAPAKLDD | VRYLPT | | | |

Figura 26 (SEQ ID n.º 15)

Gin_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | MVLVKDVFSE | GPLPVQILAI | PQANSSPCSK | LADKNGTATT | PSPCRPPKPL |
| 51 | LIALPSQHGD | YPLILFFHGY | VLLNSFYSQL | LRHVASHGYI | AIAPQMYSVI |
| 101 | GPNTTPEIAD | AAAITDWLRD | GLSDNLPQAL | NNHVRPNFEK | FVLAGHSRGG |
| 151 | KVAFALALGR | VSQPSTKYSA | LVGLDPVDGM | GKDQQTSHPI | LSYREHSFDL |
| 201 | GMPTLVVGS | LGPCRNPLF | PPCAPQGVNH | HDFYECVAP | AYHFVASDYG |
| 251 | HLDFLDDDTK | GIRGKATYCL | CKNGEAREPM | RKFSGGIVVA | FLQAFGLDNR |
| 301 | GALNDIMVYP | SHAPVKIEPP | ESLVTEDVKS | PEVELLRRAV | CR |

Figura 27 (SEQ ID n.º 16)

PAC_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1 | MAQLETKHD | LSTVVPVFT | GKYHPTS SVS | DPSNSSPSSP | PKPLLIFTPS |
| 51 | EQGTYPVILF | FHGFYLRNMF | YTGLLLHISS | HGFIIVAPQL | SNIIPPSGTE |
| 101 | EVEHAAKVAD | WLPSGLPSVL | PGNVEANLAK | LALVGHSGGG | KTAFALALGR |
| 151 | AKTAQNFSAL | VGIDPVAGNR | FGETSPKILT | YTPGSFDLSI | PVAVVGTGLG |
| 201 | PESKGCMPCP | CAPTQYNHEE | FFNECKPPRV | HFDKNYGHM | DTLDDNPSGF |
| 251 | IGKLSDTICV | NGEGPRDPMR | RCVGGIVVAF | LNFFFEAEKE | DFMTIMNEPY |
| 301 | VAPVTLDQVQ | FNV | | | |

Figura 28 (SEQ ID n.º 17)

POP_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|-------------|------------|------------|
| 1 | MSSSSAIATV | TTTVFEAGKY | TTVLQKVESR | TTCCTAKTSP | PLPVPPPKPL |
| 51 | LIVMPCEAGE | FPLLVFLHGY | LLYNSFYSQL | LQHIASHGFI | VIAPQLYLVA |
| 101 | GQDSSDEIKS | VAATTNWLSE | GLHHLLPPHV | KPNLSKLGLA | GHSRGGKTAF |
| 151 | ALALEKAAAT | LKFSALIGVD | PVDGMDKGKQ | TPPPVLTYVP | HSFDLDMAIM |
| 201 | VIGSGLGELK | KNPLFPPCAP | EGVNHKDFFK | ECKGPASYFV | VKDYGHLDML |
| 251 | DDDTEGIRGK | TTYCLCKNGK | SREPMRKFIFG | GVVVAFMKAY | LGGDSSDLMA |
| 301 | IKGGQTGPVE | LQTVEYIIL | | | |

Figura 29 (SEQ ID n.º 18)

Sor_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | MATTPKVLEE | PPSAVITSVF | QPGKLAVEVI | SVEHDARPTP | PIPIILIAAP |
| 51 | KDAGTYPVAI | LLHGFFLQNR | YYEQLLKHVA | SFGFIMVAPQ | FHTSLISNSD |
| 101 | ADDIAAAKV | TDWLPEGLPT | VLPTGVEADL | SKLALAGHSR | GGHTAFSLAL |
| 151 | GYAKTNTSSL | LKFSALIGLD | PVAGTGKNSQ | LPPAILTYEP | SSFDIAPVPL |
| 201 | VIGTGLGDER | ENALFPPCAP | VEVNHAEFYR | ECRAPCYHLV | TKDYGHLDML |
| 251 | DDDAPKLVTC | LCKEGNTCKD | VMRRTVAGIM | VAFLKAVMGE | DEDGDLKAIL |
| 301 | QHPGLAPTIL | DPVEYRLA | | | |

Figura 30 (SEQ ID n.º 19)

SORG_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|-------------|------------|
| 1 | MASPVAISTT | AVFKRGRHPV | DTKHVDHSQV | PGVPKPLMVV | TPTDAGVYPV |
| 51 | AVFLHGCSMY | NSWYQTLISH | VASHGFIAVA | PQLGGILPPL | DMKDLKDIDA |
| 101 | TRKVTAWLAD | NLAHVLTNIL | HLHGVTPLDS | RLALAGHSRG | GDTAFAVALG |
| 151 | LGSSSSSSDT | TPLKFSALIG | VDPVAGLSKE | LQLEPKVLTTF | EPRSLDPGMP |
| 201 | ALVVGTGLGP | KGLLPCAPAG | VSHGEFYDEC | APPRYHVVVV | DYGHLDMLDD |
| 251 | DGVVYVISNC | MCKRNTNTTK | DLARRAIGGA | MVAFLRAKLE | DDDEDLRAVL |
| 301 | QNSPGLSPAV | LDPVEYDDDE | AMDGPGCAGN | NGVAGASG | |

Figura 31 (SEQ ID n.º 20)

Vitis_CHL

| | | | | | |
|-----|------------|------------|------------|------------|------------|
| 1 | MALLGGNPST | QGIKLDLKT | TSVFEPGNLS | VTCIRVETSN | IASPPKPLLI |
| 51 | VTPTIQGTYP | VLLFLHGFEL | RNTFYTQLLQ | LISSHGIVV | APQLYGLLPP |
| 101 | SGIQEIKSAA | AVTNWLSSGL | QSVLPENVKP | DLLKLALSGH | SRGGKTAFAL |
| 151 | ALGYADTSLN | FSALLGLDPV | GGLSKCSQTV | PKILTYVPHS | FNLAIPVCVI |
| 201 | GTGLGDEPRN | CLTCPCAPDG | VNHVEFFSEC | KPPCSHFVTT | EYGHLDMLDD |
| 251 | HLSGCIGAIS | GYICKSGKGP | RDPMRRCVGG | LFVAFLKAYL | EGQTGDFKAI |
| 301 | VDEPDLAPVK | LDPVEFIEA | | | |

Figura 32 (SEQ ID n.º 21)

PHYS_CHL
 1 MEDPIPNVHG GIYEDGPFKI EIVHVDDASS SSTCLKKSRA AVDRENLSPK
 51 PLVVALPKEE GVYPVIQFHH GFTLQNMFY S QIISHIASYG FIVVAPQMYK
 101 ISGSDATTEI EDAVQILNWM PTGLVAALPE T LSKHRPDFS KVALVGHSRG
 151 AKVVVFLALG VRNSILQYSA VVGLDPVDGM GIGQQTNPPI LQFSEGSLNL
 201 GVPTLIIGTG LGPLRKNFLF PACAPAGVSH EAFYD SAAP AFHFVASKQG
 251 HMDFLNDDCS GPTGMFSYCL CKNGPTRKPM RRFSGGMVVA FLRAAFFGET
 301 APLVAALATP ELAPIPLDRP EFKGKLGDAF NKPMLAPALT P

Figura 33 (SEQ ID n.º 22)

AQU_CHL
 1 MTTSLPPP KP LLIATPSEEG QFPVLIFLHG FLLFNKFYSQ LIQHIASHGF
 51 IVIAPQLYKV AGPDTTDEIK SAALVIDWLS NGLHSVLPPL VQP NLSKLG I
 101 GGHSRGGKVA FALALGHIKT SLKYSVLLGI DPVDGMGQGN QTPPPVLTYT
 151 PRSFDNFMPV LVIGSGLGET KKNSLFPPCA PKGVNHENFY SECCSPACYF
 201 VVKDYGHMDM LDDDTGGVRG KATYCTCSNG KAREPMRTFV GGIMVAFMKA
 251 YMENDSRDLM AIKETQGMAL IELQSVFRL

Figura 34 (SEQ ID n.º 23)

BRACH_CHL
 1 MAATAAAAEL KKNSGADVLE AVITSVFQPG KLAVEVIQVD HNAVPTPPIP
 51 VLIVAPKDAG TYPVAMLLHG FFLQNHYYKQ LLRHVASHGF IMVAPQFHLS
 101 MIPTGDTKDI EAAAKVSDWL PEG LPSVLPK GVEPELSKLA LAGHSRGGHT
 151 AFSLALGHAK SNLSFSALIG IDPVAGTGKS SQLAPKILTY EPSSFNMSAA
 201 MPVLVIGTGL GEEKKNIFTP PCAPKDVNHR EFYLECKPPC YFVTKDYGH
 251 LDMLDDDAPM VITCLCKDGG SCKDKMRRCV AGIMVAFLNS ALGGKD NAAH
 301 DLEVIVK DPA LAPTTLDPVE CRLE

Figura 35 (SEQ ID n.º 24)

MED_CHL
 1 MCSSVSNVFE TGNYTTKLLR VDSCSHAQNV PPPKSLLIAT PIEGGEFPLL
 51 LFLHGYLLLN SFYSQLIQHV ASHGFI VIAP QLYTVAGPDI TEEIYSVA AI
 101 TNWLSKGLSK ILPLNIKPNF HKLALGGHSR G GKT SFAVAL RKLNM TTDLK
 151 FSAIIGVDPV DGMDKGKQTS PPIFTYVPHS FDYDMATLVI GFGLGDVKKN
 201 PLFPPCAPKG VNHEDEFSEC EKPSWYFVAK DYGHVDMLDD DTKGVRGKVS
 251 YCLCKNGESR KPMRMFVGGV MVAFLKAYLH GDNVDLLAIR DKNLSVPIEM
 301 KFDYFV

Figura 36 (SEQ ID n.º 25)

```

PIP_CHL
  1   MAASSVFEMG KLEVHVKS VN QSNSSSPPKS LLISYPSQKG DYGVVFLFHG
 51   FLISNSFYKE LISHISSHGY IVVAPRIIYP CLQDEINSAA QVANWLPEGL
101   QAALPPNVQP NTSKLTLAGH SRGGKAAF CM LLGLAGSPLT VQFSGLIGVD
151   PVAGFQIPGI NYKMEIPPKI ITNNSKPFDI NVPTLIIGTE LGEEAKGCLA
201   PPYAPAGLNY EQFYEKSKEP SYQFVAKGYG HVDMLDDISK NDLMGKLTYC
251   VCKNGKERE P MRRTAGGLMV AFLKAFSDGQ RDDLDAILND PELAPIQLDA
301   GAKLSS

```

Figura 37 (SEQ ID n.º 26)

```

LOTUS_CHL
  1   MSLSISSVTH PSSVMGSDAS TALTNVFD SG KYTTKFQRIE SNSCNGTHPD
 51   PPPPKSLLIA TPLEGGEFPV LLFLHGYLLY NSFYSQLIQH IASHGFIVIA
101   PQLYAVAGPD VSGEIHSTAA IKNLWSEGLS KFLPPNVTPN SSKLALAGHS
151   RGGKTAFAVA LRKLNITTDL KFSALVGVDP VDGLDRGKQT PPPVLTYPVP
201   SFDFDMPAMV IGSGLGDV KR NPLFPFCAPK TVNHEDFFNE CNKPAWYFVA
251   KDYGHVDMLD DDTNGIIGKA TYCLCKNGES RKPMRTFVGG LVVAFKAYL
301   QGDNRDSLAI KDKHLSAPVE LKFDYFV

```

Figura 38 (SEQ ID n.º 27)

```

ORYI_CHL
  1   MIAFAAQILA FCLLLLLLLL LQLQTTMAGD SSFSGVFDHG SHGVTLVKVD
 51   EAPRKCSSAA AAKTDDDDTA PAGGAPPKPL LVAAPCDAGV YPVVVFHGY
101   LAYNSFYSQL FEHVASHGFV VVGPQVNQSI LIYYFSYIRC LDRIPPTRST
151   RRAAVINWLA AGGLTSKLPP NVRADATKIS ISGHSRGGKV AFALALGHAN
201   VSLRGGAGGA TIAALVAVDP VDFATGKQT PPILTYGGA NSLRVPAPVM
251   VIGTGLGGLA RAAPLLPACA PPGVSHGEFY GECAAPACHL VARDYGH TDM
301   VVDVTPG SWA SLRVPCAGAS APGRPCV GSS SAPWSRS

```

Figura 39 (SEQ ID n.º 28)

```

ORYJ1_CHL
  1   MIAFAAQILA FCLLLLLLLL LQLQTTMAGD SSFSGVFDHG SHGVTLVKVD
 51   EAPRKCSSAA AAKTDDDDTA PAGGAPPKPL LVAAPCDAGV YPVVVFHGY
101   LAYNSFYSQL FEHVASHGFV VVGPQLYTMS GPDTTDEINS AAVINWLAA
151   GGLTSKLPPN VRADATKISI SGHSRGGKVA FALALGHANV SLRGGAGGAT
201   IAALVAVDPV DGFAAGKQTP PPILTYGGAN SLRVPA PVMV IGTGLGGLAR
251   AAPLLPACAP PGVSHGEFYG ECAAPACHLV ARDYGH TDM DDVTPGARGL
301   ATRAVCRSGG ARAPMRRFFG GAMVAFVKRW VEPEPELLDC VRARPETAPV
351   VLSAVEFRDE AIANHSY

```

Figura 40 (SEQ ID n.º 29)

ORYJ2_CHL

```

1   MIAFAAQILA FCLLLLLLLL LQLQTTMAGD SSFSGVFDHG SHGVTLVKVD
51  EAPRKCSSAA AAKKTDDDTA PAGGAPPKPL LVAAPCDAGV YPVVVFLHGY
101 LAYNSFYSQL FEHVASHGFV VVGPQLFLGC ELILSNNFDA KMLYTMGPD
151 TTDEINSAAA VINWLAAGGL TSKLPPNVRA DATKISISGH SRGGKVAFAL
201 ALGHANQTPR PILTYGGANS LRLPAPVMVI GTGLGGLARA APLLACAPP
251 GVSHGEFYGE CAAPACHLVA RDYGHTDMMD DVTPGARGLA TRAVCRSGGA
301 RAPMRRFFGG AMVAFVKRWV EGEPELLDCV RARPETAPVV LSAVEFRDEA
351 IANHSY

```

Figura 41 (SEQ ID n.º 30)

PICEA_CHL

```

1   MGQQGEEPWE DVFKPGRFPV RILKIPQRTT HGSTTAAAPK PLLLLALPAQP
51  GEYPVLLFFH GYLLLNFSYT QLLQHIASHG YIAIAPQMYC VTGADATPEI
101 ADAAAICNWL LQGLSSYLPD DVRPDFQNVA MAGHSRGGKV AFGLALDRTS
151 QTTELKFSAL VGVDPVDGMA RGRQTQPRIL TYKPHSFDSV IPTLIVGSGL
201 GAVKRNPLFP PCAPEGVSHR EFFSECSAPA YHFVASDYGH MDFLDDDETGG
251 VKGQSSYCLC KNGVAREPMR RFCGGIIVAF LNVCLQNDSG AFNDLLVHPS
301 HAPVKLEPPE SFVSEVEHQA VESLLPQTV

```

Figura 42 (SEQ ID n.º 31)

CHL_CHL

```

1   MPSTQFLGAS TLLLFGLRAV MSSDDYIKRG DLPTSKWGR VTLRVDSAMA
51  VPLDVVITYP SSGAAAYPVL VMYNGFQAKA PWYRGIVDHV SSWGYTVVQY
101 TNGGLFPIVV DRVELTYLEP LLTWLETQSA DAKSPLYGRA DVSRLGTMGH
151 SRGGKLAALQ FAGRTDVSGC VLFDPVDGSP MTPESADYPS ATKALAAAGR
201 SAGLVGAAIT GSCNPVGQNY PKFWGALAPG SWQMVLSQLG HMQFARTGNP
251 FLDWSLDRLC GRGTMMSSDV ITYSAAFTVA WFEGIFRPAQ SQMGISNFKT
301 WANTQVAARS ITFDIKPMQS PQ

```

Figura 43

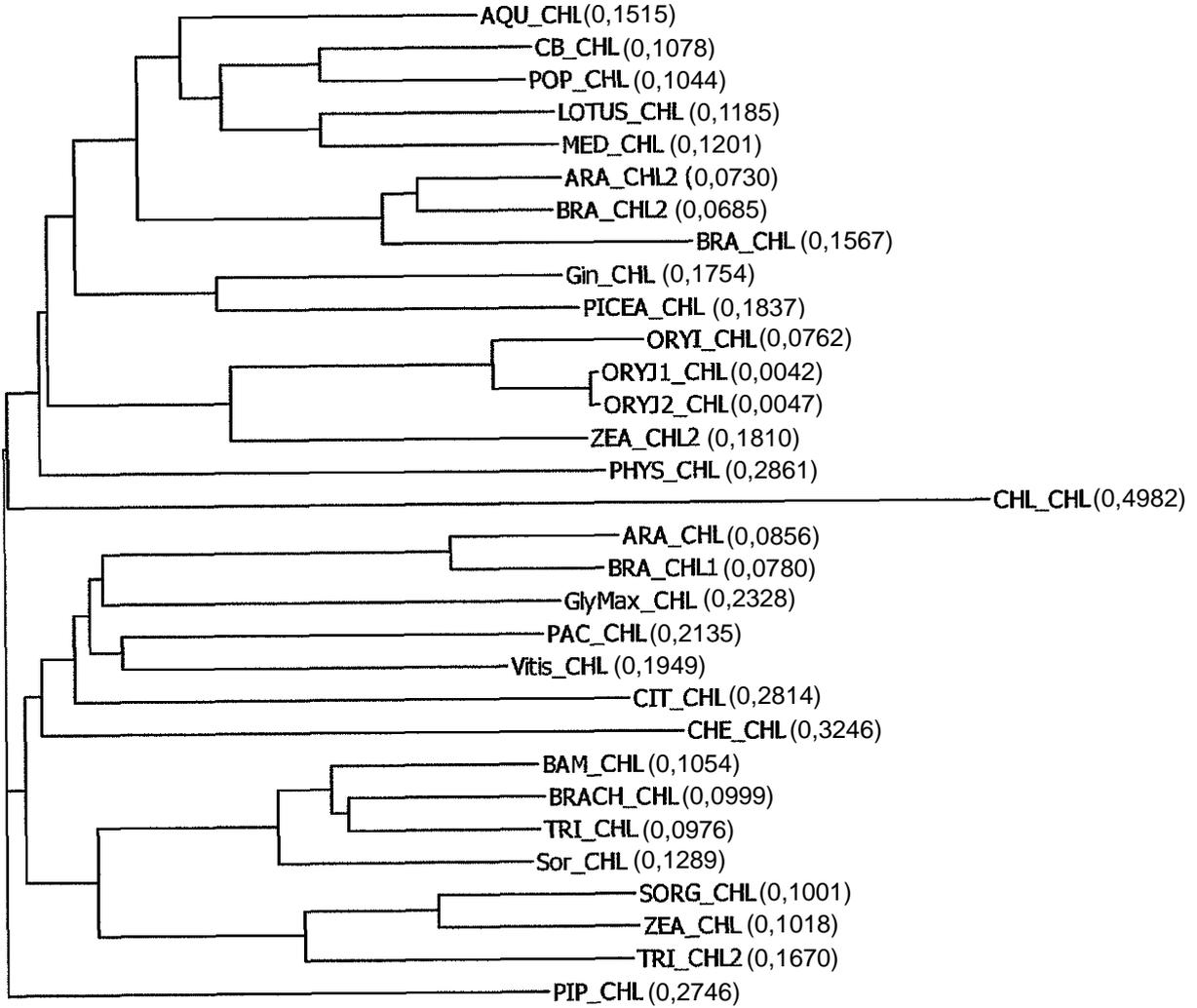


Figura 44

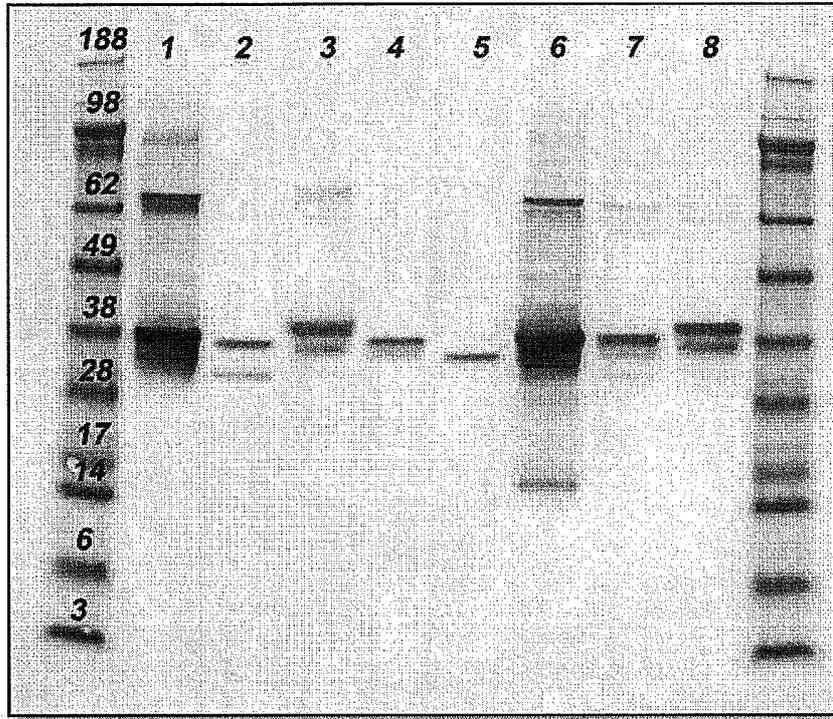


Figura 45

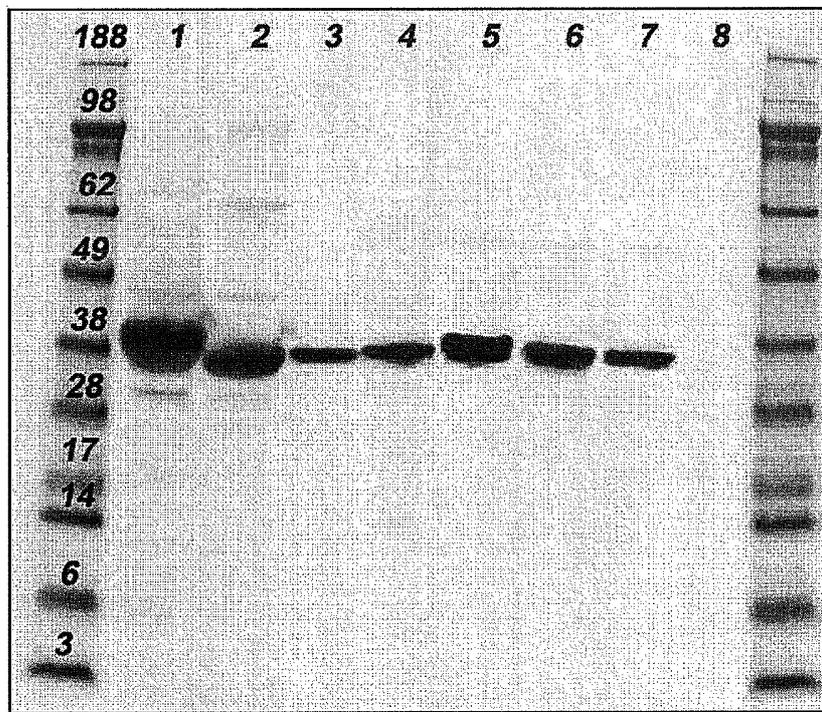


Figura 46

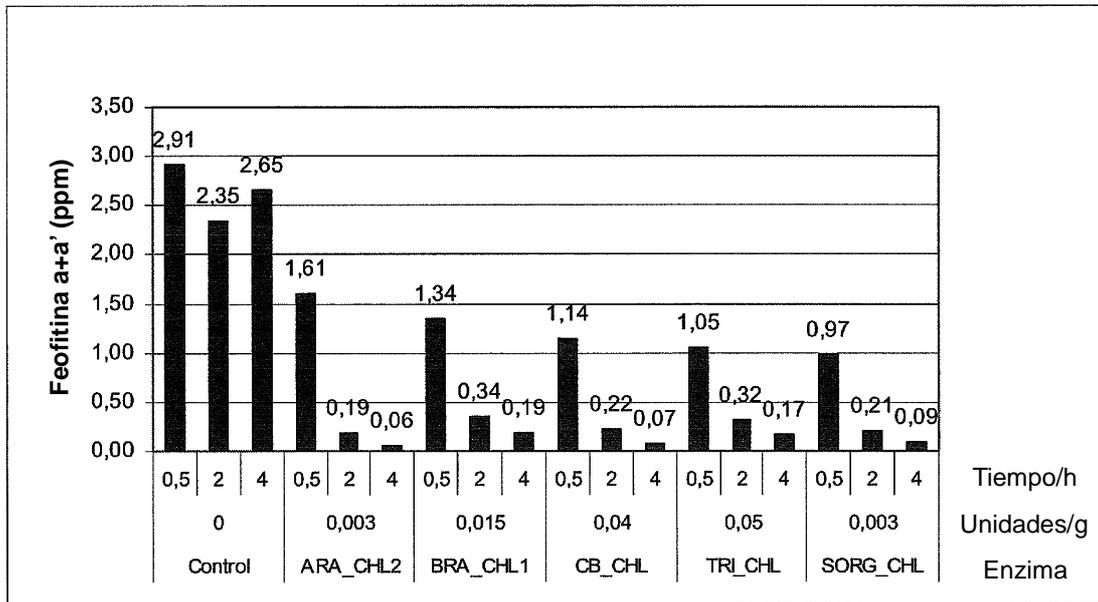


Figura 47

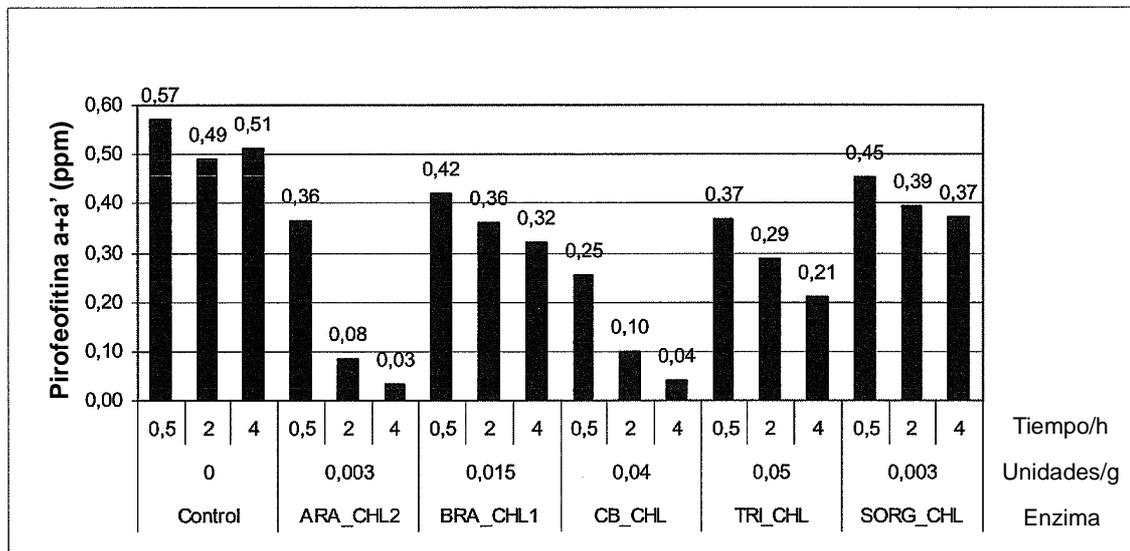


Figura 48

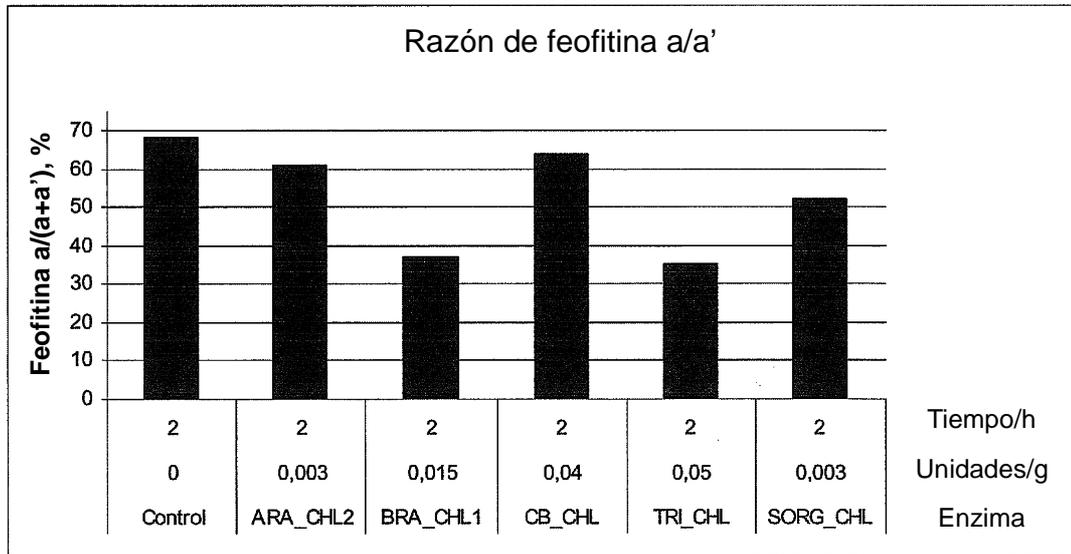
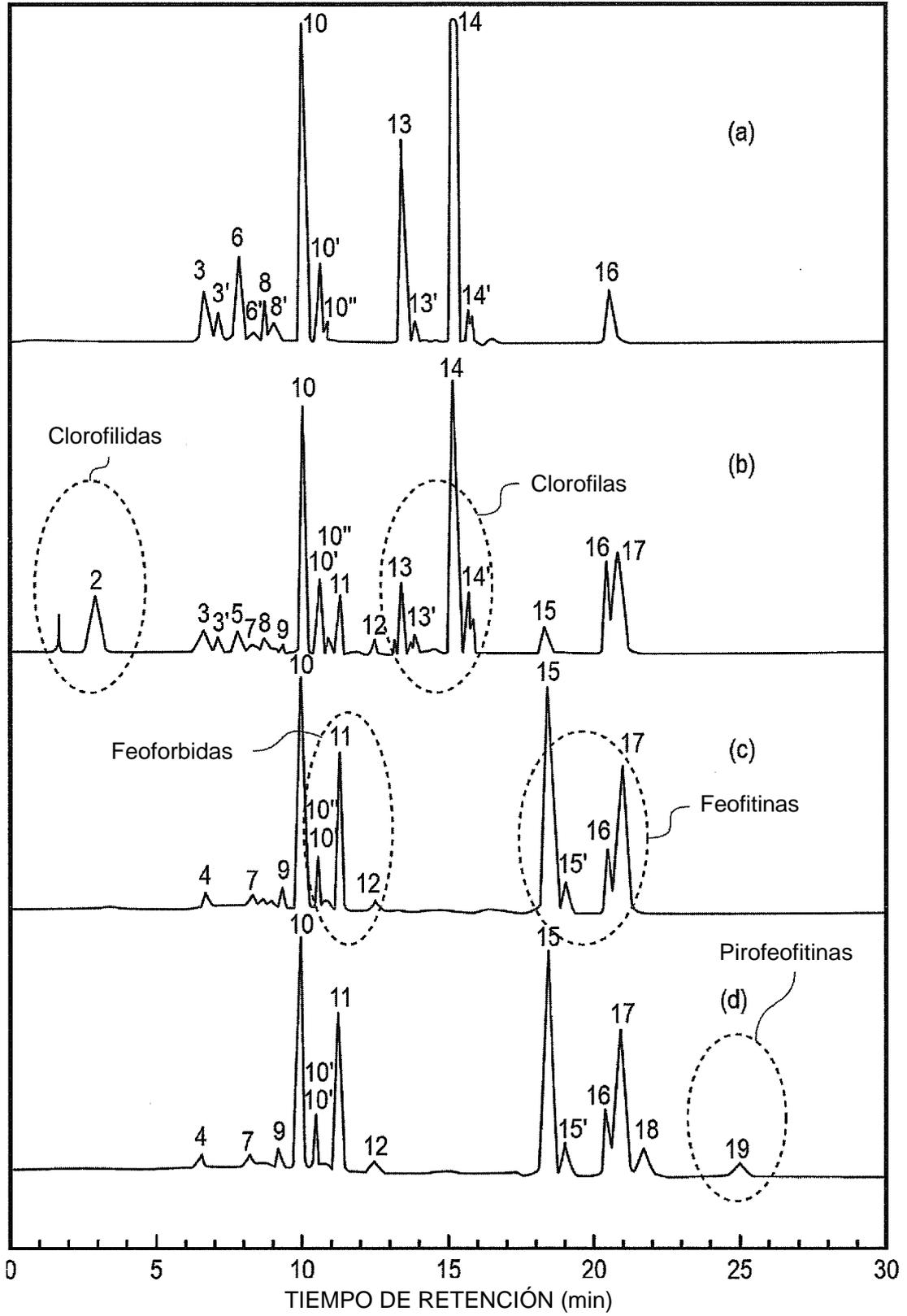


Figura 49



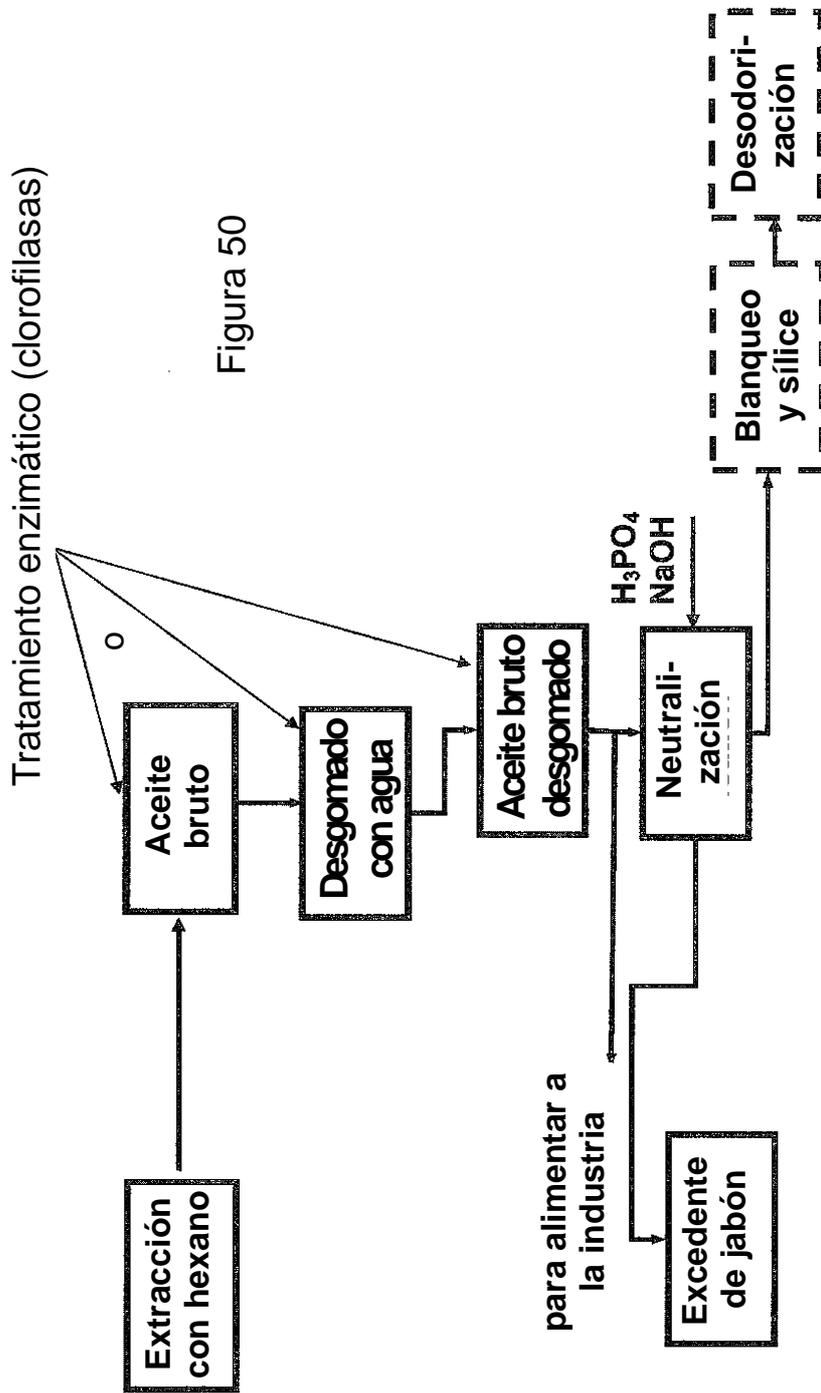


Figura 50

Figura 51

