

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 900**

51 Int. Cl.:

C12N 9/88 (2006.01)
C11B 3/00 (2006.01)
C11B 3/02 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
C12P 7/18 (2006.01)
C10L 1/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.10.2010** **PCT/US2010/051920**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011** **WO11046815**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.10.2010** **E 10765555 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018** **EP 2488639**

54 Título: **Métodos de desgomado de aceite**

30 Prioridad:

16.10.2009 US 252638 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2018

73 Titular/es:

BUNGE OILS, INC (100.0%)
11720 Borman Drive
St. Louis, MO 63146, US

72 Inventor/es:

DAYTON, CHRISTOPHER, L., G.;
GALHARDO, FLAVIO, DA SILVA;
BARTON, NELSON;
HITCHMAN, TIM;
LYON, JONATHAN;
O'DONOGHUE, EILEEN y
WALL, MARK, A.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 674 900 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

Métodos de desgomado de aceite

Campo de la invención

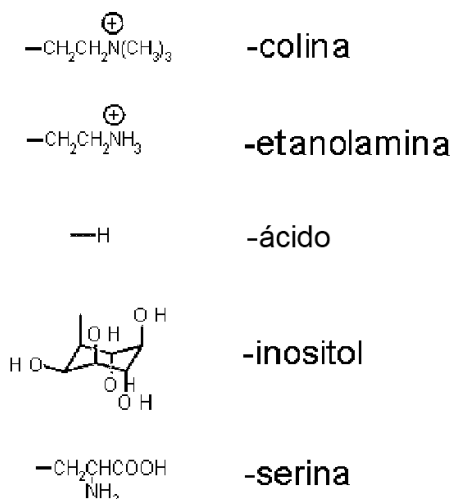
Esta invención se refiere en general a enzimas fosfolipasa, polinucleótidos que codifican las enzimas, métodos para hacer y usar estos polinucleótidos. Se proporcionan en la presente memoria enzimas fosfolipasa C específicas de fosfatidilinositol (PI-PLC), ácidos nucleicos que las codifican, anticuerpos que se unen específicamente a las mismas, y métodos para hacerlas y usarlas. Se proporcionan métodos y productos industriales que comprenden el uso de estas fosfolipasas. También se proporcionan en la presente memoria métodos para la hidratación de fosfolípidos no hidratables (NHP) dentro de la matriz lipídica. Los métodos permiten la migración de los NHP a una interfase de aceite-agua permitiendo así que los NHP que reaccionen y/o se separen de los lípidos. En algunas realizaciones, se proporcionan métodos para separar los NHP, fosfolípidos hidratables y lecitinas (conocidos colectivamente como "gomas") de aceites vegetales para producir un aceite desgomado o producto graso que se puede usar para la producción de alimentos y/o aplicaciones no alimentarias. En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente memoria métodos para la hidratación de los NHP seguido de tratamiento enzimático y separación de los diferentes fosfolípidos y lecitinas. Los métodos proporcionados en la presente memoria se pueden poner en práctica tanto en aceites brutos como desgomados con agua. En algunas realizaciones, se proporcionan en la presente memoria métodos para obtener fosfolípidos a partir de un aceite comestible.

Antecedentes

Los aceites vegetales brutos obtenidos por métodos de extracción por prensado o con disolvente son una mezcla compleja de triacilgliceroles, fosfolípidos, esteroides, tocoferoles, ácidos grasos libres, metales en trazas, y otros compuestos minoritarios. Es conveniente separar los fosfolípidos, ácidos grasos libres y metales en trazas con el fin de producir un aceite de ensalada de calidad con un sabor suave, color ligero y una larga vida en anaquel, o aceite adecuado para la transformación en una materia prima para la conversión química o enzimática en biocombustible (ésteres de metilo o etilo), bioplástico (aceite epoxidado) y otras materias basadas en el petróleo tradicionales.

La separación de fosfolípidos genera prácticamente todas las pérdidas asociadas con el refinado de los aceites vegetales. La mayoría de las moléculas de fosfolípido tienen tanto un grupo funcional hidrófilo como cadenas de ácido graso lipófilas, tienden a ser emulsionantes naturales excelentes. El grupo funcional en los fosfolípidos puede ser cualquiera de una variedad de tipos conocidos, algunos de los cuales se ilustran en el siguiente esquema 1.

Esquema 1: Grupos funcionales en fosfolípidos



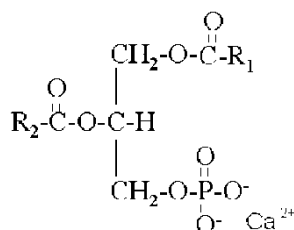
Grupos funcionales

Los fosfolípidos que contienen los grupos funcionales colina, inositol y etanolamina tienen la mayor afinidad por el agua, mientras que los ácidos, sales de ácidos (calcio (Ca), magnesio (Mg), y hierro (Fe)), y sales de etanolamina (Ca, Mg, y Fe) tienen afinidades mucho menores por el agua. El ácido fosfatídico y las sales del ácido fosfatídico se conocen normalmente como "fosfolípidos no hidratables" o NHP. La tabla 1 contiene tasas relativas de hidratación de diferentes fosfolípidos descritas por Sen Gupta, A. K., *Fette Seifen Anstrichmittel* 88 páginas 79 - 86 (1986). y más tarde por Segers, J.C., et al., "Degumming - Theory and Practice" publicado por la American Oil Chemists's Society en "Edible fats and Oils processing: basic principals and modern practices: World conference proceedings" / editado por David Erickson, (1990) páginas 88-93.

Tabla 1: Tasas relativas de hidratación

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

Las sales de calcio, magnesio y hierro de los fosfolípidos se forman por una enzima presente en las semillas oleaginosas, la fosfolipasa D (PLD). La enzima permanece latente dentro de la semilla madura hasta que el recubrimiento protector de la semilla se ha dañado durante el almacenamiento o las "preparaciones" de la semilla antes de separarla del aceite. La reacción de la PLD dentro de la semilla escindiría la colina, inositol, serina o etanolamina del grupo fosfato dando el ácido fosfatídico (PA). Además, puesto que la escisión se produce en presencia de una abundancia de metales divalentes (Ca, Mg y Fe), se forman los NHP. El complejo del ion calcio y el ácido fosfatídico se muestra a continuación



Sal de calcio del ácido fosfatídico

Los fosfolípidos normalmente se miden en el aceite como "contenido de fósforo" en partes por millón. La tabla 2 da las cantidades típicas de fosfolípidos presentes en los cultivos de semillas oleaginosas principales, y la distribución de los diferentes grupos funcionales como porcentaje de los fosfolípidos presentes en el aceite.

Tabla 2: Niveles típicos y distribuciones de fosfolípidos en semillas oleaginosas comunes

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

La tabla 3 a continuación proporciona las cantidades típicas de fosfolípidos para las gomas de soja. En la tabla 3, "tal como está" significa la composición de fosfolípidos típica separada del aceite vegetal con el aceite arrastrado (2 moléculas de fosfolípidos y 1 molécula de aceite), que da un contenido insoluble en acetona de 67%. "Normalizado" significa la composición de fosfolípidos sin nada de aceite presente, que da un contenido insoluble en acetona de 100%.

Tabla 3: Cantidades típicas de fosfolípidos y distribuciones para las gomas de soja

	Porcentaje "tal como está"	Porcentaje "Normalizado"
Fosfatidilcolina (PC)	33,9	47,2
Fosfatidiletanolamina (PE)	14,3	19,9
Fosfatidilserina (PS)	0,4	0,6
Ácido fosfatídico (PA)	6,4	8,9
Fosfatidilinositol (PI)	16,8	23,4
Total	71,8	100,0

La conversión de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico en sus formas liso o fosfo, cambia mucho la economía del desgomado en una operación de refinado industrial moderna. La conversión de todos los fosfolípidos en sus formas liso elimina la pérdida de aceite neutro y aumenta el rendimiento

en hasta 1,4%, mientras que convertir todos los fosfolípidos en sus formas fosfo representa un aumento de rendimiento de aceite de hasta 3,0% para un aceite bruto frente a desgomado con agua que contiene 1000 ppm de fósforo.

5 Los fosfolípidos se pueden separar parcial o totalmente de los aceites vegetales por varios medios diferentes conocidos. Los procedimientos usados más habitualmente en la industria son el desgomado con agua, desgomado con ácido, refinado cáustico y desgomado enzimático. Los procedimientos de ejemplo se describen en las patentes de EE.UU. nº 4.049.686; 4.698.185; 5.239.096; 5.264.367; 5.286.886; 5.532.163; 6.001.640; 6.103.505; EE.UU. 6.127.137; 6.143.545; 6.172.248; 6.548.633; 7.494.676; y 7.226.771, y publicaciones de EE.UU. 2007/0134777, 2005/0059130, 2008/0182322 y 2009/0069587.

10 El documento WO2009/088980 describe procedimientos de desgomado con aceite bruto comestible, donde a la adición secuencial de ácido y base le sigue el desgomado enzimático.

Los métodos existentes no son suficientes para separar o hacer reaccionar los fosfolípidos no hidratables presentes en el aceite porque los NHP no están disponibles para ser hidratados o para reaccionar para permitir su separación.

15 Son necesarios métodos económicos y efectivos para separar los NHP, fosfolípidos hidratables y lecitinas (conocidos colectivamente como "gomas") de los aceites vegetales, para producir un aceite o producto graso desgomado que se pueda usar para la producción de alimentos y/o aplicaciones no alimentarias.

20 Las fosfolipasas son enzimas que hidrolizan los enlaces éster de los fosfolípidos. De acuerdo con su importancia en el metabolismo de los fosfolípidos, estas enzimas están ampliamente extendidas entre procariotas y eucariotas. Las fosfolipasas afectan al metabolismo, construcción y reorganización de membranas biológicas y están implicados en cascadas de señales. Se conocen varios tipos de fosfolipasas que difieren en su especificidad de acuerdo con la posición del enlace atacado en la molécula de fosfolípido.

Las enzimas fosfolipasas C específicas de fosfatidilinositol (PI-PLC) son una familia de enzimas intracelulares eucariotas que tienen una función importante en los procesos de transducción de señales. La reacción catalizada por la PI-PLC es:

25 1-fosfatidil-1D-mio-inositol-4,5-bisfosfato (también llamado PIP_2 , fosfatidilinositol-bisfosfato) + H_2O $\leftrightarrow$ 1D-mio-inositol-1,4,5-trisfosfato (también llamado IP_3 , inositol-trifosfato) + diacilglicerol

30 Se han identificado familias de enzimas fosfolipasas C (PLC) en bacterias y en tripanosomas eucariotas. Las enzimas PLC pertenecen a la familia de hidrolasas y fosfodiesterasas. Las PLC participan en el metabolismo del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) y rutas de señalización de lípidos de una forma dependiente del calcio. Las isoformas de la PLC pueden diferir en su modo de activación, niveles de expresión, regulación catalítica, localización celular, avidéz de unión a la membrana y distribución tisular. Todas pueden catalizar la hidrólisis del PIP_2 en dos moléculas segundos mensajeros importantes, que van a alterar respuestas celulares tales como proliferación, diferenciación, apoptosis, remodelado de citoesqueleto, tráfico vesicular, conductancia de canales de iones, función endocrina y neurotransmisión. Se describen PLC, por ejemplo, en Carmen, G., *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 18711-18714, Jianag, Y., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 29528-29532, Waggoner, D., *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 19422-19429, Molecular Probes Product Sheet 2001, y Sano et al., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 281:844-851, 2001.

40 Las enzimas fosfolipasa A1 (PLA1) eliminan la posición 1 del ácido graso para producir ácido graso y 1-liso-2-acilfosfolípido. Las enzimas fosfolipasa A2 (PLA2) eliminan la posición 2 del ácido graso para producir ácido graso libre y 1-acil-2-lisofosfolípidos. Las enzimas PLA1 y PLA2 pueden ser intra o extra-celulares, unidas a membrana o solubles. La PLA2 intracelular se encuentra en prácticamente todas las células de mamífero. Las enzimas fosfolipasa C (PLC) eliminan el resto fosfato para producir 1,2-diacilglicerol y un éster de fosfato. Las enzimas fosfolipasa D (PLD) producen 1,2-diacilglicerolfosfato y grupo base.

Resumen de la invención

45 En un aspecto, la invención proporciona un método para el desgomado de un aceite bruto comestible que comprende: i) mezclar un ácido acuoso con el aceite bruto comestible para obtener una mezcla ácida que tiene un pH menor que aproximadamente 4; ii) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene pH de aproximadamente 6-9; y iii) desgomado enzimático para obtener un aceite desgomado, en donde la enzima comprende la SEQ ID NO: 8; en donde el mezclamiento en las etapas i) y/o ii) crea una emulsión que comprende (a) al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen de tamaño de gotas de
50 aproximadamente 15 μm a aproximadamente 45 μm de tamaño, o (b) una fase acuosa de tamaño de gotas medio de aproximadamente 15-35 μm .

En una realización el aceite desgomado comprende menos de aproximadamente 30 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 20 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 15 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 10 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 7 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 5 ppm de fósforo o
55 menos de aproximadamente 3 ppm de fósforo.

En otra realización la emulsión comprende al menos aproximadamente 90% de la fase acuosa en volumen de tamaño de gotas de aproximadamente 15-45 μm , 20-40 μm , 20-45 μm , 25-40 μm , 20-35 μm , 30-40 μm , 35-40 μm , o 25-45 μm .

En otra realización, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, y una de sus mezclas.

En otra realización, el pH de la mezcla ácida en la etapa i) es de aproximadamente 1 a aproximadamente 4.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para obtener un fosfolípido que comprende: i) mezclar un ácido acuoso con el aceite bruto comestible para obtener una mezcla ácida que tiene un pH menor que aproximadamente 4; ii) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene pH de aproximadamente 6-9, en donde el mezclado en las etapas i) y/o ii) crea una emulsión que comprende (a) al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen de tamaño de gotas de aproximadamente 15 μm a aproximadamente 45 μm de tamaño, o (b) una fase acuosa de tamaño de gotas medio de aproximadamente 15-35 μm ; iii) mezclar una enzima fosfolipasa, en donde la enzima comprende la SEQ ID NO:8; y iv) aislar el fosfolípido.

En una realización, el fosfolípido comprende fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilserina (LPS), lisofosfatidilinositol (LPI), ácido lisofosfatídico (LPA), colina (C), etanolamina (E), serina (S), inositol (I) o una combinación de los mismos.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para obtener inositol que comprende: i) mezclar un ácido acuoso con un aceite bruto comestible para obtener una mezcla ácida que tiene un pH menor que aproximadamente 4; ii) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene pH de aproximadamente 6-9, en donde el mezclado en las etapas i) y/o ii) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen de tamaño de gotas entre aproximadamente 15 μm y aproximadamente 45 μm de tamaño; iii) mezclar una enzima fosfolipasa, en donde la enzima comprende la SEQ ID NO:8; y iv) aislar el inositol.

Se proporcionan en la presente memoria polipéptidos y polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) o actividad enzimática equivalente, y/o otra actividad de fosfolipasa, que incluyen una fosfolipasa A, B, C, D, patatina, ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) y/o lípido acil hidrolasa (LAH) o actividad enzimática equivalente, y métodos para hacer y usar estos polinucleótidos y polipéptidos. También se proporcionan en la presente memoria polipéptidos, p. ej., enzimas que tienen una actividad enzimática, p. ej., actividad de fosfolipasa A, B, D o C, p. ej., actividad de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC). Las actividades enzimáticas de los polipéptidos y péptidos proporcionados en la presente memoria incluyen (comprenden o consisten en) una actividad de fosfolipasa, una actividad de fosfolipasa C, una actividad de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), que incluyen hidrólisis de lípidos, reacciones de acidólisis (p. ej., sustituir un ácido graso esterificado por un ácido graso libre), reacciones de transesterificación (p. ej., intercambio de ácidos grasos entre triacilglicéridos), síntesis de ésteres, reacciones de intercambio de éster y actividad de lípido acil hidrolasa (LAH). Los polipéptidos proporcionados en la presente memoria se usan para sintetizar productos quirales enantioméricamente puros. Los polipéptidos proporcionados en la presente memoria se pueden usar en una variedad de contextos farmacéuticos, agrícolas e industriales, que incluyen la fabricación de cosméticos y productos nutracéuticos. Además, los polipéptidos proporcionados en la presente memoria se pueden usar en el procesamiento de alimentos, fabricación de cerveza, aditivos de baños, producción de alcohol, síntesis de péptidos, enantioselectividad, preparación del cuero en la industria del cuero, gestión de residuos y degradación de residuos animales, recuperación de plata en la industria fotográfica, tratamiento médico, desgomado de piel, degradación de biopelículas, conversión de biomasa en etanol, biodefensa, agentes antimicrobianos y desinfectantes, productos para el cuidado personal y cosméticos, reactivos biotecnológicos, en el aumento del rendimiento del almidón a partir de la molienda del maíz húmedo, y como productos farmacéuticos tales como ayudantes de digestión y agentes antiinflamatorios (antiflogísticos).

Se proporcionan en la presente memoria composiciones (p. ej., fosfolipasa, fosfolipasa C, fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC)) y métodos para producir aceites con bajo contenido de fosfolípidos, p. ej., aceites con un contenido menor de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y/o ácido fosfatídico. Cualquier aceite, p. ej., aceite vegetal, p. ej., aceite de canola, aceite de soja, o aceite o grasa animal, p. ej., sebo, se puede tratar con una composición, o por un método, como se proporciona en la presente memoria. Cualquier alimento, artículos comestibles, o productos horneados, fritos o cocidos (p. ej., salsas, adobos, condimentos, aceites en aerosol, margarinas, aceites para hornear, mayonesa, aceites de cocina, aceites para ensaladas, aderezos para servir con cuchara y vertibles y similares, y productos hechos con los mismos) puede comprender un aceite vegetal o grasa animal que se ha tratado con una composición o por un método proporcionado en la presente memoria. Los aceites vegetales modificados para ser aceites con menor contenido de fosfolípidos se pueden usar en cualquier alimento, artículo comestible o producto horneado o cocinado, p. ej., salsas, adobos, condimentos, aceites en aerosol, margarinas, aceites para hornear, mayonesa, aceites de cocina, aceites para ensaladas, aderezos para servir con cuchara y vertibles y similares. Se proporcionan en la presente memoria aceites, tales como aceites vegetales, p. ej., aceite de canola o aceite de soja, y alimentos o productos horneados o cocinados, que incluyen

salsas, adobos, condimentos, aceites en aerosol, margarinas, mayonesa, aceites para hornear, aceites de cocina, aceites para freír, aceites para ensaladas, aderezos para servir con cuchara y vertibles y similares, en donde el aceite o alimento, producto horneado o cocinado se ha modificado usando una enzima como se proporciona en la presente memoria. En un caso, estos aceites vegetales, p. ej., aceite de canola, aceite de ricino, aceite de coco, 5 aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de avellana, aceite de cáñamo, aceite de linaza, aceite de semilla de semilla de *Limnanthes*, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de resina, aceite de tsubaki, variedades de aceites "naturales" que tienen composiciones de ácidos grasos alteradas por organismos genéticamente modificados (OGM) o "cruce" tradicional tal como aceites alto oleico, bajo linoleico o bajos saturados (aceite de canola alto oleico, aceite de soja bajo 10 linoleico o aceites de girasol alto esteárico), grasas animales (sebo, manteca de cerdo, grasa de mantequilla y grasa de pollo), aceites de pescado (aceite de eulachon, aceite de hígado de bacalao, aceite de reloj anaranjado, aceite de sardina, aceite de arenque y aceite de lacha), o mezclas de cualquiera de los anteriores, y alimentos o productos horneados, fritos o cocinados, comprenden aceites con un contenido menor de ácido graso saturado, incluyendo aceites bajos en ácido palmítico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido esteárico, ácido caprílico (ácido octanoico) etc., 15 procesados usando una composición o métodos proporcionados en la presente memoria.

Se proporcionan en la presente memoria polipéptidos, por ejemplo, enzimas y anticuerpos catalíticos, que tienen una actividad de fosfolipasa, p. ej., fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), que incluyen actividades enzimáticas termoestables y termotolerantes, y actividades específicas de ácidos grasos y selectivas de 20 ácidos grasos y actividades enzimáticas tolerantes a pH bajo o alto, y polinucleótidos que codifican estos polipéptidos, incluyendo vectores, células hospedantes, plantas transgénicas y animales no humanos, y métodos para hacer y usar estos polinucleótidos y polipéptidos.

Se proporcionan en la presente memoria ácidos nucleicos sintéticos o recombinantes, aislados (a) que codifican un polipéptido que tiene actividad de una enzima fosfolipasa, p. ej. una fosfolipasa C, p. ej. una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), y 25

(i) que tiene al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o 100% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 5, y que codifica un polipéptido que tiene al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, 30 siete, ocho, nueve diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis, veintisiete, veintiocho, veintinueve o treinta o más, o todos, los cambios (mutaciones) de aminoácidos que consisten en los descritos en la tabla 12, tabla 13, tabla 14 y/o tabla 15, o sustituciones o mutaciones de aminoácidos equivalentes, o cualquiera de sus combinaciones,

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

35 y opcionalmente el algoritmo de comparación de secuencias es un algoritmo BLAST versión 2.2.2 en donde un parámetro de filtrado se ajusta a `blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F`, y todas las demás opciones se ajustan por defecto;

(ii) codifica un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6 y que tiene al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve diez, once, doce, trece, catorce, quince, 40 dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis, veintisiete, veintiocho, veintinueve o treinta o más, o todos, los cambios o sustituciones (mutaciones) de aminoácidos que consisten en los descritos en la tabla 12, tabla 13, tabla 14 y/o tabla 15, o cambios o sustituciones (mutaciones) de aminoácidos equivalentes, o cualquiera de sus combinaciones; o

(iii) hibrida en condiciones restrictivas con un ácido nucleico que comprende la SEQ ID NO: 5 y codifica un polipéptido que tiene al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve diez, once, doce, trece, catorce, 45 quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro, veinticinco, veintiséis, veintisiete, veintiocho, veintinueve o treinta o más, o todos, los cambios (mutaciones) de aminoácidos que consisten en los descritos en la tabla 12, tabla 13, tabla 14 y/o tabla 15, o cambios o sustituciones (mutaciones) de aminoácidos equivalentes, o cualquiera de sus combinaciones,

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

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

(v) que tiene al menos aproximadamente 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o 100% de identidad de 55 secuencia con la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10;

(b) la secuencia de ácido nucleico de (a) que codifica un polipéptido que tiene la actividad enzimática de fosfolipasa, p. ej. una fosfolipasa C, p. ej. una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) pero que carece de una secuencia de señal natural o secuencia de aminoácidos de proproteína;

5 (c) la secuencia de ácido nucleico de (a) o (b) que codifica un polipéptido que tiene la actividad enzimática de fosfolipasa, p. ej. una fosfolipasa C, p. ej. una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) pero carece de una secuencia de promotor natural;

(d) el ácido nucleico de (c) que además comprende una secuencia de promotor heterólogo u otra secuencia de regulación transcripcional;

10 (e) la secuencia del ácido nucleico de cualquiera de (a) a (d) que además comprende ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos heteróloga, o además comprende una secuencia de nucleótidos heteróloga;

(f) el ácido nucleico de (e), en donde el ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos heteróloga comprende, consiste en, una secuencia que codifica una secuencia señal (líder) heteróloga, o un marcador o un epítopo, o la secuencia de nucleótidos heteróloga comprende una secuencia de promotor heterólogo;

15 (g) el ácido nucleico de (d), (e) o (f), en donde la secuencia de nucleótidos heteróloga codifica una secuencia señal (líder) heteróloga que comprende o consiste en una extensión N-terminal y/o C-terminal para dirigirse a un retículo endoplásmico (ER) o endomembrana, o a un sistema de retículo endoplásmico (ER) o endomembrana de planta, o la secuencia heteróloga codifica un sitio de restricción;

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

(i) el ácido nucleico de cualquiera de (a) a (h), en donde la actividad de fosfolipasa, p. ej. una fosfolipasa C, p. ej. una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) es termostable;

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

25 (k) una secuencia de ácido nucleico completamente complementaria a la secuencia de nucleótidos de cualquiera de (a) a (j).

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

Los polipéptidos proporcionados en la presente memoria pueden ser termotolerantes y pueden retener actividad de una fosfolipasa, p. ej. una fosfolipasa C, p. ej. una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) después de exposición a una temperatura en el intervalo de aproximadamente -100°C a aproximadamente -80°C, de aproximadamente -80°C a aproximadamente -40°C, de aproximadamente -40°C a aproximadamente -20°C, de aproximadamente -20°C a aproximadamente 0°C, de aproximadamente 0°C a aproximadamente 5°C, de aproximadamente 5°C a aproximadamente 15°C, de aproximadamente 15°C a aproximadamente 25°C, de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, de aproximadamente 37°C a aproximadamente 45°C, de

aproximadamente 45°C a aproximadamente 55°C, de aproximadamente 55°C a aproximadamente 70°C, de aproximadamente 70°C a aproximadamente 75°C, de aproximadamente 75°C a aproximadamente 85°C, de aproximadamente 85°C a aproximadamente 90°C, de aproximadamente 90°C a aproximadamente 95°C, de aproximadamente 95°C a aproximadamente 100°C, de aproximadamente 100°C a aproximadamente 105°C, de aproximadamente 105°C a aproximadamente 110°C, de aproximadamente 110°C a aproximadamente 120°C, o 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C o más.

Los polipéptidos termotolerantes retienen la actividad de una fosfolipasa, p. ej. una fosfolipasa C, p. ej. una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), después de exposición a una temperatura en los intervalos descritos antes, a aproximadamente pH 3,0, aproximadamente pH 3,5, aproximadamente pH 4,0, aproximadamente pH 4,5, aproximadamente pH 5,0, aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 8,0, aproximadamente pH 8,5, aproximadamente pH 9,0, aproximadamente pH 9,5, aproximadamente pH 10,0, aproximadamente pH 10,5, aproximadamente pH 11,0, aproximadamente pH 11,5, aproximadamente pH 12,0 o más.

Se proporcionan en la presente memoria sondas de ácido nucleico o cebadores de amplificación para aislar, hacer y/o identificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC). En algunos casos, una sonda de ácido nucleico, p. ej., una sonda para identificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), comprende una sonda que comprende o consiste en al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o más, bases consecutivas de una secuencia como se proporciona en la presente memoria, o sus fragmentos o subsecuencias, en donde la sonda identifica el ácido nucleico por unión o hibridación. La sonda puede comprender un oligonucleótido que comprende al menos aproximadamente de 10 a 50, aproximadamente de 20 a 60, aproximadamente de 30 a 70, aproximadamente de 40 a 80, o aproximadamente de 60 a 100 bases consecutivas de una secuencia que comprende una secuencia como se proporciona en la presente memoria, o sus fragmentos o subsecuencias. La sonda puede comprender un oligonucleótido que comprende al menos aproximadamente de 10 a 50, aproximadamente de 20 a 60, aproximadamente de 30 a 70, aproximadamente de 40 a 80, o aproximadamente de 60 a 100 bases consecutivas de una secuencia de ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, o una de sus subsecuencias.

En algunos casos, una pareja de secuencias de cebadores de amplificación para amplificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), comprende una pareja de cebadores que comprende o consiste en una pareja de cebadores capaz de amplificar un ácido nucleico que comprende una secuencia como se proporciona en la presente memoria, o sus fragmentos o subsecuencias. Uno o cada uno de los miembros de la pareja de secuencias de cebadores de amplificación puede comprender un oligonucleótido que comprende al menos aproximadamente de 10 a 50 bases consecutivas de la secuencia.

En algunos casos, los métodos para amplificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), comprende la amplificación de un ácido nucleico molde con una pareja de secuencias de cebadores de amplificación capaz de amplificar una secuencia de ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, o sus fragmentos o subsecuencias.

En algunos casos, vectores, casetes de expresión, vectores de expresión, plásmidos o vehículos de clonación comprenden un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria o sus subsecuencias. En algunos aspectos, el vector, casete de expresión, vector de expresión, plásmido o vehículo de clonación puede comprender o está contenido en un vector vírico, un fago, un fagémido, un cósmido, un fósrido, un bacteriófago, un cromosoma artificial, un vector adenovirus, un vector retrovirus o un vector vírico adenoasociado, o un cromosoma artificial bacteriano (BAC), un vector derivado de bacteriófago P1 (PAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC), o un cromosoma artificial de mamífero (MAC).

En algunos casos, los casetes de expresión comprenden un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria o una de sus subsecuencias. En algunos casos, el casete de expresión puede comprender el ácido nucleico que está operativamente unido a un promotor. El promotor puede ser un promotor vírico, bacteriano, de mamífero o de planta. En algunos casos, el promotor de planta puede ser un promotor de patata, arroz, maíz, trigo, tabaco o cebada. El promotor puede ser un promotor constitutivo. El promotor constitutivo puede comprender CaMV35S. En algunos casos, el promotor puede ser un promotor inducible. En algunos casos, el promotor puede ser un promotor específico de tejido o un promotor regulado ambientalmente o regulado por desarrollo. Por lo tanto, el promotor puede ser, p. ej., un promotor específico de semilla, específico de raíz, específico de tallo o inducido por abscisión. En un caso, el casete de expresión puede comprender además un vector de expresión de planta o virus de planta.

En algunos casos, una célula hospedante o una célula transformada comprende un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria. En algunos casos, la célula hospedante o una célula transformada puede ser una célula bacteriana, una célula de mamífero, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula de planta. En algunos casos la célula de planta puede ser una célula de patata, trigo, arroz, maíz, tabaco o cebada. La célula transformada puede ser cualquiera de las células hospedantes familiares para el experto en la técnica, que incluyen células procariotas, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células de mamífero, células de insecto o células de planta. Los ejemplos de células bacterianas incluyen cualquier especie dentro de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, que incluyen, p. ej., *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Las células fúngicas de ejemplo incluyen cualquier especie de *Aspergillus*. Las células de levadura de ejemplo incluyen cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Schwanniomyces*, incluyendo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de insecto de ejemplo incluyen cualquier especie de *Spodoptera* o *Drosophila*, incluyendo *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Las células animales de ejemplo incluyen CHO, COS o melanoma de Bowes o cualquier línea de células de ratón o humanas.

En algunos casos, los animales no humanos transgénicos comprenden un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria o un vector, casete de expresión, vector de expresión, plásmido o vehículo de clonación como se proporciona en la presente memoria. El animal no humano transgénico puede ser un ratón, una rata, una cabra, un conejo, una oveja, un cerdo o una vaca.

En algunos casos, una planta o semilla transgénica comprende un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria o un vector, casete de expresión, vector de expresión, plásmido o vehículo de clonación como se proporciona en la presente memoria. En un caso, la planta es una planta de maíz, una planta de sorgo, una planta de patata, una planta de tomate, una planta de trigo, una planta oleaginosa, una planta de colza, una planta de soja, una planta de arroz, una planta de cebada, una hierba, una semilla de algodón, una palma, planta de sésamo, una planta de cacahuete, una planta de girasol o una planta de tabaco; la semilla transgénica. En algunos casos la semilla es una semilla de maíz, una semilla de trigo, una semilla oleaginosa, una semilla de colza, una semilla de soja, una semilla de palma, una semilla de girasol, una semilla de sésamo, un arroz, una cebada, un cacahuete, una semilla de algodón, una palma, un cacahuete, un sésamo semilla, una semilla de girasol o una semilla de planta de tabaco.

En algunos casos, se proporciona en la presente memoria un oligonucleótido de sentido contrario o ARN inhibidor que comprende o consiste en un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria.

En otros casos, se proporciona en la presente memoria un método para inhibir la traducción de un mensaje de fosfolipasa (transcrito, ARNm) en una célula, que comprende administrar a la célula o expresar en la célula un oligonucleótido de sentido contrario o ARN inhibidor que comprende o consiste en una secuencia de ácido nucleico proporcionada en la presente memoria.

En algunos casos, los polipéptidos aislados, sintéticos o recombinante tienen actividad de una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), o polipéptidos capaces de generar una respuesta inmunitaria específica para una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) (p. ej., un epítipo); y en casos alternativos, los péptidos y polipéptidos como se proporcionan en la presente memoria, comprenden una secuencia:

(a) que comprende una secuencia de aminoácidos:

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

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

(ii) codificada por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria;

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

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

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

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

5 (e) el polipéptido de (d), en donde la secuencia señal (líder) heteróloga comprende o consiste en una extensión N-terminal y/o C-terminal para dirigirse a un retículo endoplásmico (ER) o endomembrana, o a un sistema de retículo endoplásmico (ER) o endomembrana de planta;

(f) el polipéptido de cualquiera de (a) a (e), en donde la fosfolipasa, p. ej. una fosfolipasa C, p. ej. una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), cataliza una reacción que comprende:

10 $1\text{-fosfatidil-1D-mio-inositol-4,5-bisfosfato (también llamado PIP}_2\text{, fosfatidilinositol-bisfosfato) + H}_2\text{O} \leftrightarrow 1\text{D-mio-inositol-1,4,5-trisfosfato (también llamado IP}_3\text{, inositol-trifosfato) + diacilglicerol}$

(g) el polipéptido de (a) a (f), en donde la actividad de fosfolipasa, p. ej. una fosfolipasa C, p. ej. una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) es termostable;

15 (h) el polipéptido de (a) a (f), en donde la actividad de fosfolipasa, p. ej. una fosfolipasa C, p. ej. una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) es termotolerante;

20 (i) el polipéptido de uno cualquiera de (a) a (h), en donde (i) el polipéptido es glucosilado, o el polipéptido comprende al menos un sitio de glucosilación, (ii) el polipéptido de (i) en donde la glucosilación es una glucosilación unida a N o una glucosilación unida a O; (iii) el polipéptido de (i) o (ii) en donde el polipéptido es glucosilado después de ser expresado en una célula de levadura; o (iv) el polipéptido de (iii) en donde la célula de levadura es una *P. pastoris* o una *S. pombe*;

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

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

30 En algunos casos, el polipéptido aislado, sintético o recombinante puede comprender el polipéptido como se proporciona en la presente memoria que carece de una secuencia (péptido) señal, p. ej., carece de su secuencia señal homóloga, y en un caso, comprende una secuencia (péptido) señal heteróloga. En algunos, el polipéptido aislado, sintético o recombinante puede comprender el polipéptido como se proporciona en la presente memoria que comprende una secuencia señal heteróloga, tal como una secuencia señal heteróloga de fosfolipasa o no fosfolipasa (p. ej., no fosfolipasa, no fosfolipasa C o no fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC)). En un aspecto, las proteínas quiméricas comprenden un primer dominio que comprende una secuencia señal como se proporciona en la presente memoria y al menos un segundo dominio. La proteína puede ser una proteína de fusión. El segundo dominio puede comprender una enzima. La enzima puede ser una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) como se proporciona en la presente memoria, u otra enzima.

35 En algunos casos, la actividad de fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), comprende una actividad específica a aproximadamente 37°C en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína. En otros casos, la actividad de fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), comprende una actividad específica de aproximadamente 500 a aproximadamente 750 unidades por miligramo de proteína. Alternativamente, la actividad de fosfolipasa comprende una actividad específica a 37°C en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 1200 unidades por miligramo de proteína. En algunos casos, la actividad de fosfolipasa comprende una actividad específica a 37°C en el intervalo de aproximadamente 750 a aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína. En otros casos, la termotolerancia comprende retención de al menos la mitad de la actividad específica de la fosfolipasa a 37°C después de ser calentada a una temperatura elevada. Alternativamente, la termotolerancia puede comprender una retención de actividad específica a 37°C en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 1200 unidades por miligramo de proteína después de ser calentada a una temperatura elevada.

40 En algunos casos, los polipéptidos aislados, sintéticos o recombinantes como se proporcionan en la presente memoria, comprenden al menos un sitio de glucosilación. En un caso, la glucosilación puede ser glucosilación unida por N. En otro caso, el polipéptido se puede glucosilar después de ser expresado en *P. pastoris* o *S. pombe*, o en plantas, tal como plantas productoras de aceite, p. ej., soja, canola, arroz, girasol, o variantes genéticamente modificadas (OGM) de estas plantas.

45 En algunos casos, el polipéptido puede retener la actividad de una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), en condiciones que comprenden aproximadamente pH 6,5, pH 6, pH 5,5,

pH 5, pH 4,5 o pH 4,0 o inferior. En otro caso, el polipéptido puede retener la actividad de una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), en condiciones que comprenden aproximadamente pH 7, pH 7,5, pH 8,0, pH 8,5, pH 9, pH 9,5, pH 10, pH 10,5, pH 11, pH 11,5, pH 12,0 o más.

5 En algunos casos, las preparaciones de proteínas comprenden un polipéptido como se proporciona en la presente memoria, en donde la preparación de proteína comprende un líquido, un sólido o un gel.

10 En algunos casos, los heterodímeros como se proporcionan en la presente memoria comprenden un polipéptido y un segundo dominio. En algunos casos, el segundo dominio puede ser un polipéptido y el heterodímero puede ser una proteína de fusión. En algunos casos, el segundo dominio puede ser un epítipo o un marcador. En un caso, los homodímeros como se proporcionan en la presente memoria comprenden un polipéptido como se proporciona en la presente memoria.

15 En algunos casos, los polipéptidos inmovilizados como se proporcionan en la presente memoria tienen actividad de una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), en donde el polipéptido comprende un polipéptido como se proporciona en la presente memoria, un polipéptido codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, o un polipéptido que comprende un polipéptido como se proporciona en la presente memoria y un segundo dominio. En algunos casos, un polipéptido como se proporciona en la presente memoria se puede inmovilizar en una célula, una vesícula, un liposoma, una película, una membrana, un metal, una resina, un polímero, un material cerámico, un vidrio, un microelectrodo, una partícula gráfica, una perla, un gel, una placa, un cristal, un comprimido, una píldora, una cápsula, un polvo, un aglomerado, una superficie, una estructura porosa, una matriz o un tubo capilar, o materiales tales como granos, cáscaras, 20 corteza, piel, cabello, esmalte, hueso, concha y materiales derivados de los mismos. Los polinucleótidos, polipéptidos y enzimas como se proporcionan en la presente memoria se pueden formular en una forma sólida, tal como un polvo, una preparación liofilizada, gránulos, un comprimido, una barra, un cristal, una cápsula, una píldora, un pelet, o una forma líquida tal como una solución acuosa, un aerosol, un gel, una pasta, una suspensión, una emulsión acuosa/aceite, una crema, una cápsula, o una suspensión vesicular o micelar.

25 Se proporcionan en la presente memoria anticuerpos aislados, sintéticos o recombinantes, que se unen específicamente a un polipéptido como se proporciona en la presente memoria. En algunos casos, los anticuerpos aislados, sintéticos o recombinantes son anticuerpos monoclonales o policlonales o son sus fragmentos de unión al antígeno. En un caso, se proporciona en la presente memoria un híbrido que comprende un anticuerpo proporcionado en la presente memoria.

30 Se proporciona en la presente memoria una matriz que comprende un polipéptido inmovilizado, ácido nucleico inmovilizado o un anticuerpo como se proporcionan en la presente memoria, o una de sus combinaciones.

35 En algunos casos, los complementos alimenticios para un animal comprenden un polipéptido como se proporciona en la presente memoria, p. ej., un polipéptido codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria. En un caso, el polipéptido en el complemento alimenticio se puede glucosilar. En un caso, las matrices de suministro de enzimas comestibles comprenden un polipéptido como se proporciona en la presente memoria, p. ej., un polipéptido codificado por el ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria. En un caso, la matriz de suministro comprende un pelet. En un caso, el polipéptido se puede glucosilar. En un caso, la actividad de fosfolipasa es termotolerante. En otro caso, la actividad de fosfolipasa es termoestable.

40 En algunos casos, los métodos de aislamiento o identificación de un polipéptido que tiene actividad de una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), comprenden las etapas de (a) proporcionar un anticuerpo como se proporciona en la presente memoria; (b) proporcionar una muestra que comprende polipéptidos; y (c) poner en contacto la muestra de la etapa (b) con el anticuerpo de la etapa (a) en condiciones en donde el anticuerpo se puede unir específicamente al polipéptido, aislando o identificando así un polipéptido que tiene actividad de una fosfolipasa, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC). 45

50 En algunos casos, los métodos para hacer un anticuerpo anti-fosfolipasa comprenden administrar a un animal no humano un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria o un polipéptido como se proporciona en la presente memoria o sus subsecuencias, en una cantidad suficiente para generar una respuesta humoral inmunitaria, haciendo así un anticuerpo anti-fosfolipasa. Se proporcionan en la presente memoria métodos para hacer un anticuerpo anti-fosfolipasa que comprende administrar a un animal no humano un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria o un polipéptido como se proporciona en la presente memoria o sus subsecuencias, en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmunitaria.

55 En un caso, los métodos para producir un polipéptido recombinante comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, en donde el ácido nucleico está operativamente unido a un promotor, en donde el ácido nucleico comprende un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria; y (b) expresar el ácido nucleico de la etapa (a) en condiciones que permiten la expresión del polipéptido, produciendo así un polipéptido recombinante; o (B) el método de (A), que además comprende transformar una célula

hospedante con el ácido nucleico de la etapa (a) seguido de expresar el ácido nucleico de la etapa (a), produciendo así un polipéptido recombinante en una célula transformada.

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

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

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

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

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

En un caso, los métodos para aislar o recuperar un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad de lipasa de una muestra, comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar una sonda polinucleótido que comprende un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria; (b) aislar un ácido nucleico de la muestra o tratar la muestra de modo que dicho ácido nucleico de la muestra sea accesible para la hibridación con una sonda polinucleótido de la etapa (a); (c) combinar el ácido nucleico aislado o la muestra tratada de la etapa (b) con la sonda polinucleótido de la etapa (a); y (d) aislar un ácido nucleico que hibrida específicamente con la sonda polinucleótido de la etapa (a), aislando o recuperando así un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad de fosfolipasa de una muestra; (B) el método de (A), en donde la muestra es o comprende una muestra ambiental; (C) el método de (B), en donde la muestra ambiental es o comprende una muestra de agua, una muestra líquida, una muestra de suelo, una muestra de aire o una muestra biológica; o (D) el método de (C), en donde la muestra biológica se obtiene de una célula bacteriana, una célula protozoaria, una célula de insecto, una célula de levadura, una célula de planta, una célula fúngica o una célula de mamífero.

En un caso, los métodos para aislar o recuperar un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad de fosfolipasa de una muestra, comprenden las etapas de: (a) proporcionar una pareja de secuencias de cebadores de amplificación de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, en donde la pareja de cebadores es capaz de amplificar un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria; (b) aislar un ácido nucleico de la muestra o tratar la muestra de modo que dicho ácido nucleico de la muestra sea accesible para la hibridación con la pareja de cebadores de amplificación; y (c) combinar el ácido nucleico de la etapa (b) con la pareja de cebadores de amplificación de la etapa (a); y amplificar el ácido nucleico de la muestra, aislando o recuperando así un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa de una muestra. En un caso, la muestra es una muestra ambiental, p. ej., una muestra de agua, una muestra líquida, una muestra de suciedad, una muestra de aire o una muestra biológica, o p. ej., una célula bacteriana, una célula

protozoaria, una célula de insecto, una célula de levadura, una célula de planta, una célula fúngica o una célula de mamífero. Uno o los dos miembros de la pareja de secuencias de cebadores de amplificación puede comprender un oligonucleótido que comprende al menos aproximadamente de 10 a 50 o mas bases consecutivas de una secuencia como se proporciona en la presente memoria.

- 5 En un caso, los métodos para aumentar la termotolerancia o termoestabilidad de un polipéptido fosfolipasa comprenden glucosilar un polipéptido fosfolipasa, en donde el polipéptido comprende al menos treinta aminoácidos contiguos de un polipéptido como se proporciona en la presente memoria; o un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, de modo que se aumente la termotolerancia o termoestabilidad del polipéptido fosfolipasa. En un caso, la actividad específica de fosfolipasa puede ser termoestable o termotolerante a una temperatura en el intervalo de más de aproximadamente 37°C a aproximadamente 95°C.

- 10 En un caso, los métodos para expresar en exceso una polipéptido fosfolipasa recombinante, p. ej. fosfolipasa C, p. ej. fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), en una célula comprende expresar un vector que comprende un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria o una secuencia de ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, en donde las identidades de secuencias se determinan por análisis con un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual, en donde la expresión en exceso se lleva a cabo usando un promotor de actividad alta, un vector dicistrónico o por amplificación génica del vector.

- 15 En un caso, los métodos para generar una variante de un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad de fosfolípido, comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar un ácido nucleico molde que comprende un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria; y (b) modificar, eliminar o añadir uno o más nucleótidos en la secuencia molde, o una de sus combinaciones, para generar una variante del ácido nucleico molde; (B) el método de (A), que además comprende expresar el ácido nucleico variante para generar un polipéptido fosfolipasa variante; (C) el método de (A) o (B), en donde las modificaciones, adiciones o eliminaciones se introducen por un método que comprende PCR propensa a error, barajado, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblado, mutagénesis por PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis en casete, mutagénesis de conjunto recursivo, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica de sitio, reensamblaje de genes, mutagénesis por saturación de sitio de gen (GSSM), reensamblaje por ligado sintético (SLR), y una de sus combinaciones; (D) el método de cualquiera de (A) a (C), en donde las modificaciones, adiciones o eliminaciones se introducen por un método que comprende recombinación, recombinación de secuencias recursivas, mutagénesis de ADN modificado por fosfotioato, mutagénesis de molde que contiene uracilo, mutagénesis de dúplex con huecos, mutagénesis por reparación de errores puntuales, mutagénesis por cepa de hospedante deficiente en reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis por eliminación, mutagénesis por selección de restricción, mutagénesis por purificación de restricción, síntesis artificial de genes, mutagénesis de conjunto, creación de multímero de ácido nucleico quimérico y una de sus combinaciones; (E) el método de cualquiera de (A) a (D), en donde el método se repite iterativamente hasta que se produce una fosfolipasa (variante) que tiene una actividad alterada o diferente (variante), o una estabilidad alterada o diferente (variante) de la de un polipéptido codificado por el molde de ácido nucleico, o se produce una estructura secundaria alterada o diferente (variante) de la de un polipéptido codificado por el ácido nucleico molde, o se produce una modificación postraducciona alterada o diferente (variante) de la de un polipéptido codificado por el ácido nucleico molde; (F) el método de (E), en donde el polipéptido fosfolipasa variante es termotolerante, y retiene alguna actividad después de ser expuesto a una temperatura elevada; (G) el método de (E), en donde el polipéptido fosfolipasa variante tiene mayor glucosilación comparado con la fosfolipasa codificada por un ácido nucleico molde; (H) el método de (E), en donde el polipéptido fosfolipasa variante tiene una actividad de fosfolipasa a alta temperatura, en donde la fosfolipasa codificada por el ácido nucleico molde no es activa a la temperatura alta; (I) el método de cualquiera de (A) a (H), en donde el método se repite iterativamente hasta que se produce una secuencia que codifica una fosfolipasa que tiene un uso de codones alterado respecto al del ácido nucleico molde; o (J) el método de cualquiera de (A) a (H), en donde el método se repite iterativamente hasta que se produce un gen de fosfolipasa que tiene mayor o menor nivel de expresión de mensajero o estabilidad respecto a la del ácido nucleico molde.

- 20 En un caso, métodos para modificar codones en un ácido nucleico que codifica un polipéptido fosfolipasa, comprendiendo el método las etapas de: (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica un polipéptido con una actividad de fosfolipasa que comprende un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria; y (b) identificar un codón en el ácido nucleico de la etapa (a) y sustituirlo por un codón diferente que codifica el mismo aminoácido que el codón sustituido, modificando así los codones en un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa.

- 25 En un caso, los métodos para producir una biblioteca de ácidos nucleicos que codifican una pluralidad de sitios activos de fosfatasa o sitios de unión del sustrato modificados, en donde los sitios activos o sitios de unión de sustrato modificados derivan de un primer ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un primer sitio activo o un primer sitio de unión del sustrato, el método comprende las etapas de: (A) (a) proporcionar un primer ácido nucleico que codifica un primer sitio activo o primer sitio de unión del sustrato, en donde la primera secuencia de ácido nucleico comprende un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, y el ácido nucleico codifica un sitio activo de fosfolipasa o un sitio de unión del sustrato de fosfolipasa; (b) proporcionar un conjunto de oligonucleótidos mutagénicos que codifican variantes de aminoácidos que se encuentran de forma natural en una pluralidad de codones objetivo en el primer ácido nucleico; y, (c) usar los oligonucleótidos mutagénicos para generar

un conjunto de ácidos nucleicos variantes que codifican el sitio activo o que codifican el sitio de unión del sustrato, que codifican una variedad de variaciones de aminoácidos en cada codón de aminoácido que se ha mutagenizado, produciendo así una biblioteca de ácidos nucleicos que codifican una pluralidad de sitios activos o sitios de unión del sustrato de fosfolipasa modificados; (B) el método de (A), que comprende mutagenizar el primer ácido nucleico de la etapa (a) por un método que comprende un sistema de evolución dirigido optimizado, mutagénesis por saturación de sitio de gen (GSSM), o un reensamblaje por ligado sintético (SLR); (C) el método de (A) o (B), que comprende mutagenizar el primer ácido nucleico de la etapa (a) o variantes por un método que comprende PCR propensa a error, barajado, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblaje, mutagénesis por PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis en casete, mutagénesis de conjunto recursivo, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica de sitio, reensamblaje de genes, mutagénesis por saturación de sitio de gen (GSSM), reensamblaje por ligado sintético (SLR), y una de sus combinaciones; o (D) el método de (A) o (B) que comprende mutagenizar el primer ácido nucleico de la etapa (a) o variantes por un método que comprende recombinación, recombinación de secuencias recursivas, mutagénesis de ADN modificado por fosfotioato, mutagénesis de molde que contiene uracilo, mutagénesis de dúplex con huecos, mutagénesis por reparación de errores puntuales, mutagénesis por cepa de hospedante deficiente en reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis por eliminación, mutagénesis por selección de restricción, mutagénesis por purificación de restricción, síntesis artificial de genes, mutagénesis de conjunto, creación de multímero de ácido nucleico quimérico y una de sus combinaciones.

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

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

En otro caso, los métodos para determinar un fragmento funcional de una enzima fosfolipasa comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar una enzima fosfolipasa, en donde la enzima comprende un polipéptido como se proporciona en la presente memoria, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria; y (b) eliminar una pluralidad de restos de aminoácidos de la secuencia de la etapa (a) y ensayar en la subsecuencia que queda una actividad enzimática, determinando así un fragmento funcional de una enzima fosfolipasa; o (B) el método de (A), en donde la actividad de fosfolipasa se mide proporcionando un sustrato de fosfolipasa y detectando una disminución de la cantidad del sustrato o un aumento de la cantidad de un producto de reacción.

En un caso, los métodos para la modificación genética de células enteras de fenotipos nuevos o modificados, que usan análisis de flujo metabólico en tiempo real, el método comprende las etapas de: (a) hacer una célula modificada modificando la composición genética de una célula, en donde la composición genética se modifica por adición a la célula de un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria; (b) cultivar la célula modificada para generar una pluralidad de células modificadas; (c) medir al menos un parámetro metabólico de la célula vigilando el cultivo celular de la etapa (b) en tiempo real, y (d) analizar los datos de la etapa (c) para determinar el si parámetro medido difiere de una medición comparable en una célula no modificada usando condiciones similares, identificando de esta forma un fenotipo modificado genéticamente en la célula usando análisis de flujo metabólico en tiempo real; (B) el método de (A), en donde la composición genética de la célula se modifica por un método que comprende eliminar una secuencia o modificar una secuencia en la célula, o inactivación de la expresión de un gen; (C) el método de (A) o (B), que además comprende seleccionar una célula que comprende un fenotipo recién modificado genéticamente; o (D) el método de (C), que además comprende cultivar la célula

seleccionada, generando así una nueva cepa de células que comprenden un fenotipo recién modificado genéticamente.

En un caso, los métodos para hacer una planta transgénica comprenden las siguientes etapas: (a) introducir una secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula vegetal, en donde la secuencia de ácido nucleico heteróloga comprende una secuencia de ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, produciendo así una célula vegetal transformada; y (b) producir una planta transgénica a partir de la célula transformada. En un caso, la etapa (a) puede comprender además introducir la secuencia de ácido nucleico heteróloga por electroporación o microinyección de los protoplastos de la célula vegetal. En otro caso, la etapa (a) puede comprender además introducir la secuencia de ácido nucleico heteróloga directamente en el tejido de la planta por bombardeo de partículas de ADN. Alternativamente, la etapa (a) puede comprender además introducir la secuencia de ácido nucleico heteróloga en el ADN de la célula vegetal usando un hospedante *Agrobacterium tumefaciens*. En un caso, la célula vegetal puede ser una célula de patata, maíz, arroz, trigo, tabaco o cebada.

En un caso, los métodos de expresión de una secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula vegetal comprenden las etapas de: (a) transformar la célula vegetal con una secuencia de ácido nucleico heteróloga operativamente unida a un promotor, en donde la secuencia de ácido nucleico heteróloga comprende un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria; (b) cultivar la planta en condiciones en donde la secuencia de ácido nucleico heteróloga se expresa en la célula vegetal.

En un aspecto, se proporcionan en la presente memoria composiciones de detergentes que comprenden el polipéptido fosfolipasa como se proporciona en la presente memoria, o un polipéptido fosfolipasa codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria. En un caso, la fosfolipasa es una fosfolipasa no tensioactiva o una fosfolipasa tensioactiva. En otro caso, la fosfolipasa se formula en una composición líquida no acuosa, un sólido fundido, un polvo liofilizado, una forma en partículas, un comprimido por presión, un pelet, una forma de gel, un aerosol o una forma de suspensión.

En un caso, los métodos para lavar un objeto comprenden la etapa de: (a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido fosfolipasa como se proporciona en la presente memoria, o un polipéptido fosfolipasa codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria; (b) proporcionar un objeto; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) y el objeto de la etapa (b) en condiciones en las que la composición puede lavar el objeto.

En un aspecto, se proporcionan en la presente memoria composiciones que comprenden un polipéptido fosfolipasa como se proporciona en la presente memoria, o un polipéptido fosfolipasa codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria.

En un caso, los métodos para mejorar, tratar o prevenir la toxicidad mediada por lipopolisacáridos (LPS) comprenden administrar a un paciente una composición farmacéutica que comprende un polipéptido como se proporciona en la presente memoria, o un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria.

En otro caso, se proporcionan en la presente memoria productos farmacéuticos, precursores farmacéuticos y composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido como se proporciona en la presente memoria o un polipéptido codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria. En otro caso, se proporcionan en la presente memoria métodos para la fabricación de un producto farmacéutico, un precursor de producto farmacéutico o una composición farmacéutica, que comprenden la adición de un polipéptido codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, a un producto farmacéutico, un precursor de producto farmacéutico o una composición farmacéutica. En un caso, la composición farmacéutica se usa para prevenir, tratar o mejorar la toxicidad mediada por lipopolisacáridos (LPS), o detoxificar una endotoxina, o desacilar una cadena de ácido graso 2' o 3' de un lípido A.

En un caso, los métodos para detoxificar una endotoxina comprenden poner en contacto una endotoxina con un polipéptido como se proporciona en la presente memoria o un polipéptido codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria.

En otro caso, los métodos para hacer una secuencia que codifica una fosfolipasa variante que tiene mayor expresión en una célula hospedante comprende modificar un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, de modo que uno, varios o todos los motivos de codificación de sitios de glucosilación unidos por N son modificados a un motivo no glucosilado.

En un caso, se proporcionan en la presente invención composiciones que comprenden una mezcla de enzimas fosfolipasas que comprende: (a)(i) un polipéptido fosfolipasa como se proporciona en la presente memoria o polipéptido codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, y (ii) al menos una segunda enzima; (b) la composición de (a), en donde la al menos una segunda enzima es una enzima fosfolipasa; o (c) la composición de (b), en donde la al menos una segunda enzima fosfolipasa comprende un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 4, o al menos una de las enzimas PLC variantes como se describen en las tablas 8 y 9.

- En un caso, los métodos para hacer un biocombustible, p. ej. un biodiesel, comprenden las etapas de: (A) (a) proporcionar un polipéptido fosfolipasa como se proporciona en la presente memoria, o una enzima fosfolipasa codificada por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, o una composición que comprende un polipéptido como se proporciona en la presente memoria; (b) proporcionar una composición que comprende un lípido o un éster de alquilo; (c) poner en contacto el polipéptido fosfolipasa de (a) con la composición de (b); (B) el método de (A), en donde la composición que comprende un lípido o un éster de alquilo es, o comprende, un aceite y/o una grasa; o (C) el método de (A) o (B), en donde la composición que comprende un lípido o un éster de alquilo es, o comprende, un alga, un aceite vegetal, un aceite vegetal puro, o un aceite vegetal virgen, un aceite vegetal residual, una grasa animal, una grasa, un sebo, una manteca o una grasa amarilla. En otro caso, se proporcionan en la presente invención combustibles, p. ej. biocombustibles, p. ej. biodiesel, fabricados por los métodos que comprenden la etapa de: (A) (a) proporcionar un polipéptido fosfolipasa como se proporciona en la presente memoria, o una enzima fosfolipasa codificada por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, o una composición que comprende un polipéptido como se proporciona en la presente memoria; (b) proporcionar una composición que comprende un lípido o un éster de alquilo; (c) poner en contacto el polipéptido fosfolipasa de (a) con la composición de (b); (B) el método de (A), en donde la composición que comprende un lípido o un éster de alquilo es, o comprende, un aceite y/o una grasa; o (C) el método de (A) o (B), en donde la composición que comprende un lípido o un éster de alquilo es, o comprende, un alga, un aceite vegetal, un aceite vegetal puro, o un aceite vegetal virgen, un aceite vegetal residual, una grasa animal, una grasa, un sebo, una manteca o una grasa amarilla.
- En otro caso, un soluble seco de destilería (DDS), un grano seco de destilería (DDS), un soluble condensado de destilería (CDS), un grano húmedo de destilería (DWG) o un grano seco de destilería con solubles (DDGS) comprende un polipéptido como se proporciona en la presente memoria, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, o una composición como se proporciona en la presente memoria.
- En otro caso, se proporciona en la presente invención una biomasa que comprende (a) un polipéptido como se proporciona en la presente memoria, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, o una composición como se proporciona en la presente memoria; (b) la biomasa de (a), en donde la biomasa es, o comprende, una biomasa animal, de algas y/o vegetal o una biomasa que comprende lípidos o lignocelulósica, o un material residual.
- En otro caso, se proporciona en la presente invención un producto basado en petróleo que comprende: (a) un polipéptido como se proporciona en la presente memoria, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, o una composición como se proporciona en la presente memoria; (b) hecho por un método que comprende el uso de un polipéptido como se proporciona en la presente memoria, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico como se proporciona en la presente memoria, o una composición como se proporciona en la presente memoria; o (c) el producto basado en petróleo de (a) o (b) que comprende un aceite, un biodiesel o una gasolina, o un bioetanol, biobutanol, biopropanol o un biometanol; o una mezcla de bioetanol, biobutanol, biopropanol, biometanol y/o biodiesel y gasolina.
- En una realización, se proporciona en la presente invención un método para la hidratación de fosfolípidos no hidratables (NHP) dentro de una matriz lipídica permitiéndolos migrar a una interfase de aceite-agua. Después los NHP se han reaccionar y/o se separan de los lípidos. En una realización, el método comprende a) mezclar un ácido acuoso con un aceite comestible para obtener una mezcla ácida que tiene pH menor de aproximadamente 4; y b) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene pH de aproximadamente 6-9. En algunas realizaciones, la mezcla en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende la fase acuosa de tamaño de gotas medio de aproximadamente 15 μm a aproximadamente 45 μm . En algunas realizaciones, la mezcla en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60% de la fase acuosa en volumen de tamaño de gotas entre aproximadamente 15 μm a aproximadamente 45 μm de tamaño, en donde el porcentaje de fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En algunos casos, la mezcla en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60, 70, 80, 90, 93, 95, 96, 97, 98, o 99% de la fase acuosa en volumen de tamaño de gotas entre aproximadamente 20 μm a aproximadamente 45 μm de tamaño. En algunas realizaciones, el método comprende además desgomar la mezcla de reacción con agua o una enzima para obtener un aceite desgomado. En algunas realizaciones, la mezcla en las etapas a) y/o b) se lleva a cabo con un mezclador de alta cizalladura con una velocidad con una velocidad de la punta de al menos aproximadamente 1400 cm/s, 1600 cm/s, 1800 cm/s, 2000 cm/s, 2100 cm/s, 2300 cm/s, 2500 cm/s, 3000 cm/s, o 3500 cm/s.
- Se puede usar cualquier ácido considerado adecuado por un experto en la técnica en los métodos proporcionados en la presente memoria. En algunas realizaciones, el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico, y una mezcla de los mismos. Se puede usar cualquier ácido considerado adecuado por un experto en la técnica en los métodos proporcionados en la presente memoria. En algunas realizaciones, la base se selecciona del grupo que consiste en hidróxido sódico, hidróxido potásico, silicato sódico, carbonato sódico, carbonato de calcio, y combinaciones de los mismos.

- En algunas realizaciones, el método para la hidratación de fosfolípidos no hidratables en un aceite comestible comprende además una etapa de desgomado con agua o enzimático para obtener un aceite desgomado. En una realización, se proporciona en la presente invención un método en donde a la hidratación de los NHP le sigue tratamiento enzimático y separación de varios fosfolípidos y lecitinas. Dichos métodos se pueden poner en práctica en aceites brutos o desgomados con agua.
- En algunas realizaciones, un método de desgomado de aceite proporcionado en la presente memoria comprende a) mezclar un ácido acuoso con un aceite comestible para obtener una mezcla ácida que tiene pH de aproximadamente 1 a 4, b) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene pH de aproximadamente 6-9, y c) desgomar la mezcla de reacción con agua o una enzima para obtener un aceite desgomado. En algunas realizaciones, la mezcla en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende una fase acuosa de tamaño medio de gotas entre aproximadamente 15 μm a aproximadamente 45 μm . En algunas realizaciones, la mezcla en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen de tamaño medio de gotas entre aproximadamente 15 μm a aproximadamente 45 μm de tamaño, en donde el porcentaje de fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa.
- En una realización, se proporciona en la presente memoria un método para separar los NHP, fosfolípidos hidratables y lecitinas (conocidos colectivamente como "gomas") de aceites vegetales para producir un aceite desgomado o producto de grasa que se puede usar para la producción de alimentos y/o para aplicaciones no alimentarias. En algunas realizaciones, los métodos de desgomado proporcionados en la presente memoria usan agua, varios ácidos y/o varias bases o una de sus combinaciones.
- En otro caso se proporciona en la presente memoria un método para potenciar la velocidad de reacción de una fosfolipasa usada en un método de desgomado enzimático, de modo que la reacción enzimática tiene una duración de aproximadamente una hora.
- En otro aspecto más, se proporciona en la presente memoria un método para el desgomado de una composición de aceite en la que los fosfolípidos tanto hidratables como no hidratables se pueden tratar en un solo procedimiento, en donde una reacción enzimática se completa en menos aproximadamente una hora.
- En un caso, se proporciona en la presente memoria un método para hidrolizar, romper o alterar una composición que comprende fosfolípidos, que comprende:
- (A) (a) proporcionar un polipéptido fosfolipasa; (b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de etapa (b) en condiciones en las que la fosfolipasa hidroliza, rompe o altera la composición que comprende fosfolípidos;
- (B) el método de (A), en donde la composición comprende una bicapa o membrana lipídica que comprende fosfolípidos; o
- (C) el método cualquiera de (A) o (B), en donde la composición comprende una célula vegetal, una célula bacteriana, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula animal.
- En un caso, se proporciona en la presente memoria un método para la licuefacción o separación de una composición que comprende fosfolípidos, que comprende:
- (a) proporcionar un polipéptido fosfolipasa;
- (b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido; y
- (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de etapa (b) en condiciones en las que la fosfolipasa separa o licua la composición que comprende fosfolípidos.
- En un caso, se proporciona en la presente invención un método para la purificación de un fitoesterol o un triterpeno que comprende:
- AI) (Ala) proporcionar una composición que comprende un polipéptido fosfolipasa;
- (Alb) proporcionar una composición que comprende un fitoesterol o un triterpeno; y
- (Alc) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) en condiciones en las que el polipéptido puede catalizar la hidrólisis de un fosfolípido en la composición;
- (BI) el método de (AI), en donde el fitoesterol o un triterpeno comprende un estero vegetal;
- (CI) el método de (BI), en donde el estero vegetal se obtiene de un aceite vegetal;
- (DI) el método de (CI), en donde el aceite vegetal comprende un aceite de coco, aceite de canola, aceite de manteca de cacao, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de linaza, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de

cacahuete, aceite derivado de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de soja o un aceite de girasol;

(EI) el método de cualquiera de (AI) a (DI), que comprende además usar disolventes no polares para extraer cuantitativamente los fitoesteres libres y ésteres de ácidos graso y fitoesterilo; o

- 5 (FI) el método de (EI), en donde el fitoesterol o un triterpeno comprenden un β -sitosterol, un campesterol, un estigmasterol, un estigmastanol, un β -sitostanol, un sitostanol, un desmosterol, un calinasterol, un poriferasterol, un clionasterol o un brasicasterol.

En un caso, se proporciona en la presente memoria un método para el refinado de un aceite o una grasa que comprende:

- 10 (A1) (A1a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido fosfolipasa;
(A1b) proporcionar una composición que comprende un aceite o una grasa que comprende un fosfolípido; y
(A1c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (A1a) con la composición de etapa (A1b) en condiciones en las que el polipéptido puede catalizar la hidrólisis de un fosfolípido en la composición;
(B1) el método de (A1), en donde el polipéptido está en una solución en agua que se añade a la composición;
- 15 (C1) el método de (B1), en donde el nivel de agua es entre aproximadamente 0,5 a 5%;
(D1) el método de cualquiera de (A1) a (C1), en donde el tiempo de procedimiento es menos de aproximadamente 2 horas;
(E1) el método de cualquiera de (A1) a (C1), en donde el tiempo de procedimiento es menos de aproximadamente 60 minutos;
- 20 (F1) el método de cualquiera de (A1) a (C1), en donde el tiempo de procedimiento es menos de aproximadamente 30 minutos, menos de aproximadamente 15 minutos, o menos de aproximadamente 5 minutos;
(G1) el método de cualquiera de (A1) a (F1), en donde las condiciones de hidrólisis comprenden una temperatura de entre aproximadamente 25°C a 70°C;
(H1) el método de cualquiera de (A1) a (G1), en donde las condiciones de hidrólisis comprenden el uso de productos cáusticos;
- 25 (I1) el método de cualquiera de (A1) a (H1), en donde las condiciones de hidrólisis comprenden un pH de entre aproximadamente pH 3 y pH 10;
(J1) el método de cualquiera de (A1) a (I1), en donde las condiciones de hidrólisis comprenden la adición de emulsionantes y/o mezclado después del contacto de la etapa (A1)(A1c);
- 30 (K1) el método de cualquiera de (A1) a (J1), que comprende la adición de un agente para romper la emulsión y/o calor o enfriamiento para promover la separación de una fase acuosa;
(L1) el método de cualquiera de (A1) a (K1), que comprende el desgomado antes de la etapa de contacto para recoger la lecitina por centrifugación y después añadir una PLC, una PLC y/o una PLA para separar los fosfolípidos no hidratables;
- 35 (M1) el método de cualquiera de (A1) a (L1), que comprende el desgomado con agua de aceite bruto hasta menos de 10 ppm de fósforo para aceites comestibles y posterior refinado físico hasta menos de aproximadamente 50 ppm fósforo para aceites para biodiesel; o
(N1) el método de cualquiera de (A1) a (M1), que comprende la adición de ácido para promover la hidratación de los fosfolípidos no hidratables.
- 40 En un caso, se proporciona en la presente memoria un método para el desgomado de un aceite o una grasa, que comprende
(a1) proporcionar una composición que comprende un polipéptido fosfolipasa;
(b1) proporcionar una composición que comprende un aceite o una grasa que contiene fosfolípidos; y
(c1) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a1) y la composición de etapa (b1) en condiciones en las que el polipéptido puede catalizar la hidrólisis de un fosfolípido en la composición.
- 45

En un caso, se proporciona en la presente memoria un método para el refinado físico de una composición que contiene fosfolípidos que comprende:

(A-1) (A-1a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido fosfolipasa;

(A-1b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido; y

5 (A-1c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (A-1a) con la composición de etapa (A-1b) antes, durante o después del refinado físico;

10 (B-1) el método de (A-1), en donde el polipéptido se añade antes del refinado físico y la composición que comprende el fosfolípido comprende una planta y el polipéptido es expresado de forma transgénica en la planta, el polipéptido se añade durante la trituración de una semilla u otra parte de la planta, o el polipéptido se añade después de triturar o antes de refinar;

(C-1) el método de (A-1), en donde el polipéptido se añade durante el refinado físico;

15 (D-1) el método de (A-1), en donde el polipéptido se añade después de refinado físico: en una mezcladora de mezclado intenso o mezcladora de retención antes de la separación; después de una etapa de calentamiento; en una centrifuga; en una borra de neutralización; en un agua de lavado; o, durante una etapa de blanqueo o desodorización; o

(E-1) el método de cualquiera de (A-1) a (D-1), que comprende además añadir una fosfolipasa A (PLA), una fosfolipasa B (PLB), fosfolipasa C (PLC), fosfolipasa D (PLD), o una enzima fosfatasa, o cualquiera de sus combinaciones.

20 En un caso, se proporciona en la presente memoria un método para el refinado cáustico de una composición que contiene fosfolípido que comprende:

(A1) (A1a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa;

(A1b) proporcionar una composición que comprende un fosfolípido; y

(A1c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (A1a) con la composición de etapa (A1b) antes, durante o después del refinado cáustico;

25 (B1) el método de (A1), en donde el polipéptido se añade antes de la adición de ácido o producto cáustico;

(C1) el método de cualquiera de (A1) a (B1), en donde el polipéptido se añade durante el refinado cáustico y se añaden niveles variables de ácido y producto cáustico dependiendo de los niveles de fósforo y niveles de ácidos grasos libres; o

30 (D1) el método de cualquiera de (A1) a (B1), en donde el polipéptido se añade después del refinado cáustico: en una mezcladora de mezclado intenso o mezcladora de retención antes de la separación; después de una etapa de calentamiento; en una centrifuga; en una borra de neutralización; en un agua de lavado; o, durante una etapa de blanqueo o desodorización;

35 (E1) el método de cualquiera de (A1) a (D1), en donde las condiciones de refinado cáustico se generan por adición de una solución concentrada de producto cáustico, o en donde las condiciones de refinado cáustico comprenden el uso de una solución concentrada de producto cáustico más concentrada que el estándar industrial de 11%, o en donde las condiciones de refinado cáustico comprenden el uso de una solución concentrada de producto cáustico que es entre aproximadamente 12% y 50% concentrada;

(F1) el método de cualquiera de (A1) a (E1), en donde la composición que comprende el fosfolípido comprende una planta;

40 (G1) el método de cualquiera de (F1), en donde el polipéptido es expresado transgénicamente en la planta;

(H1) el método de cualquiera de (A1) a (G1), en donde el polipéptido se añade durante la trituración de una semilla u otra parte de la planta, o el polipéptido se añade después de triturar o antes de refinar; o

45 (I1) el método de cualquiera de (A1) a (H1), que comprende un procedimiento como se expone en la figura 10; o el procedimiento como se expone en la figura 10, en donde se añade suficiente ácido para promover la disminución del contenido de metales calcio y magnesio.

En un caso, se proporciona en la presente memoria un método para desacilar una cadena de ácido graso en 2' o 3' de un lípido A, que comprende poner en contacto el lípido A con un polipéptido fosfolipasa.

En un caso, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para reducir la masa de gomas y aumentar la ganancia de aceite neutro (triglicérido) mediante el menor atrapamiento de aceite, que comprende:

(A1) (A1a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido fosfolipasa;

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

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

(B1) la preparación de proteína de (A1), en donde la preparación de la proteína comprende una formulación que comprende una composición líquida no acuosa, un sólido fundido, un polvo, un polvo liofilizado, una forma granular, una forma en partículas, un comprimido por presión, un pelet, una píldora, una forma de gel, un hidrogel, un aerosol, un pulverizador, una loción, una formulación en suspensión, una emulsión acuosa/aceite, una crema, una cápsula, o una suspensión vesicular o micelar; o

(C1) el método de (A1) o (B1), que comprende usar mezclado de alta cizalladura de la composición, seguido de mezclado de baja cizalladura o sin mezclado de un polipéptido de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa para permitir el contacto adecuado del sustrato fosfolípido con la fosfolipasa.

Se proporciona en la presente memoria un aceite o grasa producido por los métodos proporcionados en la presente memoria.

Las enzimas para usar en los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen enzimas que tienen actividad de fosfolipasa. La actividad de fosfolipasa comprende, por ejemplo, actividad de una fosfolipasa C (PLC), actividad de una fosfolipasa A (PLA), incluyendo actividad de una fosfolipasa A1 o fosfolipasa A2, actividad de una fosfolipasa B (PLB), incluyendo actividad de una fosfolipasa B1 o fosfolipasa B2, actividad de una fosfolipasa D (PLD), incluyendo actividad de una fosfolipasa D1 o una fosfolipasa D2. En un caso, las enzimas para usar en la presente memoria comprenden polipéptidos que tienen actividad de una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) o actividad enzimática equivalente, y/u otra actividad de fosfolipasa, que incluye una fosfolipasa A, B, C, D, patatina, ácido fosfatídico fosfatasa (PAP) y/o lípido acil hidrolasa (LAH) o actividad enzimática equivalente.

En algunos casos, la enzima para usar en los métodos proporcionados en la presente invención se selecciona de una fosfolipasa A, fosfolipasa C, fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, o una de sus combinaciones. En algunos casos, la enzima para usar en los métodos proporcionados en la presente invención se selecciona de una fosfolipasa C, fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, o una de sus combinaciones. En algunos casos, la enzima para usar en los métodos proporcionados en la presente invención es la enzima fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol como se describe en otra parte en la presente memoria. En algunas realizaciones, la enzima para usar en los métodos proporcionados en la presente invención se selecciona de fosfolipasa C, y una enzima que comprende la SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, la enzima para usar en los métodos proporcionados en la presente invención es una enzima que comprende la SEQ ID NO: 8.

En otra realización, se proporciona en la presente memoria un método para obtener un fosfolípido de un aceite comestible. En alguna realización, los fosfolípidos obtenidos por los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen una variedad de fosfolípidos, que incluyen, pero no se limitan a fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilserina (LPS), lisofosfatidilinositol (LPI), ácido lisofosfatídico (LPA), colina (C), etanolamina (E), serina (S), e inositol (I).

En otro caso, se proporciona en la presente memoria un método para obtener colina (C), etanolamina (E), serina (S), o inositol (I) de un aceite comestible.

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

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos son ilustrativos y no se pretende que limiten el alcance de la invención como abarcan las reivindicaciones.

La figura 1 ilustra esquemáticamente un procedimiento de refinado de aceite vegetal de ejemplo que usa fosfolipasas de la invención.

La figura 2 ilustra esquemáticamente un procedimiento de desgomado de la invención de ejemplo para aceites refinados físicamente, como se describe en detalle más adelante.

La figura 3 ilustra esquemáticamente la hidrólisis de fosfátido con una fosfolipasa C de la invención, como se describe en detalle más adelante.

La figura 4 ilustra esquemáticamente un procedimiento de refinado cáustico de la invención de ejemplo, e ilustra una realización alternativa que comprende la aplicación de una fosfolipasa C de la invención como "Adyuvante de refinado cáustico" (refinado cáustico de mezclado largo), como se describe en detalle más adelante.

5 La figura 5 ilustra esquemáticamente la aplicación de una fosfolipasa C de la invención como un adyuvante de desgomado, como se describe en detalle más adelante.

La figura 6 ilustra esquemáticamente un procedimiento de refinado cáustico de ejemplo, e ilustra la aplicación de una fosfolipasa C de la invención como un "Adyuvante de refinado cáustico" (refinado cáustico de mezclado largo), como se describe en detalle más adelante.

10 La figura 7 ilustra otra variación de los métodos de la invención donde se usan dos etapas de centrifugación en el procedimiento, como se describe en detalle más adelante.

La figura 8 ilustra otra variación de métodos de la invención donde se usan tres etapas de centrifugación en el procedimiento, como se describe en detalle más adelante.

La figura 9 ilustra otra variación de ejemplo de este procedimiento que usa tratamiento ácido y que tiene una etapa de centrifugación antes de una etapa de desgomado, como se describe en detalle más adelante.

15 La figura 10 ilustra la fracción en peso de las especies individuales de fosfolípido (PL) ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina (PC) con respecto a los PL totales que quedan después de tratamiento con fosfolipasas mutantes descritas en la presente memoria.

La figura 11 ilustra la "mutagénesis por saturación de sitio génico" o "GSSM" a mutantes seleccionados para la inclusión en la biblioteca de GeneReassembly, que incluye fosfolipasas de ejemplo de la invención.

20 La figura 12 ilustra un procedimiento de alcohol de ejemplo que puede incorporar el uso de enzimas de esta invención.

La figura 13 proporciona composición de fosfolípidos de las gomas húmedas recuperadas en los ejemplos de control.

25 La figura 14 proporciona comparaciones de fosfolípidos para los ejemplos de control frente a los ejemplos que usan los métodos proporcionados en la presente memoria donde el pH en la etapa b) se ajusta a pH 7,0.

La figura 15 compara la pérdida de aceite neutro con la fase de gomas en reacciones a pH neutro de control frente a reacciones a pH ajustado a un pH de 7,0, lado a lado.

La figura 16 compara la pérdida de aceite neutro de la fase de gomas en diferentes condiciones de pH donde se usa una fosfolipasa A 1.

30 La figura 17 representa la distribución de gotas para la fase acuosa obtenida de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 17A.

La figura 18 representa la distribución de gotas para la fase acuosa obtenida de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 17B.

35 La figura 19 representa la distribución de gotas para la fase acuosa obtenida de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 17C.

La figura 20 representa la distribución de gotas para la fase acuosa obtenida de acuerdo con el procedimiento del ejemplo 17D.

La figura 21 representa la distribución de gotas comparativa para la fase acuosa obtenida de acuerdo con los procedimientos de los ejemplos 17A, 17B, 17C y 17D.

40 Símbolos de referencia similares en los diferentes dibujos indican elementos similares.

Descripción detallada de la invención

45 Se proporcionan en la presente memoria polipéptidos que tienen actividad de una fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) o actividad enzimática equivalente, y/u otra actividad de fosfolipasa, que incluye actividad de una fosfolipasa A, B, C, D, patatina, ácido fosfatídico fosfatasas (PAP) y/o lípido acil hidrolasa (LAH) o actividad enzimática equivalente, polinucleótidos que los codifican, anticuerpos que se unen específicamente a los mismos, y métodos para hacerlos y usarlos.

En una realización, la actividad enzimática de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) de los polipéptidos de esta invención, comprende:

1-fosfatidil-1D-mio-inositol-4,5-bisfosfato (también llamado PIP_2 , fosfatidilinositol-bisfosfato) + H_2O $\leftrightarrow$ 1D-mio-inositol-1,4,5-trisfosfato (también llamado IP_3 , inositol-trifosfato) + diacilglicerol.

En realizaciones alternativas, las enzimas de la invención pueden escindir eficazmente el enlace éster del glicerofosfato en aceites, tales como aceites vegetales, p. ej., fosfolípidos de semillas oleaginosas, para generar una base fosforilada extraíble en agua y un diglicérido.

En casos alternativos, las fosfolipasas descritas en la presente memoria tienen actividad de una lípido acil hidrolasa (LAH); o pueden escindir enlaces éster del glicerofosfato en la fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico, y/o esfingomielina, o una combinación de estas actividades. Por ejemplo, una fosfolipasa descrita en la presente memoria es específica para uno o más sustratos, p. ej., una enzima descrita en la presente memoria puede tener una especificidad de acción por PE y PC; PE y PI; PE y PS; PS y PC; PS y PI; PI y PC; PS, PI y PC; PE, PI y PC; PC, PE y PS; PE, PS y PI; o, PE, PS, PI y PC.

En realizaciones alternativas, una fosfolipasa de la invención (p. ej., una enzima fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) o actividad equivalente) se puede usar para el desgomado enzimático de aceites, p. ej., aceites brutos, debido a que el resto fosfato es soluble en agua y fácil de separar. El producto diglicérido permanecerá en el aceite y por lo tanto reducirá las pérdidas. Las PLC de la invención se pueden usar además de o en lugar de las PLA1 y PLA2 en el desgomado de aceite comercial tal como en el procedimiento ENZYMAX®, donde los fosfolípidos son hidrolizados por PLA1 y PLA2.

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

Se describen en la presente memoria métodos para hacer PLC y/o modificar la actividad de fosfolipasas de ejemplo de la invención para generar enzimas con propiedades alternativas deseables, p. ej., actividad enzimática de fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC) que tiene sustratos alternativos, o actividades en diferentes condiciones ambientales, p. ej., diferentes temperaturas, pH y similares. Por ejemplo, las fosfolipasas generadas por los métodos descritos en la presente memoria pueden tener especificidades de sustrato, especificidades de unión a sustrato, patrones de escisión de sustrato, estabilidad térmica, perfil de pH/actividad, perfil de pH/estabilidad (tal como mayor estabilidad a valores de pH bajos p. ej. pH<6 o pH<5, o altos, p. ej. pH>9), estabilidad hacia la oxidación, dependencia de Ca^{2+} , actividad específica y similares, alterados. Los métodos proporcionan cualquier propiedad de interés alterada. Por ejemplo, la alteración puede producir una variante que, comparada con una fosfolipasa original, tiene perfil de actividad de pH y temperatura alterado.

En realizaciones alternativas, las fosfolipasas de la invención se usan en diferentes etapas del procesamiento de aceite, tal como en la extracción de aceite, p. ej., en la eliminación de “gomas de fosfolípidos” en un procedimiento llamado “desgomado del aceite” como se describe en la presente memoria. Se describen en la presente memoria composiciones (p. ej., que comprenden enzimas de la invención) y procedimientos para el tratamiento de aceites, p. ej., aceites brutos, y para la producción de aceites, p. ej., aceites vegetales, de diferentes fuentes, tales como aceite de salvado de arroz, soja, colza, cacahuete, sésamo, girasol y maíz. Las enzimas fosfolipasas de la invención se pueden usar en lugar de PLA, p. ej., fosfolipasa A2, en cualquier etapa de procesamiento de aceite vegetal.

Las enzimas adecuadas para usar en los métodos proporcionados en la presente memoria incluyen, una o más enzimas fosfolipasas A (PLA), fosfolipasas C (PLC), enzimas fosfolipasas C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), o una de sus combinaciones. Las enzimas PLA incluyen fosfolipasa A1 (PLA1) y/o fosfolipasa A2 (PLA2).

Como se usa en la presente memoria, “aceite bruto” se refiere (también llamado aceite no desgomado) a un aceite prensado o extraído, o una mezcla de los mismos, de p. ej., fuentes vegetales que incluyen pero no se limitan a aceite de acai, aceite de almendras, aceite de babassu, aceite de semilla de grosella negra, aceite de semilla de borraja, aceite de canola, aceite de anacardo, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de crambe, aceite de semilla de lino, aceite de semilla de uva, aceite de avellana, aceite de cáñamo, aceite de jatropha, aceite de yoyoba, aceite de linaza, aceite de nuez de macadamia, aceite de nuez de mango, aceite de Limnanthes, aceite de mostaza, aceite de pie de buey, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de cacahuete, aceite de nuez de pecán, aceite de pino, aceite de pistacho, aceite de semilla de amapola, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de sésamo, manteca de karité, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de resina, aceite de tsubaki, aceite de avellana, variedades de aceites “naturales” que tienen composiciones de ácidos grasos alteradas por organismos genéticamente modificados (OGM) o “cruce” tradicional tal como aceites alto oleico, bajo linoleico o bajos saturados

(aceite de canola alto oleico, aceite de soja bajo linoleico o aceites de girasol alto esteárico). Aceites de ejemplo adicionales adecuados para usar en los métodos proporcionados en la presente memoria se describen en otra parte en la presente memoria. En algunas realizaciones, el contenido de fosfatidos totales en un aceite bruto puede variar de 0,5-3% en p/p que corresponde a un contenido de fósforo en el intervalo de 200-1200 ppm o 250-1200 ppm.

- 5 Como se usa en la presente memoria, "aceite desgomado" se refiere a un aceite obtenido después de separación de los NHP, fosfolípidos hidratables y lecitinas (conocidos colectivamente como "gomas") del aceite para producir un aceite o producto de grasa desgomado que se puede usar para la producción de alimentos y/o aplicaciones no alimentarias. Se conocen varios procedimientos de desgomado en la técnica y se ha descrito antes. En algunas realizaciones, el aceite desgomado tiene el contenido de fosfolípidos de menos de aproximadamente 200 ppm
- 10 fósforo, menos de aproximadamente 150 ppm fósforo, menos de aproximadamente 100 ppm fósforo, menos de aproximadamente 50 ppm fósforo, menos de aproximadamente 40 ppm fósforo, menos de aproximadamente 30 ppm fósforo, menos de aproximadamente 20 ppm fósforo, menos de aproximadamente 15 ppm fósforo, menos de aproximadamente 10 ppm fósforo, menos de aproximadamente 7 ppm fósforo, menos de aproximadamente 5 ppm fósforo, menos de aproximadamente 3 ppm fósforo o menos de aproximadamente 1 ppm fósforo.

- 15 Como se usa en la presente memoria, la expresión "fosfolípidos no hidratables" o "NHP" se refiere al ácido fosfatídico y las sales del ácido fosfatídico, por ejemplo, sales de calcio, magnesio y hierro del ácido fosfatídico; y sales de calcio, magnesio y hierro de etanolamina.

- Como se usa en la presente memoria, "aceite desgomado con agua" se refiere a un aceite obtenido después de un procedimiento de desgomado con agua. En algunos casos, el aceite desgomado con agua se obtiene mezclando 1-3% en p/p de agua caliente con aceite bruto caliente (60-90°C) durante 30-60 minutos. En algunos casos, la etapa de desgomado con agua separa los fosfatidos y gomias mucilaginosas que se vuelven insolubles en el aceite cuando se hidratan. Los fosfatidos y gomias hidratadas se pueden separar del aceite por sedimentación, filtración o centrifugación.
- 20

Generación y manipulación de ácidos nucleicos

- 25 Se describen en la presente memoria ácidos nucleicos recombinantes y sintéticos (p. ej., las ilustrativas SEQ ID NO: 5 y ácidos nucleicos que codifican la SEQ ID NO: 6 que comprende (y tiene) uno o más cambios de restos de aminoácidos (p. ej., mutaciones) como se expone en las tablas 12 a 15, que incluyen casetes de expresión tales como vectores de expresión, que codifican los polipéptidos y fosfolipasas descritos en la presente memoria. También se describen métodos para descubrir nuevas secuencias de fosfolipasa que usan los ácidos nucleicos
- 30 descritos en la presente memoria. También se proporcionan métodos para modificar los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, p. ej., por reensamblado por ligado sintético, sistema de evolución dirigida a optimización y/o mutagénesis por saturación.

- Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria se pueden hacer, aislar y/o manipular, p. ej., por clonación y expresión de bibliotecas de ADNc, amplificación de ADN mensajero o genómico por PCR, y similares. En la práctica de los métodos descritos en la presente memoria, se pueden modificar genes homólogos por manipulación de un ácido nucleico molde, como se describe en la presente memoria. Los métodos descritos en la presente memoria se pueden poner en práctica junto con cualquier método o protocolo o dispositivo conocido en la técnica, que están bien descritos en la bibliografía científica y de patentes.
- 35

- Las secuencias de genes o genes descritos en la presente memoria pueden comprender el segmento de ADN implicado en la producción de una cadena de polipéptido que incluye, entre otros, regiones que preceden y que siguen a la región codificante, tal como regiones líder y remolque, promotores y potenciadores, así como, cuando sea aplicable, secuencias intermedias (intrones) entre los segmentos codificantes individuales (exones).
- 40

- Alternativamente, los ácidos nucleicos o secuencias de ácidos nucleicos descritos en la presente memoria pueden comprender un oligonucleótido, nucleótido, polinucleótido, o un fragmento de cualquiera de estos, ADN o ARN (p. ej., ARNm, ARNr, ARNt, ARNi) de origen genómico o sintético, que pueden ser monocatenarios o bicatenarios y pueden representar una cadena homsentido o antisentido, ácido nucleico peptídico (PNA) o cualquier material de tipo ADN o de tipo ARN, de origen natural o sintético, que incluyen, por ejemplo, ARNi, ribonucleoproteínas (p. ej., ARNi bicatenarios, p. ej., RNPi). El término abarca ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. Alternativamente, los ácidos nucleicos o secuencias de ácidos
- 45 nucleicos descritos en la presente memoria también abarcan estructuras de tipo ácido nucleico con cadenas principales sintéticas, véase, p. ej., Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36:8692-8698; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:153-156.
- 50

Técnicas generales

- Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria sean ARN, ARNi, ácido nucleico de sentido contrario, ADNc, ADN genómico, vectores, virus o sus híbridos, se pueden aislar de una variedad de fuentes, modificar genéticamente, amplificar y/o expresar/generar de forma recombinante. Los polipéptidos recombinantes generados a partir de estos ácidos nucleicos se pueden aislar individualmente o clonar y ensayar una actividad deseada. Se
- 55

puede usar cualquier sistema de expresión recombinante, incluyen sistemas de expresión de célula bacteriana, de mamífero, levadura, insecto o planta.

Alternativamente, estos ácidos nucleicos se pueden sintetizar in vitro por técnicas de síntesis química bien conocidas, como se describe en, p. ej., Adams (1983) *J. Am. Chem. Soc.* 105:661; Belousov (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3440-3444; Frenkel (1995) *Free Radic. Biol. Med.* 19:373-380; Blommers (1994) *Biochemistry* 33:7886-7896; Narang (1979) *Meth. Enzymol.* 68:90; Brown (1979) *Meth. Enzymol.* 68:109; Beaucage (1981) *Tetra. Lett.* 22:1859; patente de EE.UU. nº 4.458.066.

Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como, p. ej., subclonación, sondas de marcaje (p. ej., marcaje de cebador aleatorio usando polimerasa Klenow, traslado de corte, amplificación), secuenciación, hibridación y similares, están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes, véase, p. ej., p. ej., Sambrook, ed., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ED.), Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); *Current Protocols In Molecular Biology*, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); *Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology: Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parte I. Theory and Nucleic Acid Preparation*, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

Otro medio útil de obtención y manipulación de ácido nucleicos usado para la práctica de los métodos descritos en la presente memoria, es clonar a partir de muestras genómicas y, si se desea cribar y volver a clonar insertos aislados o amplificados, p. ej. de clones genómicos o clones de ADNc. Las fuentes de ácido nucleico usadas en los métodos descritos en la presente memoria incluyen bibliotecas de ADN genómico o ADNc contenido, p. ej., en cromosomas artificiales de mamífero (MACs), véase, p. ej., las patentes de EE.UU. nº 5.721.118; 6.025.155; cromosomas artificiales humanos, véase, p. ej., Rosenfeld (1997) *Nat. Genet.* 15:333-335; cromosomas artificiales de levadura (YAC); cromosomas artificiales bacterianos (BAC); cromosomas artificiales P1, véase, p. ej., Woon (1998) *Genomics* 50:306-316; vectores derivados de P1 (PACs), véase, p. ej., Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124; cósmidos, virus recombinantes, fagos o plásmidos.

En un caso, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención se ensambla en una fase adecuada con una secuencia líder capaz de dirigir la secreción del polipéptido traducido o su fragmento.

Se describen en la presente memoria proteínas de fusión y ácidos nucleicos que las codifican. Un polipéptido de la invención se puede fusionar con un péptido o polipéptido heterólogo, tal como péptidos de identificación N-terminal que imparten características deseadas, tales como mayor estabilidad o purificación simplificada. Los péptidos y polipéptidos de la invención también se pueden sintetizar y expresar como proteínas de fusión con uno o más dominios adicionales unidos a los mismos, p. ej., para producir un péptido más inmunógeno, para aislar más fácilmente un péptido sintetizado de forma recombinante, para identificar y aislar anticuerpos y linfocitos B que expresan anticuerpos, y similares. Los dominios que facilitan la detección y purificación incluyen, p. ej., péptidos queladores de metales tales como tramos de polihistidina y módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación con metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación con inmunoglobulina inmovilizada, y el dominio usado en el sistema de purificación por extensión afinidad FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA). La inclusión de secuencias conectoras escindibles tales como Factor Xa o enteroquinasa (Invitrogen, San Diego CA) entre un dominio de purificación y el péptido o polipéptido que comprenden el motivo para facilitar la purificación. Por ejemplo, un vector de expresión puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica el epítipo conectada a seis restos de histidina seguido de un sitio de escisión por una tiorredoxina y una enteroquinasa (véase p. ej., Williams (1995) *Biochemistry* 34:1787-1797; Dobeli (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:404-414). Los restos de histidina facilitan la detección y purificación, mientras que el sitio de escisión de enteroquinasa proporciona un medio para la purificación del epítipo del resto de la proteína de fusión. La tecnología relativa a los vectores que codifican proteínas de fusión y la aplicación de las proteínas de fusión están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes, véase, p. ej., Kroll (1993) *DNA Cell. Biol.*, 12:441-53.

Secuencias de control de la transcripción y traducción

Se proporcionan en la presente invención secuencias de ácido nucleico (p. ej., ADN) operativamente unidas a secuencia(s) de control de la expresión (p. ej., transcripción o traducción), p. ej., promotores o potenciadores, para dirigir o modular la síntesis/expresión de ARN. La secuencia de control de la expresión puede estar en un vector de expresión. Los promotores bacterianos de ejemplo incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda PR, PL y trp. Los promotores eucariotas de ejemplo incluyen el temprano inmediato de CMV, timidina quinasa de HSV, SV40 temprano y tardío, LTR de retrovirus, y metalotioneína I de ratón.

Los promotores adecuados para expresar un polipéptido en bacterias incluyen promotores lac o trp de *E. coli*, el promotor lacI, el promotor lacZ, el promotor T3, el promotor T7, el promotor gpt, el promotor lambda PR, el promotor lambda PL, promotores de operones que codifican enzimas glucolíticas tales como 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), y el promotor de la ácido fosfatasa. Los promotores eucariotas incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina quinasa de HSV, promotores de choque térmico, el promotor temprano y tardío de SV40, LTR de retrovirus, y el promotor de metalotioneína-I de ratón. También se pueden usar otros promotores conocidos para el control de la expresión de genes en células procariotas o eucariotas o sus virus.

Casetes de expresión, vectores y vehículos de clonación

Se proporcionan en la presente invención vectores de expresión y vehículos de clonación que comprenden ácidos nucleicos, p. ej., secuencias que codifican las fosfolipasas de la invención. Los vectores de expresión y vehículos de clonación descritos en la presente memoria comprenden partículas víricas, baculovirus, fago, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósmodos, cromosomas artificiales bacterianos, ADN vírico (p. ej., virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, pseudorrabia y derivados de SV40), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levaduras, cromosomas artificiales de levaduras, y cualesquiera otros vectores específicos para hospedantes específicos de interés (tales como *Bacillus*, *Aspergillus* y levaduras). Los vectores pueden incluir secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas). Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores adecuados, y están disponibles en el comercio. Los vectores de ejemplo incluyen: bacterianos: vectores pQE (Qiagen, San Diego, CA), plásmidos pBluescript (Stratagene, San Diego, CA), vectores pNH, (lambda-ZAP vectors (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); Eucariotas: pXTI, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). Sin embargo, se puede usar cualquier otro plásmido u otro vector con la condición de que se puedan replicar y sean viables en el hospedante. Se pueden usar vectores de número de copias bajo o número de copias alto con los presentes métodos.

En casos alternativos, la frase "casete de expresión" comprende una secuencia de nucleótidos que es capaz de afectar a la expresión de un gen estructural (es decir, una secuencia codificante de proteína, tal como una fosfolipasa de la invención) en un hospedante compatible con dichas secuencias. El casete de expresión puede incluir al menos un promotor operativamente unido con la secuencia codificante del polipéptido; y, opcionalmente con otras secuencias, p. ej., señales de terminación de la transcripción. También se pueden usar factores adicionales necesarios o útiles para realizar la expresión, p. ej., potenciadores. En casos alternativos, "operativamente unido" se refiere a la unión de un promotor en la dirección 5' de una secuencia de ADN de modo que el promotor media la transcripción de la secuencia de ADN. En casos alternativos, los casetes de expresión incluyen plásmidos, vectores de expresión, virus recombinantes, cualquier forma de vector de "ADN desnudo" recombinante, y similares.

En casos alternativos, los vectores descritos en la presente memoria comprenden un ácido nucleico que puede infectar, transfectar, transducir transitoria o permanentemente una célula. En casos alternativos, un vector puede ser un ácido nucleico desnudo, o un ácido nucleico en complejo con proteína o lípido. El vector comprende opcionalmente ácidos nucleicos víricos o bacterianos y/o proteínas y/o membranas (p. ej., una membrana celular, una envuelta lipídica de virus, etc.). Los vectores descritos en la presente memoria incluyen, pero no se limitan a replicones (p. ej., replicones de ARN, bacteriófagos) a los que se pueden unir fragmentos de ADN y ser replicados. Por lo tanto, los vectores incluyen, pero no se limitan a ARN, ADN o ARN lineal o circular de autorreplicación autónomo (p. ej., plásmidos, virus y similares, véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 5.217.879), e incluye plásmidos tanto de expresión como no de expresión. Cuando se describe un microorganismo recombinante o cultivo celular como hospedante, un vector de expresión de este incluye tanto ADN lineal y circular extracromosómico como ADN que se ha incorporado en el(los) cromosomas del hospedante. Cuando un vector es mantenido por una célula, el vector puede ser replicado establemente por las células durante la mitosis como una estructura autónoma, o es incorporado dentro del genoma del hospedante.

Se describen en la presente memoria plásmidos, que se puede designar con un "p" minúscula precedida y/o seguida de letras mayúsculas y/o números. En casos alternativos, un plásmido "inicial" está disponible en el comercio, disponible públicamente en una base no restringida, o se puede construir a partir de plásmidos disponibles de acuerdo con procedimientos publicados. En casos alternativos, se conocen en la técnica plásmidos equivalentes a los descritos en la presente memoria y serán evidentes para el experto en la técnica.

En casos alternativos, un vector de expresión puede comprender un promotor, un sitio de unión al ribosoma para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias adecuadas para amplificar la expresión. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender un origen de replicación, cualesquiera sitios de unión al ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios de donador y aceptor de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción, y secuencias no transcritas flanqueadoras 5'. En algunos casos, las secuencias de ADN derivadas de los sitios de corte y empalme y poliadenilación de SV40 se pueden usar para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

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

Los vectores para la expresión del polipéptido o fragmento del mismo en células eucariotas también pueden contener potenciadores para aumentar los niveles de expresión. Los potenciadores son elementos que actúan en *cis* del ADN, normalmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 pb de longitud que actúan en un promotor para aumentar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de

replicación de 100 a 270 pb, el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y los potenciadores de adenovirus.

Una secuencia de ADN se puede insertar en un vector por una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se liga en la posición deseada en el vector después de digestión del inserto y el vector con las endonucleasas de restricción adecuadas. Alternativamente, se pueden ligar extremos romos tanto en el inserto como en el vector. Se conocen una variedad de técnicas de clonación en la materia, p. ej., como se describe en Ausubel y Sambrook. Dichos procedimientos y otros se considera que están dentro del alcance de los expertos en la técnica.

El vector puede estar en forma de un plásmido, una partícula vírica o un fago. Otros vectores incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, derivados de SV40; plásmidos bacterianos, ADN de fago, baculovirus, plásmidos de levaduras, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fago, ADN vírico tal como de virus vaccinia, virus de la viruela aviar y pseudorrabia. Se describe una variedad de vectores de clonación y expresión para usar con hospedantes procariontes y eucariotas, p. ej., en Sambrook.

Los vectores bacterianos particulares que se pueden usar incluyen plásmidos disponibles en el mercado que comprenden elementos genéticos del vector de clonación conocido pBR322 (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), GEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, EE.UU.) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pD10, psiX174 pBluescript II KS, pNH8A, pNH16A, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 and pCM7. Los vectores eucariotas particulares incluyen pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, y pSVL (Pharmacia). Sin embargo, se puede usar cualquier otro vector con la condición de que se pueda replicar y sea viable en la célula hospedante.

Células hospedantes y células transformadas

Se describe en la presente memoria una célula transformada que comprende una secuencia de ácido nucleico, p. ej., una secuencia que codifica una fosfolipasa de la invención, o un vector descritos en la presente memoria. La célula hospedante puede ser cualquiera de las células hospedantes conocidas para los expertos en la técnica, incluyendo células procariontes, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células de mamífero, células de insecto o células vegetales. Las enzimas de la invención se pueden expresar en cualquier célula hospedantes, p. ej., cualquier célula bacteriana, cualquier célula de levadura, p. ej. *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células bacterianas de ejemplo incluyen cualquier especie dentro de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, que incluyen, p. ej., *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Las células fúngicas de ejemplo incluyen cualquier especie de *Aspergillus*. Las células de levadura de ejemplo incluyen cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Schwanniomyces*, que incluyen *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de insecto de ejemplo incluyen cualquier especie de *Spodoptera* o *Drosophila*, que incluyen *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Las células animales de ejemplo incluyen CHO, COS o melanoma de Bowes o cualquier línea celular de ratón o humana. La selección de un hospedante adecuado está dentro de la experiencia de los expertos en la técnica.

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

Cuando sea adecuado, las células hospedantes genéticamente modificadas se pueden cultivar en medios nutrientes convencionales modificados como sea adecuado para la activación de promotores, selección de transformantes o amplificación de genes descritos en la presente memoria. Después de la transformación de una cepa de hospedante adecuado y cultivo de la cepa hospedante hasta una densidad celular adecuada, el promotor adecuado se puede inducir por medios adecuados (p. ej., cambio de temperatura o inducción química) y las células se pueden cultivar durante un periodo adicional para permitir que produzcan el polipéptido deseado o fragmento del mismo.

Las células se pueden recoger por centrifugación, alterar por medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante se retiene para la purificación adicional. Las células microbianas usadas para la expresión de proteínas se pueden alterar por cualquier método conveniente, que incluyen ciclos de congelación-descongelación, ultrasonidos, alteración mecánica, o uso de agentes de lisis celular. Dichos métodos son bien conocidos para los expertos en la técnica. El polipéptido expresado o fragmento del mismo se puede recuperar y purificar de los cultivos de células recombinantes por métodos que incluyen precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatito y cromatografía de lecitina. Se pueden usar etapas de plegado de proteínas, según sea necesario, para completar la configuración del polipéptido. Si se desea, se puede usar cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas de purificación finales.

Se pueden usar diferentes sistemas de cultivos de células de mamífero para expresar la proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono y otras líneas celulares capaces de expresar proteínas de un vector comparable, tales como las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK.

- 5 Las construcciones en células hospedantes se pueden usar de una forma convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Dependiendo del hospedante usado en el procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos producidos por las células hospedantes que contienen el vector se pueden glucosilar o pueden no glucosilarse. Los polipéptidos de la invención pueden incluir o no un resto de aminoácido metionina inicial.
- 10 Los sistemas de traducción sin células también se pueden usar para producir un polipéptido de la invención. Los sistemas de traducción sin células pueden usar ARNm transcritos a partir de una construcción de ADN que comprende un promotor operativamente unido a un ácido nucleico que codifica el polipéptido o fragmento del mismo. En algunos casos, la construcción de ADN se puede linearizar antes de llevar a cabo una reacción de transcripción in vitro. El ARNm transcrito después se incuba con un extracto de traducción sin células adecuado, tal como un
- 15 extracto de reticulocitos de conejo, para producir el polipéptido deseado o fragmento del mismo.

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

- 20 Una enzima PI-PLC de ejemplo (que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 6 que comprende (y que tiene) uno o más cambios de restos de aminoácidos (p. ej., mutaciones) como se exponen en las tablas 12 a 15) se ha expresado en exceso en forma activa en una variedad de sistemas hospedantes que incluyen bacterias Gram negativas, tales como *E. coli*, bacterias Gram positivas, tal como cualquier *Bacillus* sp. (p. ej., *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*), células hospedantes de levaduras (que incluyen, p. ej., *Pichia pastoris*, *Saccharomyces* sp., tales
- 25 como *S. cerevisiae* y *S. pombe*) y *Lactococcus lactis*, o células de mamífero, hongo, planta o insecto. La enzima activa se expresa a partir de una variedad de construcciones en cada sistema hospedante. La enzima activa es expresada de una variedad de construcciones en cada sistema hospedante. Estas construcciones de expresión de ácidos nucleicos pueden comprender nucleótidos que codifican el marco de lectura abierto en toda su longitud (compuesto de la secuencia señal, la prosequencia, y la secuencia codificante de la proteína madura) o pueden
- 30 comprender un subconjunto de estos elementos genéticos solos o en combinación con elementos genéticos heterólogos que sirven como la secuencia señal y/o la prosequencia para el marco de lectura abierto maduro. Cada uno de estos sistemas puede servir como un hospedante de producción comercial para la expresión de la PLC para usar en el procedimiento de desgomado de aceite enzimático descrito previamente.

Amplificación de ácidos nucleicos

- 35 En la práctica de la invención, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de la invención, o ácidos nucleicos modificados, se pueden reproducir, p. ej., por amplificación. Se describen en la presente memoria parejas de secuencias de cebadores de amplificación para amplificar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos con una actividad de fosfolipasa. En un aspecto, las parejas de cebadores son capaces de amplificar secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria. Un experto en la técnica puede diseñar parejas de secuencias de
- 40 cebadores de amplificación para cualquier parte de o la longitud total de estas secuencias.

Se describe en la presente memoria una pareja de secuencias de cebadores de amplificación para amplificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa, en donde la pareja de cebadores es capaz de amplificar un ácido nucleico que comprende una secuencia descrita en la presente memoria o sus fragmentos o subsecuencias. Uno o ambos miembros de la pareja de secuencias de cebadores de amplificación

- 45 comprenden un oligonucleótido que comprende al menos aproximadamente 10 a 50 bases consecutivas de la secuencia, o aproximadamente 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 bases consecutivas de la secuencia.

- Se describen en la presente memoria parejas de cebadores de amplificación, en donde la pareja de cebadores comprende un primer miembro que tiene una secuencia como se expone por aproximadamente los primeros (5') 12,
- 50 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 restos de un ácido nucleico y un segundo miembro que tiene una secuencia como se expone por aproximadamente los primeros (5') 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 restos de la cadena complementaria del primer miembro. Se proporcionan en la presente invención fosfolipasas generadas por amplificación, p. ej., por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando una pareja de cebadores de amplificación. Se describen en la presente memoria métodos para hacer una fosfolipasa por
- 55 amplificación, p. ej., por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando una pareja de cebadores de amplificación. En un caso, la pareja de cebadores de amplificación amplifica un ácido nucleico de una biblioteca, p. ej., una biblioteca génica, tal como una biblioteca ambiental.

Las reacciones de amplificación también se pueden usar para cuantificar la cantidad de ácido nucleico en una muestra (tal como la cantidad de mensajero en una muestra de célula), marcar el ácido nucleico (p. ej., para aplicar a una matriz o una transferencia), detectar el ácido nucleico o cuantificar la cantidad de un ácido nucleico específico en una muestra. Se describen en la presente memoria, la amplificación de mensajeros aislados de una célula o una biblioteca de ADNc. El experto en la técnica puede seleccionar y diseñar cebadores de amplificación de oligonucleótidos adecuados. Los métodos de amplificación son bien conocidos en la técnica, e incluyen, p. ej., reacción en cadena de la polimerasa, PCR (véase, p. ej., PCR Protocols, A Guide To Methods And Applications, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) y PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y., la reacción en cadena de ligasa (LCR) (véase, p. ej., Wu (1989) *Genomics* 4:560; Landegren (1988) *Science* 241:1077; Barringer (1990) *Gene* 89:117); amplificación de transcripción (véase, p. ej., Kwok (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173); y, replicación de secuencia autosostenida (véase, p. ej., Guatelli (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874); amplificación de Q-Beta replicasa (véase, p. ej., Smith (1997) *J. Clin. Microbiol.* 35:1477-1491), ensayo de amplificación de Q-beta replicasa automático (véase, p. ej., Burg (1996) *Mol. Cell. Probes* 10:257-271) y otras técnicas mediadas por la ARN polimerasa (p. ej., NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véase también Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152:307-316; Sambrook; Ausubel; patentes de EE.UU. nº 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan (1995) *Biotechnology* 13:563-564.

Determinación del grado de identidad de secuencia

Se describen en la presente memoria ácidos nucleicos aislados y recombinantes que comprenden secuencias que tienen al menos aproximadamente 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, de identidad de secuencia o completa (100%), con un ácido nucleico de ejemplo (p. ej., SEQ ID NO: 5 y que codifica una o más mutaciones como se exponen en las tablas 12 a 15, como se describe en el ejemplo 3, o uno de sus fragmentos enzimáticamente activo, y ácidos nucleicos que codifican la SEQ ID NO: 6 y que codifican una o más mutaciones como se exponen en las tablas 12 a 15, como se describe en el ejemplo 3, o uno de sus fragmentos enzimáticamente activo) a lo largo de una región de al menos aproximadamente 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550 o más, restos. Se proporcionan en la presente invención polipéptidos que comprenden secuencias que tiene al menos aproximadamente 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, de identidad de secuencia o completa (100%), con un polipéptido de ejemplo descrito en la presente memoria. La extensión de la identidad de secuencia (homología) se puede determinar usando cualquier programa de ordenador y parámetros asociados, que incluyen los descritos en la presente memoria, tales como BLAST 2.2.2. o FASTA versión 3.0t78, con los parámetros por defecto. En casos alternativos, la identidad de secuencia puede ser a lo largo de una región de al menos aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 restos consecutivos, o la longitud entera del ácido nucleico o polipéptido. La extensión de la identidad de secuencia (homología) se puede determinar usando cualquier programa de ordenador y parámetros asociados, que incluyen los descritos en la presente memoria, tales como BLAST 2.2.2. o FASTA versión 3.0t78, con los parámetros por defecto.

Las secuencias homólogas también incluyen secuencias de ARN en las que uridinas sustituyen a las timinas en las secuencias de ácido nucleico. Las secuencias homólogas se pueden obtener usando cualquiera de los procedimientos descritos en la presente memoria o pueden ser resultado de la corrección de un error de secuenciación. Se apreciará que las secuencias de ácido nucleico como se exponen en la presente memoria se pueden representar en el formato de un solo carácter tradicional (véase, p. ej., Stryer, Lubert. *Biochemistry*, 3ª Ed., W. H Freeman & Co., New York) o en cualquier otro formato que registre la identidad de los nucleótidos en una secuencia.

Se pueden usar varios programas de comparación de secuencias identificados en la presente memoria. Las identidades (homologías) de secuencias de proteínas y/o ácidos nucleicos se pueden evaluar usando cualquiera de la variedad de algoritmos de comparación de secuencias y programas conocidos en la técnica. Dichos algoritmos y programas incluyen, pero no se limitan a TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA, y CLUSTALW (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(8):2444-2448, 1988; Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410, 1990; Thompson et al., *Nucleic Acids Res.* 22(2):4673-4680, 1994; Higgins et al., *Methods Enzymol.* 266:383-402, 1996; Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., *Nature Genetics* 3:266-272, 1993).

La homología o identidad se puede medir usando software de análisis de secuencias (p. ej., Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Dichos programas emparejan secuencias similares asignando grados de homología a diferentes eliminaciones, sustituciones y otras modificaciones. Los términos "homología" e "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales cuando se comparan y alinean para la máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación o región designada medida usando cualquier número de algoritmos de comparación de secuencias o por alineamiento

manual e inspección visual. Para la comparación de secuencias, una secuencia puede actuar como una secuencia de referencia con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, posteriormente se designan coordenadas, si es necesario, y se designan parámetros al programa de algoritmo de secuencia. Se pueden usar los parámetros del programa por defecto, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación" como se usa en la presente memoria, incluye la referencia a un segmento de cualquiera del número de restos contiguos. Por ejemplo, se comparan restos contiguos en el intervalo en cualquier sitio desde 20 a la longitud entera de una secuencia de ejemplo con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que se hayan alineado de forma óptima las dos secuencias. En casos alternativos, se comparan subsecuencias en el intervalo de aproximadamente 20 a 600, de aproximadamente 50 a 200, y de aproximadamente 100 a 150 con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de haber alineado de forma óptima las dos secuencias. Los métodos de alineamiento de secuencias para la comparación son bien conocidos en la técnica. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, p. ej., por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981, por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, por la búsqueda por el método de similitudes de Person y Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, por implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de programas de Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineamiento manual e inspección visual. Otros algoritmos para determinar la homología o identidad incluyen, por ejemplo, además de un programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool at the National Center for Biological Information), ALIGN, AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences), AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment), ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node), BLIMPS (BLOCKS IMPROVED Searcher), FASTA, Intervals & Points, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, algoritmo de Smith-Waterman, DARWIN, algoritmo de Las Vegas, FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool), Framealign, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package), GAP (Global Alignment Program), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Sensitive Sequence Comparison), LALIGN (Local Sequence Alignment), LCP (Local Content Program), MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench), MAP (Multiple Alignment Program), MBLKP, MBLKN, PIMA (Pattern-Induced Multi-sequence Alignment), SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) y WHAT-IF. Dichos programas de alineamiento también se pueden usar para cribar bases de datos genómicas para identificar secuencias de polinucleótidos que tienen secuencias sustancialmente idénticas. Están disponibles una serie de bases de datos genómicas, por ejemplo, está disponible una parte sustancial del genoma humano del Proyecto de Secuenciación del Genoma Humano (Gibbs, 1995). Se han secuenciado varios genomas, p. ej., *M. genitalium* (Fraser et al., 1995), *M. jannaschii* (Bult et al., 1996), *H. influenzae* (Fleischmann et al., 1995), *E. coli* (Blattner et al., 1997), y levaduras (*S. cerevisiae*) (Mewes et al., 1997), y *D. melanogaster* (Adams et al., 2000). También se ha hecho un avance importante en la secuenciación de genomas de organismo modelo, tal como ratón, *C. elegans*, y *Arabidopsis sp.* Las bases de datos que contienen información genómica anotada con alguna información funcional son mantenidas por diferentes organizaciones, y son accesibles vía internet.

Los algoritmos BLAST, BLAST 2.0 y BLAST 2.2.2 también se usan en los métodos descritos en la presente memoria. Se describen, p. ej., en Altschul (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402; Altschul (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. El software para llevar a cabo los análisis BLAST está a disposición del público a través del Centro Nacional para la Investigación Biotecnológica. Este algoritmo implica primero identificar parejas de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral T de valor positivo, cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de la palabra vecina (Altschul (1990), véase antes). Estos aciertos iniciales de palabras vecinas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que las contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tan lejos como la puntuación de alineación acumulativa se pueda incrementar. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para una pareja de residuos que coinciden; siempre > 0). Para secuencias de aminoácidos, se emplea una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulativa disminuye en una cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulativa llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o varias alineaciones de residuos con puntuación negativa; o se alcanza el final de cualquier secuencia. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) emplea por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra de 3, y una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1989), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915), alineaciones (B) de 50, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin y Altschul (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873). Una medición de la similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la menor probabilidad de suma (P(N)), que proporciona una

indicación de la probabilidad con la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia, si la menor probabilidad de suma en una comparación del ácido nucleico del ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor de aproximadamente 0,2, más preferiblemente menor de aproximadamente 0,01 y lo más preferiblemente menor de aproximadamente 0,001. En un caso, las homologías de secuencia de ácidos nucleicos y proteínas se evalúan usando la herramienta Basic Local Alignment Search Tool ("BLAST"). Por ejemplo, se pueden usar cinco programas BLAST específicos para realizar la siguiente tarea: (1) BLASTP y BLAST3 comparan una secuencia de aminoácidos de consulta frente a una base de datos de secuencias de proteínas; (2) BLASTN compara una secuencia de nucleótidos de consulta frente a una base de datos de secuencias de nucleótidos; (3) BLASTX compara los productos de traducción conceptual de seis marcos de lectura de una secuencia de nucleótidos de consulta (ambas cadenas) frente a una base de datos de secuencias de proteínas; (4) TBLASTN compara una secuencia de proteína de consulta frente a una base de datos de secuencias de nucleótidos traducida en los seis marcos de lectura (ambas cadenas); y (5) TBLASTX compara las traducciones de los seis marcos de lectura de una secuencia de nucleótidos de consulta frente a las traducciones de seis marcos de lectura de una base de datos de secuencias de nucleótidos. Los programas BLAST identifican secuencias homólogas identificando segmentos similares, que se denominan en la presente memoria "parejas de segmentos de alta puntuación" entre una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos de consulta y una secuencia de ensayo que preferiblemente se obtiene de una base de datos de secuencias de proteínas o ácidos nucleicos. Las parejas de segmentos de alta puntuación se identifican preferiblemente (es decir, se alinean) mediante una matriz de puntuación, muchas de las cuales son conocidas en la técnica. Preferiblemente, la matriz de puntuación usada es la matriz BLOSUM62 (Gonnet et al., *Science* 256:1443-1445, 1992; Henikoff y Henikoff, *Proteins* 17:49-61, 1993). Menos preferiblemente, también se pueden usar las matrices PAM o PAM250 (véase, p. ej., Schwartz y Dayhoff, eds., 1978, *Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure*, Washington: National Biomedical Research Foundation).

Para determinar la identidad de secuencia de un ácido nucleico, se usa el programa de NCBI BLAST 2.2.2. Opciones por defecto de blastp. Hay aproximadamente 38 opciones de ajuste en el programa BLAST 2.2.2. En este ejemplo, se usan todos los valores por defecto excepto el ajuste de filtración por defecto (es decir, todos los parámetros ajustados por defecto excepto filtración que se ajusta a OFF); en su lugar se usa en ajuste "-F F", que desactiva la filtración. el uso de la filtración por defecto a menudo produce violaciones de Karlin-Altschul debido a la longitud corta de la secuencia:

Los valores por defecto usados en este ejemplo, como se describen a continuación, incluyen:

"Filtrado para complejidad baja: Activado (ON)

> Tamaño de palabra: 3

> Matriz: Blosum62

> Coste por hueco: existencia:11

> Extensión: 1"

Otros ajustes por defecto son: filtro para complejidad baja desactivado OFF, tamaño de palabra 3 para proteína, matriz BLOSUM62, penalización por existencia de hueco -11 y una penalización por extensión de hueco de -1.

En el ejemplo 1 se expone el ajuste de ejemplo del programa NCBI BLAST 2.2.2, más adelante. Obsérvese que la opción por defecto de "-W" es 0. Esto significa que, si no se ajusta el tamaño de la palabra por defecto es 3 para proteínas y 11 para nucleótidos.

Hibridación de ácidos nucleicos

Se describen en la presente memoria ácidos nucleicos sintéticos o recombinantes aislados que hibridan en condiciones restrictivas con una secuencia de ejemplo descrita en la presente memoria p. ej., una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5 y que tiene una o más mutaciones como se expone en las tablas 12 a 15, como se describe en el ejemplo 3, más adelante, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 6 y que codifica una o más mutaciones como se exponen en las tablas 12 a 15, o uno de sus fragmentos enzimáticamente activos.

Las condiciones restrictivas pueden ser condiciones de restricción alta, condiciones de restricción media, condiciones de restricción baja, que incluyen las condiciones de restricción alta y reducida descritas en la presente memoria. En casos alternativos, los ácidos nucleicos definidos por su capacidad para hibridar en condiciones restrictivas pueden ser de entre aproximadamente cinco restos y toda la longitud de la molécula. Por ejemplo, pueden ser de al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400 o más restos de longitud. También están incluidos los ácidos nucleicos más cortos que la longitud entera. Estos ácidos nucleicos son útiles como, p. ej., sondas de hibridación, sondas de marcaje, sondas de oligonucleótidos de la PCR, ARNi (mono o bicatenario), secuencia de sentido contrario o secuencias que codifican péptidos de unión a anticuerpo (epítomos), motivos, sitios activos, dominios de unión, dominios reguladores y similares.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria se definen por su capacidad para hibridar en restricción alta que comprende condiciones de formamida aproximadamente al 50% a aproximadamente de 37°C a 42°C. En un caso, los ácidos nucleicos se definen por su capacidad para hibridar con restricción reducida que comprende condiciones de formamida aproximadamente de 35% a 25% a aproximadamente de 30°C a 35°C. Alternativamente, los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria se definen por su capacidad para hibridar en restricción alta que comprende condiciones a 42°C en formamida al 50%, 5X SSPE, SDS al 0,3%, y una secuencia repetitiva de ácido nucleico de cloqueo tal como ADN cot-1 o de esperma de salmón (p. ej., 200 ug/ml de esperma de salmón fraccionado y desnaturalizado). Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria se pueden definir por su capacidad para hibridar en condiciones de restricción reducida que comprende formamida al 35% a una temperatura reducida de 35°C.

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

El intervalo de temperatura que corresponde a un nivel particular de restricción se puede estrechar más calculando la relación de purina a pirimidina del ácido nucleico de interés y ajustando la temperatura en consecuencia. Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria también se definen por su capacidad para hibridar en condiciones de restricción alta, media y baja como se expone en Ausubel y Sambrook. Se pueden usar variaciones de los intervalos y condiciones anteriores para la práctica de los métodos descritos en la presente memoria. Las condiciones de hibridación se describen con más detalle, más adelante.

Sondas de oligonucleótidos y métodos para usarlas

También se describen en la presente memoria sondas de ácido nucleico para identificar y/ aislar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene una actividad de fosfolipasa. En un caso, la sonda comprende o consiste en un ácido nucleico descrito en la presente memoria p. ej., un ácido nucleico que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 5 y que tiene uno o más cambios de bases (mutaciones) como se expone en las tablas 12 a 15, como se describe en el ejemplo 3, más adelante, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido que comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 6 y que codifica uno o más cambios de restos de aminoácidos (mutaciones) como se exponen en las tablas 12 a 15, o uno de sus fragmentos enzimáticamente activos. Alternativamente, una sonda puede ser de al menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, o 150, o más, o aproximadamente de 10 a 50, aproximadamente de 20 a 60, aproximadamente de 30 a 70, bases consecutivas de una secuencia de ácido nucleico descrita en la presente memoria.

Las sondas identifican un ácido nucleico por unión o hibridación. En casos alternativos, la hibridación comprende el procedimiento por el cual una cadena de ácido nucleico se junta con una cadena complementaria mediante emparejamiento de bases. Las reacciones de hibridación pueden ser sensibles y selectivas de modo que una secuencia particular de interés se puede identificar incluso en muestras en las que está presente en concentraciones bajas. Las condiciones de restricción adecuadas se pueden definir, por ejemplo, por las concentraciones de sal o formamida en soluciones de prehibridación e hibridación, o por la temperatura de hibridación, y son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, la restricción se puede aumentar reduciendo la concentración de sal, aumentando la concentración de formamida, o elevando la temperatura de hibridación, alterando el tiempo de hibridación, como se describe con detalle, más adelante. En casos alternativos, los ácidos nucleicos se definen por su capacidad para hibridar en diferentes condiciones de restricción (p. ej., alta, media y baja), como se expone en la presente memoria.

Las sondas se pueden usar en matrices descritas en la presente memoria, véase la descripción más adelante, que incluyen p. ej., matrices capilares. Las sondas también se pueden usar para aislar y/o identificar otros ácidos nucleicos que codifican fosfolipasa o polipéptidos que tienen una actividad de fosfolipasa.

Las sondas descritas en la presente memoria se pueden usar para determinar si una muestra biológica, tal como una muestra de suelo, contiene un organismo que tiene una secuencia de ácido nucleico descrita en la presente memoria. En dichos procedimientos, se obtiene una muestra biológica que alberga potencialmente el organismo del cual se aisló el ácido nucleico, y se obtienen ácidos nucleicos de la muestra. Los ácidos nucleicos se ponen en contacto con la sonda en condiciones que permiten que la sonda hibride específicamente con cualquier secuencia complementaria presente en la muestra. Cuando sea necesario, las condiciones que permiten que la sonda hibride específicamente con secuencias complementarias se pueden determinar poniendo la sonda en contacto con secuencias complementarias de muestras que se sabe que contienen la secuencia complementaria, así como secuencias de control que no contienen la secuencia complementaria. Las condiciones de hibridación, tales como la concentración de sal del tampón de hibridación, la concentración de formamida del tampón de hibridación o la temperatura de hibridación se pueden variar para identificar condiciones que permiten que la sonda hibride específicamente con ácidos nucleicos complementarios (véase la descripción sobre las condiciones de hibridación específicas).

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

Alternativamente, se puede usar más de una sonda (al menos una que es capaz de hibridar específicamente con cualquier secuencia complementaria que esté presente en la muestra de ácidos nucleicos) en una reacción de amplificación para determinar si la muestra contiene un organismo que contiene una secuencia de ácido nucleico descrita en la presente memoria (p. ej., un organismo del que se aisló el ácido nucleico). En un caso, las sondas comprenden oligonucleótidos. En un caso, la reacción de amplificación puede comprender una reacción de PCR. Se describen protocolos de PCR en Ausubel y Sambrook (Véase la descripción sobre las reacciones de amplificación). En dichos procedimientos, los ácidos nucleicos en la muestra se ponen en contacto con las sondas, se lleva a cabo la reacción de amplificación, y se detecta cualquier producto de amplificación resultante. El producto de amplificación se puede detectar llevando a cabo electroforesis en gel de los productos de reacción y tinción del gel en un intercalador tal como bromuro de etidio. Alternativamente, se pueden marcar una o más de las sondas con un isótopo radiactivo y se puede detectar la presencia de un producto de amplificación radiactivo por autorradiografía después de electroforesis en gel.

Las sondas derivadas de secuencias cerca de los extremos 3' o 5' de una secuencia de ácido nucleico descrito en la presente memoria, también se pueden usar en procedimientos de paseo cromosómico para identificar clones que contienen secuencias adicionales, p. ej., genómicas. Dichos métodos permiten el aislamiento de genes que codifican proteínas adicionales de interés de un organismo hospedante.

En un ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos descritas en la presente memoria se usan como sondas para identificar y aislar ácidos nucleicos relacionados. En algunos casos, los ácidos nucleicos relacionados así identificados pueden ser ADNc o ADN genómico de organismos distintos del que se aisló primero el ácido nucleico. En dichos procedimientos, una muestra de ácido nucleico se pone en contacto con la sonda en condiciones que permiten que la sonda hibride específicamente con secuencias relacionadas. La hibridación de la sonda con los ácidos nucleicos del organismo relacionado se detecta entonces usando cualquiera de los métodos descritos antes.

En las reacciones de hibridación de ácidos nucleicos, las condiciones usadas para lograr un nivel particular de restricción variarán, dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se van a hibridar. Por ejemplo, la longitud, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (p. ej., contenido de GC frente a AT) y tipo de ácido nucleico (p. ej. ARN frente a ADN) de las regiones de hibridación de los ácidos nucleicos se pueden considerar en la selección de las condiciones de hibridación. En casos alternativos, se inmoviliza un ácido nucleico, por ejemplo, sobre un filtro. La hibridación se puede llevar a cabo en condiciones de restricción baja, restricción moderada o restricción alta. Como un ejemplo de hibridación de ácido nucleico, primero se prehibrida una membrana de polímero que contiene ácidos nucleicos desnaturalizados inmovilizados durante 30 minutos a 45°C en una solución que consiste en NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0, Na₂EDTA 5,0 mM, SDS al 0,5%, 10X solución de Denhardt, y ácido polirriboadenílico 0,5 mg/ml. Se pueden añadir aproximadamente 2×10^7 cpm (actividad específica de 4 a 9×10^8 cpm/ug) de sonda de oligonucleótido marcada en el extremo con ³²P a la solución. En casos alternativos, después de aproximadamente 12 a 16 horas de incubación, la membrana se lava durante 30 minutos a temperatura ambiente (T.a.) en 1X SET (NaCl 150 mM, hidrócloruro de Tris 20 mM, pH 7,8, Na₂EDTA 1 mM) que contiene SDS al 0,5%, seguido de un lavado 30 minutos en 1X SET de nueva aportación a T_m-10°C para la sonda de oligonucleótido. La membrana se puede exponer a película autorradiográfica para la detección de señales de hibridación.

Variando la restricción de las condiciones de hibridación usadas para identificar ácidos nucleicos, tales como ADNc o ADN genómicos, que hibridan con la sonda detectable, se pueden identificar y aislar ácidos nucleicos que tienen diferentes niveles de homología con la sonda. La restricción se puede variar llevando a cabo la hibridación a diferentes temperaturas por debajo de las temperaturas de fusión de las sondas. La temperatura de fusión, T_m, es la temperatura (a una fuerza iónica y pH definidos) a la que 50% de la secuencia objetivo hibrida con una sonda perfectamente complementaria. Se seleccionan condiciones muy restrictivas para que sean iguales a o aproximadamente 5°C inferiores a la T_m para una sonda particular. La temperatura de fusión de la sonda se puede calcular usando las siguientes fórmulas de ejemplo. Para sondas entre 14 y 70 nucleótidos de longitud la temperatura de fusión (T_m) se calcula usando la fórmula: $T_m = 81,5 + 16,6(\log [Na^+]) + 0,41(\text{fracción de G+C}) - (600/N)$ donde N es la longitud de la sonda. Si la hibridación se lleva a cabo en una solución que contiene formamida, la temperatura de fusión se puede calcular usando la ecuación: $T_m = 81,5 + 16,6(\log [Na^+]) + 0,41(\text{fracción de G+C}) - (600/N)$ (formamida al 0,63%) - (600/N) donde N es la longitud de la sonda. La prehibridación se puede llevar a cabo en 6X SSC, 5X reactivo de Denhardt, SDS al 0,5%, ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado 100 µg/ml o 6X SSC, 5X reactivo de Denhardt, SDS al 0,5%, ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado 100 µg/ml, formamida al 50%. Las fórmulas para SSC y solución de Denhardt y otras soluciones se citan, p. ej., en Sambrook.

La hibridación se lleva a cabo añadiendo la sonda detectable a las soluciones de prehibridación citadas antes. Cuando la sonda comprende ADN bicatenario, se desnaturaliza antes de la adición a la solución de hibridación. El filtro se pone en contacto con la solución de hibridación durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que la sonda hibrida con ADNc o ADN genómicos que contienen secuencias complementarias a la misma u homólogas a la misma. Para sondas de más de 200 nucleótidos de longitud, la hibridación se puede llevar a cabo a 15-25°C por debajo de la T_m. Para sondas más cortas, tales como sondas de oligonucleótidos, la hibridación se puede llevar a cabo a 5-10°C por debajo de la T_m. En un caso, las hibridaciones en 6X SSC se llevan a cabo a aproximadamente 68°C. En un caso, las hibridaciones en soluciones que contienen formamida al 50% se llevan a cabo a aproximadamente 42°C. Todas las hibridaciones anteriores se considerarían que están en condiciones de restricción alta.

Después de hibridación, el filtro se lava para eliminar cualquier sonda detectable unida de forma no específica. La restricción usada para lavar los filtros también se puede variar dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se estén hibridando, la longitud de los ácidos nucleicos que se estén hibridando, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (p. ej., contenido de GC frente a AT), y tipo de ácido nucleico (p. ej., ARN frente a ADN). Los ejemplos de lavados en condiciones de restricción progresivamente mayores, que se pueden usar para la práctica de los métodos descritos en la presente memoria son: 2X SSC, SDS al 0,1% a temperatura ambiente durante 15 minutos (restricción baja); 0,1X SSC, SDS al 0,5% a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1 hora (restricción moderada); 0,1X SSC, SDS al 0,5% durante 15 a 30 minutos a entre la temperatura de hibridación y 68°C (restricción alta); y NaCl 0,15 M durante 15 minutos a 72°C (restricción muy alta). Se puede llevar a cabo un lavado de restricción baja en 0,1X SSC a temperatura ambiente. Los ejemplos anteriores son simplemente ilustrativos de un conjunto de condiciones que se pueden usar para la práctica de los métodos, p. ej., lavar filtros o matrices. Un experto en la técnica sabrá que hay numerosas recetas para diferentes lavados de restricción, todos los cuales se pueden usar en la práctica de los métodos descritos en la presente memoria.

Los ácidos nucleicos que han hibridado con la sonda se pueden identificar por autorradiografía u otras técnicas convencionales. El procedimiento anterior se puede modificar para identificar ácidos nucleicos que tienen niveles decrecientes de homología con la secuencia de la sonda. Por ejemplo, para obtener ácidos nucleicos de homología decreciente con la sonda detectable, se pueden usar condiciones menos restrictivas. Por ejemplo, la temperatura de hibridación se puede disminuir en incrementos de 5°C de 68°C a 42°C en tampón de hibridación que tiene una concentración de Na⁺ de aproximadamente 1 M. Después de la hibridación, el filtro se puede lavar con 2X SSC, SDS al 0,5% a la temperatura de hibridación. Estas condiciones se considera que son condiciones "moderadas" por encima de 50°C y condiciones "bajas" por debajo de 50°C. Un ejemplo de condiciones de hibridación "moderadas" es cuando la hibridación anterior se lleva a cabo a 55°C. Un ejemplo de condiciones de hibridación de "restricción baja" es cuando la hibridación se lleva a cabo a 45°C.

En casos alternativos, la hibridación se lleva a cabo en tampones, tales como 6X SSC, que contiene formamida a una temperatura de 42°C. En este caso, la concentración de la formamida en el tampón de hibridación se puede reducir en incrementos de 5% desde 50% a 0% para identificar clones que tienen niveles decrecientes de homología con la sonda. Después de hibridación, el filtro se puede lavar con 6X SSC, SDS al 0,5% a 50°C. En casos alternativos, condiciones "moderadas" son por encima de formamida al 25% y condiciones "bajas" son por debajo de formamida al 25%. En casos alternativos, las condiciones de hibridación "moderadas" es cuando la hibridación se lleva a cabo en formamida al 30%. En casos alternativos, las condiciones de hibridación de "restricción baja" son cuando la hibridación anterior se lleva a cabo en formamida al 10%.

Estas sondas y métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para aislar ácidos nucleicos que tienen una secuencia con al menos aproximadamente 99%, al menos 98%, al menos 97%, al menos 96%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55%, o al menos 50% de homología con una secuencia de ácido nucleico descrita en la presente memoria que comprende al menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, o 500 de sus bases consecutivas, y las secuencias complementarias de la misma. La homología se puede medir usando un algoritmo de alineamiento, como se describe en la presente memoria. Por ejemplo, los polinucleótidos homólogos pueden tener una secuencia codificante que es una variante alélica que se encuentra de forma natural de una de las secuencias descritas en la presente memoria. Dichas variantes alélicas pueden tener una sustitución, eliminación o adición de uno o más nucleótidos cuando se compara con los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria.

Además, las sondas y métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para aislar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que tiene al menos aproximadamente 99%, al menos 95%, al menos 90%, al menos 85%, al menos 80%, al menos 75%, al menos 70%, al menos 65%, al menos 60%, al menos 55%, o al menos 50% de identidad de secuencia (homología) con un polipéptido de la invención que comprende al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, o 150 de sus aminoácidos consecutivos determinado usando un algoritmo de alineación de secuencias (p. ej., tal como el algoritmo FASTA versión 3.0t78 con los parámetros por defecto, o un programa BLAST 2.2.2 con los ajustes de ejemplo expuestos en la presente memoria).

Inhibición de la expresión de fosfolipasas

Se proporcionan además en la presente memoria ácidos nucleicos complementarios (p. ej., secuencias de sentido contrario) a los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, p. ej., ácidos nucleicos que codifican fosfolipasas. Las secuencias de sentido contrario son capaces de inhibir el transporte, corte y empalme o transcripción de genes que codifican fosfolipasas. La inhibición se puede llevar a cabo dirigiéndose al ADN genómico o ARN mensajero (ARNm, un transcrito). La transcripción o función del ácido nucleico objetivo se puede inhibir, por ejemplo, por hibridación y/o escisión. Un conjunto particularmente útil de inhibidores proporcionado en la presente memoria incluye oligonucleótidos que son capaces de unirse a genes o mensajeros de fosfolipasa, en cualquiera de los casos previniendo o inhibiendo la producción o función de la enzima fosfolipasa. La asociación puede ser por hibridación específica de secuencia. Otra clase útil de inhibidores incluye oligonucleótidos que producen inactivación o escisión del mensajero de fosfolipasa. El oligonucleótido puede tener actividad enzimática que produce dicha escisión, tal como ribozimas. El oligonucleótido se puede modificar químicamente o conjugar a una enzima o composición capaz de escindir el ácido nucleico complementario. Se pueden cribar de un conjunto de muchos de dichos oligonucleótidos diferentes aquellos con la actividad deseada.

La inhibición de la expresión de fosfolipasa puede tener una variedad de aplicaciones industriales. Por ejemplo, la inhibición de la expresión de fosfolipasa puede ralentizar o prevenir la descomposición. La descomposición se puede producir cuando los lípidos o polipéptidos, p.ej. lípidos estructurales o polipéptidos, son degradados enzimáticamente. Esto puede conducir al deterioro, o pudrición de frutas y verduras. En un aspecto, el uso de composiciones descritas en la presente memoria que inhiben la expresión y/o actividad de fosfolipasa, p. ej., anticuerpos, oligonucleótidos de sentido contrario, ribozimas y ARNi, se usan para ralentizar o prevenir la descomposición. Por lo tanto, se proporcionan en la presente memoria métodos y composiciones que comprenden la aplicación sobre una planta o producto de la planta (p. ej., una fruta, semilla, raíz, hoja, etc.) de anticuerpos, oligonucleótidos de sentido contrario, ribozimas y ARNi, para ralentizar o prevenir la descomposición. Estas composiciones también se pueden expresar en la planta (p. ej., una planta transgénica) u otro organismo (p. ej., una bacteria u otro microorganismo transformado con un gen de fosfolipasa descrito en la presente memoria).

Las composiciones para inhibir la expresión de fosfolipasa (p. ej., de sentido contrario, ARNi, ribozimas, anticuerpos) se pueden usar como composiciones farmacéuticas.

Oligonucleótidos de sentido contrario

Se describen en la presente memoria oligonucleótidos de sentido contrario capaces de unirse a mensajero de fosfolipasa que pueden inhibir la actividad de fosfolipasa dirigiéndose al ARNm. Las estrategias para diseñar oligonucleótidos de sentido contrario están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes, y el experto en la técnica puede diseñar dichos oligonucleótidos de fosfolipasa usando los nuevos reactivos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los protocolos de paseo génico/cartografía de ARN para cribar oligonucleótidos de sentido contrario eficaces son bien conocidos en la técnica, véase, p. ej., Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183, que describe un ensayo de cartografiado de ARN, que se basa en técnicas moleculares estándar para proporcionar un método sencillo y fiable para la selección potente de secuencias de sentido contrario. Véase también, Smith (2000) *Eur. J. Pharm. Sci.* 11:191-198.

Los ácidos nucleicos que se encuentran de forma natural se usan como oligonucleótidos de sentido contrario. Los oligonucleótidos de sentido contrario pueden ser de cualquier longitud; por ejemplo, en casos alternativos, los oligonucleótidos de sentido contrario tienen entre aproximadamente 5 a 100, aproximadamente 10 a 80, aproximadamente 15 a 60, aproximadamente 18 a 40. La longitud óptima se puede determinar por cribado rutinario. Los oligonucleótidos de sentido contrario se pueden determinar por cribado rutinario. Los oligonucleótidos de sentido contrario pueden estar presentes en cualquier concentración. La concentración óptima se puede determinar por cribado rutinario. Se conoce una amplia variedad de análogos de nucleótidos y ácidos nucleicos sintéticos, no naturales que pueden abordar este potencial problema. Por ejemplo, se pueden usar ácidos nucleicos peptídicos (PNA) que contienen cadenas principales no iónicas, tales como unidades de N-(2-aminoetil)glicina. Los oligonucleótidos de sentido contrario que tienen enlaces fosforotioato también se pueden usar, como se describe en los documentos WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol Appl. Pharmacol.* 144:189-197; *Antisense Therapeutics*, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996). Los oligonucleótidos de sentido contrario que tienen análogos de cadena principal de ADN sintéticos también pueden incluir ácidos nucleicos fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, alquil-fosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetil, metileno(metilimino), 3'-N-carbamato, y morfolino carbamato, como se ha descrito antes.

Se puede usar metodología de química combinatoria para crear un gran número de oligonucleótidos de los que se pueden cribar rápidamente los oligonucleótidos específicos que tienen afinidades de unión y especificidades adecuadas hacia cualquier objetivo, tal como las secuencias de fosfolipasa homosenido y de sentido contrario (véase, p. ej., Gold (1995) *J. of Biol. Chem.* 270:13581-13584).

Ribozimas inhibidoras

Se describen en la presente memoria ribozimas capaces de unirse al mensajero de fosfolipasa que pueden inhibir la actividad de la enzima fosfolipasa dirigiéndose al ARNm. Las estrategias para diseñar ribozimas y seleccionar la secuencia de de sentido contrario específica de fosfolipasa están bien descritas en la bibliografía científica y de

patentes, y el experto en la técnica puede diseñar dichos ribozimas usando los nuevos reactivos descritos en la presente memoria. Los ribozimas actúan uniéndose al ARN objetivo por la parte de unión al ARN objetivo de un ribozima que se mantiene muy cerca de una parte enzimática del ARN que escinde el ARN objetivo. Por lo tanto, el ribozima reconoce y se une al ARN objetivo por emparejamiento de bases complementarias, y una vez unido en el sitio correcto, actúa enzimáticamente para escindir e inactivar el ARN objetivo. La escisión de un ARN objetivo de dicha forma destruirá su capacidad para dirigir la síntesis de una proteína codificada si la escisión se produce en la secuencia codificante. Después de que un ribozima se haya unido y escindido su ARN objetivo, típicamente es liberado de ese ARN y por lo tanto puede unirse y escindir nuevos objetivos repetidamente.

En algunas circunstancias, la naturaleza enzimática de un ribozima puede ser ventajosa frente a otras tecnologías, tal como la tecnología antisentido (donde una molécula de ácido nucleico simplemente se une a un ácido nucleico objetivo para bloquear su transcripción, traducción o asociación con otra molécula), ya que la concentración eficaz de ribozima necesaria para realizar un tratamiento terapéutico puede ser menor que la de un oligonucleótido de sentido contrario. Esta potencial ventaja refleja la capacidad del ribozima de actuar enzimáticamente. Por lo tanto, una sola molécula de ribozima es capaz de escindir muchas moléculas de ARN objetivo. Además, un ribozima típicamente es un inhibidor muy específico, con la especificidad de la inhibición que depende no solo del mecanismo de emparejamiento de bases de la unión, sino también del mecanismo por el cual la molécula inhibe la expresión del ARN al que se une. Es decir, la inhibición es causada por la escisión del ARN objetivo y por lo tanto la especificidad está definida como la relación de la tasa de escisión del ARN objetivo frente a la tasa de escisión del ARN no objetivo. Este mecanismo de escisión depende de factores adicionales a los implicados en el emparejamiento de bases. Por lo tanto, la especificidad de la acción de un ribozima puede ser mayor que la de la unión del oligonucleótido de sentido contrario que se une al mismo sitio de ARN.

La molécula de ARN de ribozima enzimático se puede formar en un motivo de cabeza de martillo, pero también se puede formar en el motivo de una horquilla, virus delta de la hepatitis, intrón de grupo I o ARN de tipo RNasaP (asociado con una secuencia guía de ARN). Los ejemplos de dichos motivos de cabeza de martillo los describen Rossi (1992) *Aids Research and Human Retroviruses* 8:183; los motivos en horquilla Hampel (1989) *Biochemistry* 28:4929, y Hampel (1990) *Nuc. Acids Res.* 18:299; el motivo del virus delta de la hepatitis Perrotta (1992) *Biochemistry* 31:16; el motivo de RNasaP Guerrier-Takada (1983) *Cell* 35:849; y el intrón de grupo I Cech patente de EE.UU. nº 4.987.071. La cita de estos motivos específicos no se pretende que sea limitante; los expertos en la técnica reconocerán que una molécula de ARN enzimática tiene un sitio de unión del sustrato específico complementario a una o más de las regiones de ARN del gen objetivo, y tiene secuencia de nucleótidos dentro o rodeando ese sitio de unión del sustrato que imparte una actividad de escisión de ARN a la molécula.

ARN de interferencia (ARNi)

Se describe en la presente memoria una molécula inhibidora de ARN, una llamada molécula de "ARNi", que comprende una secuencia de fosfolipasa descrita en la presente memoria. La molécula de ARNi comprende una molécula de ARN bicatenaria (ARNbc). El ARNi puede inhibir la expresión de un gen de fosfolipasa. En un caso, el ARNi tiene aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o más nucleótidos en dúplex de longitud. El ARNi puede entrar en una célula y causar la degradación de un ARN monocatenario (ARNmc) de secuencias similares o idénticas, incluyendo ARNm endógenos. Cuando una célula se expone al ARN bicatenario (ARNbc), el ARNm del gen homólogo se degrada selectivamente por un procedimiento llamado interferencia de ARN (ARNi). Un posible mecanismo detrás del ARNi es la rotura de un ARN bicatenario (ARNbc) por correspondencia de una secuencia de gen específico en trozos cortos llamados ARN de interferencia corto, que produce la degradación del ARNm que se corresponde con su secuencia. El ARNi se puede usar en productos terapéuticos de silenciamiento de genes, véase, p. ej., Shuey (2002) *Drug Discov. Today* 7:1040-1046. Se describen en la presente memoria métodos para degradar el ARN selectivamente usando ARNi descrito en la presente memoria. El procedimiento se puede poner en práctica in vitro, ex vivo o in vivo. En un caso, las moléculas de ARNi se pueden usar para generar una mutación de pérdida de función en una célula, un órgano o un animal. Los métodos para hacer y usar moléculas de ARNi para degradar el ARN selectivamente son conocidas en la técnica, véase, p. ej., las patentes de EE.UU. nº 6.506.559; 6.511.824; 6.515.109; 6.489.127.

Modificación de ácidos nucleicos

Se describen en la presente memoria métodos de generación de variantes de ácidos nucleicos, p. ej., los que codifican una enzima fosfolipasa. También se describen en la presente memoria métodos para modificar una enzima de la invención, p. ej., por mutación de su secuencia codificante por métodos aleatorios o estocásticos, o no estocásticos, o de "evolución dirigida", tal como la Gene Site Saturation Mutagenesis™ (GSSM), para alterar el intervalo de pH de actividad de enzimas o el intervalo de actividad óptima, intervalo de temperatura de actividad o intervalo de actividad óptima, especificidad, actividad (cinética); el uso de enzima de glucosilación, fosforilación o metales (p. ej., Ca, Mg, Zn, Fe, Na), p. ej., para impactar en el pH/temperatura de estabilidad. Se describen en la presente memoria métodos para modificar una enzima de la invención, p. ej., por mutación de su secuencia codificante, p. ej., por GSSM, para aumentar su resistencia a la actividad de proteasa. Se describen en la presente memoria métodos para modificar una enzima de la invención, p. ej., por mutación de su secuencia codificante, p. ej., por GSSM, para modificar el uso de la enzima de queladores de metales específicos para Ca, Mg, Na que no quelarían el Zn. Se describen en la presente memoria métodos para modificar una enzima de la invención, p. ej., por

mutación de su secuencia codificante, p. ej., por GSSM, que tendría una combinación deseada de actividades, p. ej., PI, PA y PLC específica PC/PE.

En un caso, la "mutagénesis por saturación de sitio génico" (GSSM) o "GSSM" comprende un método que usa cebadores oligonucleótidos degenerados para introducir mutaciones puntuales en un polinucleótido, como se describe en detalle más adelante. En algunos casos, el "sistema de evolución dirigido optimizado" o la "evolución dirigida optimizada" comprende un método de reensamblado de fragmentos o secuencias de ácidos nucleicos relacionadas, p. ej., genes relacionados, y se explica con detalle más adelante. En un caso, el "reensamblado por ligado sintético" o "SLR" comprende un método de ligado de fragmentos de oligonucleótidos en una forma no estocástica, y se explica con detalle más adelante.

En realizaciones alternativas, la invención proporciona "variantes" de ácidos nucleicos y polipéptidos de ejemplo que incluyen la SEQ ID NO: 8, codificada p. ej., por la SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. En realizaciones alternativas las variantes de polinucleótidos o polipéptidos de la invención son ácidos nucleicos o polipéptidos que se han modificado en uno o más pares de bases, codones, intrones, exones o restos de aminoácidos (respectivamente) aunque todavía retienen la actividad biológica de una fosfolipasa. Las variantes se pueden producir por una serie de medios que incluyen métodos tales como, PCR propensa a error, barajado, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblado, mutagénesis por PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis en casete, mutagénesis de conjunto recursivo, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica de sitio, reensamblaje de genes, GSSM y cualquiera de sus combinaciones. Se incluyen en la presente memoria técnicas para producir fosfolipasas variantes que tienen actividad a un pH o temperatura, por ejemplo que es diferente de una fosfolipasa de tipo natural.

Estos métodos se pueden repetir o usar en diferentes combinaciones para generar enzimas fosfolipasa que tienen una actividad alterada o diferente o una estabilidad alterada o diferente de la de una fosfolipasa codificada por el ácido nucleico molde. Estos métodos también se pueden repetir o usar en diferentes combinaciones, p. ej., para generar variaciones en la expresión del gen/mensajero, traducción del mensajero o estabilidad del mensajero. En otro caso, se altera la composición genética de una célula, p. ej., por modificación de un gen homólogo ex vivo, seguido de su reinserción en la célula.

Un ácido nucleico descrito en la presente memoria se puede alterar por cualquier medio. Por ejemplo, métodos aleatorios o estocásticos, o métodos no estocásticos o de "evolución dirigida".

Los métodos de mutación aleatoria de genes son bien conocidos en la técnica, p. ej., patente de EE.UU. n° 5.830.696. Por ejemplo, se pueden usar mutágenos para la mutación aleatoria de un gen. Los mutágenos incluyen, p. ej., luz ultravioleta o radiación gamma, o mutágenos químicos, p. ej., mitomicina, ácido nitroso, psoralenos fotoactivados, solos o en combinación, para inducir roturas de ADN que se pueden llevar a reparación por recombinación. Otros mutágenos químicos incluyen, por ejemplo, bisulfito sódico, ácido nitroso, hidroxilamina, hidrazina o ácido fórmico. Otros mutágenos son análogos de precursores de nucleótidos, p. ej., nitrosoguanidina, 5-bromouracilo, 2-aminopurina o acridina. Estos agentes se pueden añadir a una reacción de PCR en lugar del precursor de nucleótido mutando así la secuencia. También se pueden usar agentes intercalantes tales como proflavina, acriflavina, quinacrina y similares.

Se puede usar cualquier técnica en biología molecular, p. ej., mutagénesis por PCR aleatoria, véase, p. ej., Rice (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5467-5471; o, mutagénesis de casete múltiple combinatoria, véase, p. ej., Crameri (1995) *Biotechniques* 18:194-196. Alternativamente, los ácidos nucleicos, p. ej., genes, se pueden reensamblar después de fragmentación aleatoria o "estocástica", véase, p. ej., patentes de EE.UU. n° 6.291.242; 6.287.862; 6.287.861; 5.955.358; 5.830.721; 5.824.514; 5.811.238; 5.605.793. En casos alternativos, se introducen modificaciones, adiciones o eliminaciones por PCR propensa a error, barajado, mutagénesis dirigida por oligonucleótidos, PCR de ensamblado, mutagénesis por PCR sexual, mutagénesis in vivo, mutagénesis en casete, mutagénesis de conjunto recursivo, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica de sitio, reensamblaje de genes, mutagénesis por saturación de sitio de gen (GSSM), reensamblaje por ligado sintético (SLR), recombinación, recombinación de secuencias recursivas, mutagénesis de ADN modificado por fosfotoato, mutagénesis de molde que contiene uracilo, mutagénesis de dúplex con huecos, mutagénesis por reparación de errores puntuales, mutagénesis por cepa de hospedante deficiente en reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis por eliminación, mutagénesis por selección de restricción, mutagénesis por purificación de restricción, síntesis artificial de genes, mutagénesis de conjunto, creación de múltiplo de ácido nucleico quimérico y/o una combinación de estos y otros métodos.

Las siguientes publicaciones describen una variedad de procedimientos y/o métodos de recombinación recursiva que se pueden incorporar en los métodos descritos en la presente memoria: Stemmer (1999) "Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties" *Tumor Targeting* 4:1-4; Ness (1999) *Nature Biotechnology* 17:893-896; Chang (1999) "Evolution of a cytokine using DNA family shuffling" *Nature Biotechnology* 17:793-797; Minshull (1999) "Protein evolution by molecular breeding" *Current Opinion in Chemical Biology* 3:284-290; Christians (1999) "Directed evolution of thymidine kinase for AZT fosforylation using DNA family shuffling" *Nature Biotechnology* 17:259-264; Crameri (1998) "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution" *Nature* 391:288-291; Crameri (1997) "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling,"

Nature Biotechnology 15:436-438; Zhang (1997) "Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:4504-4509; Patten et al. (1997) "Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines" *Current Opinion in Biotechnology* 8:724-733; Crameri et al. (1996) "Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling" *Nature Medicine* 2:100-103; Crameri et al. (1996) "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling" *Nature Biotechnology* 14:315-319; Gates et al. (1996) "Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor 'headpiece dimer'" *Journal of Molecular Biology* 255:373-386; Stemmer (1996) "Sexual PCR and Assembly PCR" En: *The Encyclopedia of Molecular Biology*. VCH Publishers, New York. pp.447-457; Crameri y Stemmer (1995) "Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes" *BioTechniques* 18:194-195; Stemmer et al. (1995) "Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides" *Gene*, 164:49-53; Stemmer (1995) "The Evolution of Molecular Computation" *Science* 270: 1510; Stemmer (1995) "Searching Sequence Space" *Bio/Technology* 13:549-553; Stemmer (1994) "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling" *Nature* 370:389-391; y Stemmer (1994) "DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751.

Los métodos de mutación de generación de diversidad incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio (Ling et al. (1997) "Approaches to DNA mutagenesis: an overview" *Anal Biochem.* 254(2): 157-178; Dale et al. (1996) "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method" *Methods Mol. Biol.* 57:369-374; Smith (1985) "In vitro mutagenesis" *Ann. Rev. Genet.* 19:423-462; Botstein y Shortle (1985) "Strategies and applications of in vitro mutagenesis" *Science* 229:1193-1201; Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" *Biochem. J.* 237:1-7; and Kunkel (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" en *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. and Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlin)); mutagénesis usando moldes que contienen uracilo (Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Methods in Enzymol.* 154, 367-382; y Bass et al. (1988) "Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities" *Science* 242:240-245); mutagénesis dirigida por oligonucleótido (*Methods in Enzymol.* 100: 468-500 (1983); *Methods in Enzymol.* 154: 329-350 (1987); Zoller y Smith (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment" *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500; Zoller y Smith (1983) "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 100:468-500; y Zoller y Smith (1987) "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template" *Methods in Enzymol.* 154:329-350); mutagénesis de ADN modificado por fosforotioato (Taylor et al. (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764; Taylor et al. (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698; Sayers et al. (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 16:791-802; y Sayers et al. (1988) "Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide" *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814); mutagénesis usando ADN dúplex con huecos (Kramer et al. (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456; Kramer y Fritz (1987) *Methods in Enzymol.* "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA" 154:350-367; Kramer et al. (1988) "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations" *Nucl. Acids Res.* 16: 7207; y Fritz et al. (1988) "Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro" *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999).

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

Volumen 154, que también describe controles útiles para problemas de corrección de errores con carios métodos de mutagénesis.

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

Algunas solicitudes de EE.UU. proporcionan detalles adicionales relacionados con diferentes métodos de generación de diversidad, que incluyen "SHUFFLING OF CODON ALTERED GENES" de Patten et al. presentada el 28 de Sep., 1999, (EE.UU. Nº Ser. 09/407.800); "EVOLUTION OF WHOLE CELLS AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION" de del Cardayre et al., presentada el 15 de Jul., 1998 (EE.UU. Nº Ser. 09/166.188), y 15 de Jul., 1999 (EE.UU. Nº Ser. 09/354.922); "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" de Cramer et al., presentada el 28 de Sep., 1999 (EE.UU. Nº Ser. 09/408.392), y "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" de Cramer et al., presentada el 18 de enero, 2000 (PCT/US00/01203); "USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING" de Welch et al., presentada el 28 de Sep., 1999 (EE.UU. Nº Ser. 09/408.393); "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" de Selifonov et al., presentada el 18 de enero, 2000, (PCT/US00/01202) y, p. ej. "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" de Selifonov et al., presentada el 18 de Jul., 2000 (EE.UU. Nº Ser. 09/618.579); "METHODS OF POPULATING DATA STRUCTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS" de Selifonov y Stemmer, presentada el 18 de enero, 2000 (PCT/US00/01138); y "SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION" de Affholter, presentada el 6 de Sep., 2000 (EE.UU. Nº Ser. 09/656.549).

Los métodos no estocásticos o de "evolución dirigida" incluyen, p. ej., mutagénesis por saturación (p. ej., GSSM), reensamblado por ligado sintético (SLR) o una de sus combinaciones, que se usan para modificar los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria para generar fosfolipasas con propiedades nuevas o alteradas (p. ej., actividad en condiciones muy ácidas o alcalinas, temperatura alta, y similares). Los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos modificados se pueden cribar de acuerdo con su actividad antes de ensayar la actividad de fosfolipasa u otra actividad. Se puede usar cualquier modalidad de ensayo o protocolo, p. ej., usando una plataforma de matrices de capilares. Véase, p. ej., patentes de EE.UU. nº 6.280.926; 5.939.250.

Mutagénesis por saturación o GSSM

La modificación de genes no estocástica, un procedimiento de "evolución dirigida" se puede usar para generar fosfolipasas con propiedades nuevas o alteradas. Las variaciones de este método se han denominado "mutagénesis de sitio génico", "mutagénesis por saturación de sitio", "mutagénesis por saturación de sitio génico" o simplemente "GSSM". Se puede usar en combinación con otros procedimientos de mutagenización. Véase, p. ej., patentes de EE.UU. nº 6.171.820; 6.238.884. En un aspecto, la GSSM comprende proporcionar un polinucleótido molde y una pluralidad de oligonucleótidos, en donde cada oligonucleótido comprende una secuencia homóloga con el polinucleótido molde, de modo que se dirige a una secuencia específica del polinucleótido molde, y una secuencia que es una variante del gen homólogo; generando polinucleótidos progenie que comprenden variaciones de secuencia no estocásticas por replicación del polinucleótido molde con los oligonucleótidos, generando así polinucleótidos que comprenden variaciones de secuencias de genes homólogos.

En un caso, se usan cebadores de codones que contienen una secuencia degenerada N,N,G/T para introducir mutaciones puntuales en un polinucleótido, de modo que se genere un conjunto de polinucleótidos progenie en el que está representada una variedad completa de sustituciones de aminoácidos individuales en cada posición de aminoácido, p. ej., un resto de aminoácido en un sitio activo de enzima o sitio de unión de ligado es objetivo para ser modificado. Estos oligonucleótidos pueden comprender una primera secuencia homóloga contigua, una secuencia degenerada N,N,G/T, y opcionalmente una segunda secuencia homóloga. Los productos de traducción de progenie en la dirección 3' a partir del uso de dichos oligonucleótidos incluyen todos los posibles cambios de aminoácidos en cada sitio de aminoácido a lo largo del polipéptido, porque la degeneración de la secuencia N,N,G/T, incluye codones para los 20 aminoácidos. En un caso, uno de dichos oligonucleótidos degenerado (compuesto de, p. ej., un casete N,N,G/T degenerado) se usa para someter a cada codón original en un molde de polinucleótido original a una variedad completa de sustitución de codones. En otro caso, se usan al menos dos casetes degenerados, sea en el mismo oligonucleótido o no, para someter al menos dos codones originales en un molde de polinucleótido original a una variedad completa de sustitución de codones. Por ejemplo, un oligonucleótido puede contener más de una secuencia N,N,G/T, para introducir mutaciones de aminoácidos en más de un sitio. Esta pluralidad de secuencias N,N,G/T pueden estar directamente contiguas, o separadas por una o más secuencias de nucleótidos adicionales. En otro caso, oligonucleótidos que se pueden usar para introducir adiciones y eliminaciones se pueden usar solos o en combinación con los codones que contienen una secuencia N,N,G/T, para introducir cualquier combinación o permutación de adiciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos.

En un caso, la mutagénesis simultánea de dos o más posiciones de aminoácidos contiguas se hace usando un oligonucleótido que contiene tripletes N,N,G/T contiguos, es decir, una secuencia degenerada (N,N,G/T)_n. En otro caso, se usan casetes degenerados que tienen menos degeneración que la secuencia N,N,G/T. Por ejemplo, puede ser conveniente en algunos casos usar (p. ej., en un oligonucleótido) una secuencia triplete degenerada compuesta de un solo N, donde dicho N puede estar en la primera, segunda o tercera posición del triplete. Se pueden usar cualesquiera otras bases incluyendo cualesquiera combinaciones y permutaciones de las mismas en las dos posiciones restantes del triplete. Alternativamente, puede ser conveniente en algunos casos usar (p. ej., en un oligo) una secuencia triplete N,N,N degenerada.

En un caso, el uso de tripletes degenerados (p. ej., N,N,G/T) permite la generación sistemática y fácil de una amplia variedad de posibles aminoácidos naturales (para un total de 20 aminoácidos) en todas y cada una de las posiciones de aminoácidos en un polipéptido (en casos alternativos, los métodos también incluyen la generación de menos de todas las posibles sustituciones por resto de aminoácido, o codón, posición). Por ejemplo, para un polipéptido de 100 aminoácidos, se pueden generar 2000 especies distintas (es decir, 20 posibles aminoácidos por posición X 100 posiciones de aminoácidos). Mediante el uso de un oligonucleótido o conjunto de oligonucleótidos que contienen una triplete N,N,G/T degenerado, 32 secuencias individuales pueden codificar los 20 posibles aminoácidos naturales. Por lo tanto, en un recipiente de reacción en el que una secuencia de polinucleótido original se somete a mutagénesis por saturación usando al menos uno de dichos oligonucleótidos, se generar 32 polinucleótidos progenie distintos que codifican 20 polipéptidos distintos. En cambio, el uso de un oligonucleótido no degenerado en la mutagénesis dirigida al sitio conduce solo a un producto polipéptido progenie por recipiente de reacción. Los oligonucleótidos no degenerados se pueden usar opcionalmente en combinación con cebadores degenerados descritos; por ejemplo, se pueden usar oligonucleótidos no degenerados para generar mutaciones puntuales específicas en un polinucleótido de trabajo. Esto proporciona un medio para generar mutaciones puntuales silenciosas específicas, mutaciones puntuales que conducen a cambios de aminoácidos correspondientes y a mutaciones puntuales que causan la generación de codones de parada y la correspondiente expresión de fragmentos de polipéptidos.

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

En un caso, tras la mutagenización todas y cada una de las posiciones de aminoácidos en un polipéptido original usando mutagénesis por saturación como se describe en la presente memoria, se pueden identificar cambios de aminoácidos favorables en una o más posiciones de aminoácidos. Se pueden generar una o más moléculas progenie nuevas que contienen una combinación de todas o parte de estas sustituciones de aminoácidos favorables. Por ejemplo, si se identifican 2 cambios de aminoácidos favorables específicos en cada 3 posiciones de aminoácidos en un polipéptido, las permutaciones incluyen 3 posibilidades en cada posición (sin cambio del aminoácido original, y cada uno de los dos cambios favorables) y 3 posiciones. Por lo tanto, hay 3 x 3 x 3 o 27 posibilidades totales, incluyen 7 que se han examinado previamente, 6 mutaciones puntuales individuales (es decir, 2 en cada una de las tres posiciones) y sin cambio en ninguna posición.

En otro caso, se puede usar la mutagénesis por saturación en el sitio junto con otro medio estocástico o no estocástico para variar la secuencia, p. ej., reensamblado por ligado sintético (véase más adelante), barajado, quimerización, recombinación y otros procedimientos de mutagenia y agentes de mutagenia. El método proporciona el uso de cualquier procedimiento(s) de mutagenia, incluyendo la mutagénesis por saturación, de una forma iterativa.

5 Reensamblado por ligado sintético (SLR)

Se describe en la presente memoria un sistema de modificación de genes no estocástico denominado "reensamblado por ligado sintético" o simplemente "SLR", un "procedimiento de evolución dirigida", para generar fosfolipasas con propiedades nuevas o alteradas. El SLR es un método de ligado de fragmentos de oligonucleótidos juntos de forma no estocástica. Este método difiere del barajado de oligonucleótidos estocástico en que los bloques
10 estructurales de ácido nucleico no están barajados, concatenados o quimerizados aleatoriamente, sino que se ensamblan de forma no estocástica. Véase, p. ej., solicitud de patente de EE.UU. serie nº (USSN) 09/332.835 titulada "Synthetic Ligation Reassembly in Directed Evolution" y presentada el 14 de junio, 1999 ("USSN 09/332.835"). En un caso, la SLR comprende las siguientes etapas: (a) proporcionar un polinucleótido molde, en donde el polinucleótido molde comprende la secuencia que codifica un gen homólogo; (b) proporcionar una
15 pluralidad de polinucleótidos unidades estructurales, en donde los polinucleótidos unidades estructurales están diseñados para el reensamblaje cruzado con el polinucleótido molde en una secuencia predeterminada, y un polinucleótido unidad estructural comprende una secuencia que es una variante del gen homólogo y una secuencia homóloga al polinucleótido molde que flanquea la secuencia variante; (c) combinar un polinucleótido unidad estructural con un polinucleótido molde de modo que el polinucleótido unidad estructural se reensamble de forma
20 cruzada con el polinucleótido molde para generar polinucleótidos que comprenden variaciones de secuencia de genes homólogos.

El SLR no depende de la presencia de niveles altos de homología entre polinucleótidos que se van a reorganizar. Por lo tanto, este método se puede usar para generar de forma no estocástica bibliotecas (o conjuntos) de moléculas progenie compuestas de más de 10^{100} quimeras diferentes. El SLR se puede usar para generar bibliotecas
25 compuestas de más de 10^{1000} quimeras progenie diferentes. Por lo tanto, el caso del presente método incluye métodos no estocásticos de producción de un conjunto de moléculas de ácido nucleico quiméricas finalizadas que tienen un orden de ensamblado general que se eligen por diseño. Este método incluye las etapas de generar por diseño, una pluralidad de unidades estructurales de ácidos nucleicos específicos que tienen extremos que se pueden ligar mutuamente compatibles que se pueden usar, y ensamblar estas unidades estructurales de ácidos
30 nucleicos, de modo que se logra un orden de ensamblado general diseñado.

Los extremos que se pueden ligar mutuamente compatibles de las unidades estructurales de ácidos nucleicos que se van a ensamblar se considera que "se pueden usar" para este tipo de ensamblado ordenado si permiten que las unidades estructurales se acoplen en órdenes predeterminados. Por lo tanto, el orden de ensamblado general en el que las unidades estructurales de ácidos nucleicos se pueden acoplar está especificado por el diseño de los
35 extremos que se pueden ligar. Si se va a usar más de una etapa de ensamblado, entonces el orden de ensamblado general en el que se pueden acoplar las unidades estructurales de ácidos nucleicos también está especificado por el orden secuencial de la etapa(s) de ensamblado. En un caso, las piezas estructurales asociadas se tratan con una enzima, tal como una ligasa (p. ej., ADN ligasa de T4), para lograr la unión covalente de las piezas estructurales.

En un caso, el diseño de las unidades estructurales de oligonucleótidos se obtiene analizando un conjunto de
40 moldes de secuencias de ácidos nucleicos progenitores que sirven como base para producir un conjunto de progenie de polinucleótidos quiméricos finalizados. Estos moldes de oligonucleótidos originales sirven por lo tanto como fuente de información de secuencia que ayudan en el diseño de unidades estructurales de ácidos nucleicos que se van a mutagenizar, p. ej., quimerizar o barajar.

En un aspecto de este método, las secuencias de una pluralidad de moldes de ácidos nucleicos originales se alinean con el fin de seleccionar uno o más puntos de demarcación. Los puntos de demarcación pueden estar situados en una zona de homología y están compuestos de uno o más nucleótidos. Estos puntos de demarcación preferiblemente son compartidos por al menos dos de los moldes progenitores. Los puntos de demarcación pueden usarse por lo tanto para delinear los límites de las unidades estructurales de oligonucleótidos que se van a generar con el fin de reorganizar los polinucleótidos originales. Los puntos de demarcación identificados y seleccionados en
50 las moléculas progenitoras sirven como potenciales puntos de quimerización en el ensamblado de las moléculas progenie quiméricas finales. Un punto de demarcación puede ser una zona de homología (compuesta de al menos una base nucleótida homóloga) compartida por al menos dos secuencias de polinucleótidos originales. Alternativamente, un punto de demarcación puede ser una zona de homología que es compartida por al menos la mitad de las secuencias de polinucleótidos originales, o puede ser una zona de homología que es compartida por al menos dos tercios de las secuencias de polinucleótidos originales. Incluso más preferiblemente, un punto de
55 demarcación que se puede usar es una zona de homología que es compartida por al menos tres cuartas partes de las secuencias de polinucleótidos originales, o puede ser compartida por casi todas las secuencias de polinucleótidos originales. En un caso, un punto de demarcación es una zona de homología que es compartida por todas las secuencias de polinucleótidos originales.

En un caso, un procedimiento de reensamblado por ligado se lleva a cabo exhaustivamente con el fin de generar una biblioteca exhaustiva de polinucleótidos quiméricos progenie. En otras palabras, están representadas todas las posibles combinaciones ordenadas de unidades estructurales de ácidos nucleicos en el conjunto de moléculas e ácidos nucleicos quiméricos finalizados. Al mismo tiempo, en otro caso, el orden de ensamblado (es decir, el orden de ensamblado de cada unidad estructural en la secuencia de 5' a 3' de cada ácido nucleico quimérico finalizado) en cada combinación se diseña (o no estocástico) como se ha descrito antes. Debido a la naturaleza no estocástica de este método, se reduce mucho la posibilidad de productos secundarios no deseados.

En un aspecto, el método de reensamblado por ligado se lleva a cabo sistemáticamente. Por ejemplo, el método se lleva a cabo con el fin de generar una biblioteca compartimentalizada sistemáticamente de moléculas progenie, con compartimentos que se pueden cribar sistemáticamente, p. ej. uno por uno. En otras palabras, este método proporciona, mediante el uso selectivo y sensato de unidades estructurales de ácidos nucleicos, acoplado con el uso selectivo y sensato de reacciones de ensamblado escalonadas secuencialmente, que se puede lograr un diseño donde se hagan conjuntos específicos de productos progenie en cada uno de varios recipientes de reacción. Esto permite llevar a cabo el análisis sistemático y procedimiento de cribado. Por lo tanto, estos métodos permiten analizar sistemáticamente un número potencialmente muy grande de moléculas progenie en grupos más pequeños. Debido a su capacidad para llevar a cabo quimerizaciones de una forma que es muy flexible, aunque también exhaustiva y sistemática, en particular cuando hay un nivel de homología bajo entre las moléculas progenitoras, estos métodos proporcionan la generación de una biblioteca (o conjunto) compuesto de un gran número de moléculas progenie. Debido a la naturaleza no estocástica del método de reensamblado por ligado presente, las moléculas progenie generadas preferiblemente comprenden una biblioteca de moléculas de ácidos nucleicos quiméricos finalizados que tienen un orden de ensamblado general que se elige por diseño. Los métodos de mutagénesis por saturación y de evolución dirigida optimizada también se pueden usar para generar diferentes especies moleculares progenie. Se aprecia que el método proporciona la libertad de elección y control en relación con la selección de puntos de demarcación, el tamaño y número de unidades estructurales de ácidos nucleicos, y el tamaño y diseño de los acoplamientos. Se aprecia además que el requisito de homología intermolecular es muy relajado para la operabilidad de este método. De hecho, se pueden incluso elegir puntos de demarcación en zonas de poca o sin homología intermolecular. Por ejemplo, debido al balanceo de codones, es decir, la degeneración de codones, se pueden introducir sustituciones de nucleótidos en unidades estructurales de ácidos nucleicos sin alterar el aminoácido codificado originalmente en el molde progenitor correspondiente. Alternativamente, un codón se puede alterar de forma que la codificación de un aminoácido original se altere. Este método proporciona que se pueden introducir dichas sustituciones en la unidad estructural de ácido nucleico con el fin de aumentar la incidencia de los puntos de demarcación homólogos intermolecularmente y por lo tanto para permitir que se logre un mayor número de acoplamientos entre las unidades estructurales, que a su vez permite generar un mayor número de moléculas quiméricas progenie.

En otro aspecto, la naturaleza sintética de la etapa en la que se generan las unidades estructurales permite diseñar e introducir nucleótidos (p. ej., uno o más nucleótidos, que pueden ser, por ejemplo, codones o intrones o secuencias reguladoras) que más tarde opcionalmente se pueden eliminar en un procedimiento *in vitro* (p. ej., mutagénesis) o en un procedimiento *in vivo* (p. ej., usando la capacidad de corte y empalme de genes de un organismo hospedante). Se aprecia que en muchos casos, la introducción de estos nucleótidos también puede ser deseable por muchas otras razones además del beneficio potencial de crear un punto de demarcación que se pueda usar.

En un caso, se usa una unidad estructural de ácido nucleico para introducir un intrón. Por lo tanto, los intrones funcionales se introducen en un gen artificial fabricado de acuerdo con los métodos descritos en la presente memoria. El(los) intrones introducidos artificialmente pueden ser funcionales en células hospedantes para el corte y empalme de genes en gran medida en la forma en que los intrones que se encuentran de forma natural sirven funcionalmente en el corte y empalme de genes.

Sistema de evolución dirigida optimizada

Se describe en la presente memoria un sistema de modificación de genes no estocástico denominado "sistema de evolución dirigida optimizada" para generar fosfolipasas con propiedades nuevas o alteradas. La evolución dirigida optimizada se dirige al uso de ciclos repetidos de redistribución reductora, recombinación y selección que permiten la evolución molecular dirigida de ácidos nucleicos por recombinación. La evolución dirigida optimizada permite la generación de una gran población de secuencias quiméricas evolucionadas, en donde la población generada está enriquecida significativamente en secuencias que tienen un número predeterminado de sucesos de entrecruzamiento.

Un suceso de entrecruzamiento es un punto en una secuencia quimérica donde se produce un desplazamiento de la secuencia de una variante original a otra variante original. Dicho punto normalmente está en la unión donde los oligonucleótidos de dos progenitores están ligados entre sí para formar una sola secuencia. Este método permite calcular las concentraciones correctas de secuencias de oligonucleótidos de modo que la población quimérica final de secuencias esté enriquecida para el número elegido de sucesos de entrecruzamiento. Esto proporciona más control sobre la elección de variantes quiméricas que tienen un número predeterminado de sucesos de entrecruzamiento.

Además, este método proporciona un medio conveniente para explorar una cantidad tremenda de posibles variantes de proteína en comparación con otros sistemas. Previamente, si se generan, por ejemplo, 10^{13} moléculas quiméricas durante una reacción, sería extremadamente difícil ensayar dicho gran número de variantes quiméricas para una actividad particular. Además, una parte significativa de la población progenie tendría un número muy grande de sucesos de entrecruzamiento lo cual daría como resultado proteínas que es menos probable que tengan mayores niveles de una actividad particular. Usando estos métodos, la población de moléculas quiméricas se puede enriquecer para aquellas variantes que tienen un número particular de sucesos de entrecruzamiento. Por lo tanto, aunque se puedan generar todavía 10^{13} moléculas quiméricas durante una reacción, cada una de las moléculas que se elige para el posterior análisis tiene lo más probablemente, por ejemplo, solo tres sucesos de entrecruzamiento. Debido a que a población progenie se puede sesgar para que tenga un número predeterminado de sucesos de entrecruzamiento, se reducen los márgenes de la variedad funcional entre las moléculas quiméricas. Esto proporciona un número más manejable de variables cuando se calcula qué oligonucleótido de los polinucleótido parentales originales debe ser responsable de afectar a un rasgo particular.

Un método para crear una secuencia de polinucleótido progenie quimérica es crear oligonucleótidos que corresponden a fragmentos o porciones de cada secuencia original. Cada oligonucleótido preferiblemente incluye una región única de solapamiento de modo que la mezcla de los oligonucleótidos entre sí da como resultado una nueva variante que tiene cada fragmento de oligonucleótido ensamblado en el orden correcto. También se puede encontrar información adicional en el documento USSN 09/332.835. El número de oligonucleótidos generados para cada variante original conlleva una relación con el número total de entrecruzamientos en la molécula quimérica que finalmente se crea. Por ejemplo, se pueden proporcionar tres variantes de secuencias de nucleótidos originales para realizar una reacción de ligado con el fin de encontrar una variante quimérica que tenga, por ejemplo, mayor actividad a temperatura alta. Como un ejemplo, se puede generar un conjunto de 50 secuencias de oligonucleótidos que corresponden a cada porción de cada variante original. Por consiguiente, durante el proceso de reensamblado por ligado podría haber hasta 50 sucesos de entrecruzamiento dentro de cada una de las secuencias quiméricas. La probabilidad de que cada uno de los polinucleótidos quiméricos generados contenga oligonucleótidos de cada variante original en orden alternante es muy baja. Si está presente cada fragmento de oligonucleótido en la reacción de ligado en la misma cantidad molar, es probable que en algunas posiciones los oligonucleótidos del mismo polinucleótido original ligan uno al lado de otro y por lo tanto no de como resultado un suceso de entrecruzamiento. Si la concentración de cada oligonucleótido de cada progenitor se mantiene constante durante cualquier etapa de ligado en este ejemplo, hay 1/3 de probabilidad (suponiendo 3 progenitores) de que un oligonucleótido de la misma variante original ligue con la secuencia quimérica y no produzca entrecruzamiento.

Por consiguiente, se puede determinar una función de densidad de probabilidad (PDF) para predecir la población de sucesos de entrecruzamiento que es probable que ocurra durante cada etapa en una reacción de ligado dado un número fijo de variantes originales, un número de oligonucleótidos que corresponden a cada variante, y las concentraciones de cada variante durante cada etapa en la reacción de ligado. El análisis estadístico y matemático detrás de la determinación de la PDF se describe a continuación. Usando estos métodos, se puede calcular dicha función de densidad de probabilidad, y por lo tanto enriquecer la población progenie quimérica para un predeterminado número de sucesos de entrecruzamiento que resultan de una reacción de ligado particular. Además, se puede determinar un número objetivo de sucesos de entrecruzamiento, y el sistema después se puede programar para calcular las cantidades de partida de cada oligonucleótido original durante cada etapa en la reacción de ligado para dar una función de densidad de probabilidad que se centre en el número predeterminado de sucesos de entrecruzamiento. Estos métodos se dirigen al uso de ciclos repetidos de redistribución reductora, recombinación y selección que permiten la evolución molecular dirigida de un ácido nucleico que codifica un polipéptido por recombinación. Este sistema permite la generación de una gran población de secuencias quiméricas evolucionadas, en donde la población generada está significativamente enriquecida en secuencias que tienen un número predeterminado de sucesos de entrecruzamiento. Un suceso de entrecruzamiento es un punto en una secuencia quimérica donde se produce un desplazamiento de la secuencia de una variante original a otra variante original. Dicho punto normalmente está en la unión donde los oligonucleótidos de dos progenitores están ligados entre sí para formar una sola secuencia. Este método permite calcular las concentraciones correctas de secuencias de oligonucleótidos de modo que la población quimérica final de secuencias esté enriquecida para el número elegido de sucesos de entrecruzamiento. Esto proporciona más control sobre la elección de variantes quiméricas que tienen un número predeterminado de sucesos de entrecruzamiento.

Además, estos métodos proporcionan un medio conveniente para explorar una cantidad tremenda de posibles variantes de proteína en comparación con otros sistemas. Usando estos métodos descritos en la presente memoria, la población de moléculas quiméricas se puede enriquecer para aquellas variantes que tienen un número particular de sucesos de entrecruzamiento. Por lo tanto, aunque se puedan generar todavía 10^{13} moléculas quiméricas durante una reacción, cada una de las moléculas que se elige para el posterior análisis tiene lo más probablemente, por ejemplo, solo tres sucesos de entrecruzamiento. Debido a que a población progenie resultante se puede sesgar para que tenga un número predeterminado de sucesos de entrecruzamiento, se reducen los márgenes de la variedad funcional entre las moléculas quiméricas. Esto proporciona un número más manejable de variables cuando se calcula qué oligonucleótido de los polinucleótido parentales originales debe ser responsable de afectar a un rasgo particular.

En un caso, el método crea una secuencia de polinucleótido progenie quimérica creando oligonucleótidos que corresponden a fragmentos o porciones de cada secuencia original. Cada oligonucleótido preferiblemente incluye una región única de solapamiento de modo que la mezcla de los oligonucleótidos entre sí da como resultado una nueva variante que tiene cada fragmento de oligonucleótido ensamblado en el orden correcto. Véase también el documento USSN 09/332.835.

El número de oligonucleótidos generados para cada variante original conlleva una relación con el número total de entrecruzamientos en la molécula quimérica que finalmente se crea. Por ejemplo, se pueden proporcionar tres variantes de secuencias de nucleótidos originales para realizar una reacción de ligado con el fin de encontrar una variante quimérica que tenga, por ejemplo, mayor actividad a temperatura alta. Como un ejemplo, se puede generar un conjunto de 50 secuencias de oligonucleótidos que corresponden a cada porción de cada variante original. Por consiguiente, durante el proceso de reensamblado por ligado podría haber hasta 50 sucesos de entrecruzamiento dentro de cada una de las secuencias quiméricas. La probabilidad de que cada uno de los polinucleótidos quiméricos generados contenga oligonucleótidos de cada variante original en orden alternante es muy baja. Si está presente cada fragmento de oligonucleótido en la reacción de ligado en la misma cantidad molar, es probable que en algunas posiciones los oligonucleótidos del mismo polinucleótido original ligen uno al lado de otro y por lo tanto no de como resultado un suceso de entrecruzamiento. Si la concentración de cada oligonucleótido de cada progenitor se mantiene constante durante cualquier etapa de ligado en este ejemplo, hay 1/3 de probabilidad (suponiendo 3 progenitores) de que un oligonucleótido de la misma variante original lique con la secuencia quimérica y no produzca entrecruzamiento.

Por consiguiente, se puede determinar una función de densidad de probabilidad (PDF) para predecir la población de sucesos de entrecruzamiento que es probable que ocurra durante cada etapa en una reacción de ligado dado un número fijo de variantes originales, un número de oligonucleótidos que corresponden a cada variante, y las concentraciones de cada variante durante cada etapa en la reacción de ligado. El análisis estadístico y matemático detrás de la determinación de la PDF se describe a continuación. Se puede calcular dicha función de densidad de probabilidad, y por lo tanto enriquecer la población progenie quimérica para un predeterminado número de sucesos de entrecruzamiento que resultan de una reacción de ligado particular. Además, se puede predeterminar un número objetivo de sucesos de entrecruzamiento, y el sistema después se puede programar para calcular las cantidades de partida de cada oligonucleótido original durante cada etapa en la reacción de ligado para dar una función de densidad de probabilidad que se centre en el número predeterminado de sucesos de entrecruzamiento.

Determinación de sucesos de entrecruzamiento

Se proporciona en la presente memoria un sistema y software que recibe una función de densidad de probabilidad de entrecruzamiento deseada (PDF), el número de genes originales que se van a reensamblar, y el número de fragmentos en el reensamblado como entrada de datos. El resultado de este programa es una "PDF de fragmentos" que se puede usar para determinar una receta para producir los genes reensamblados, y la PDF de entrecruzamientos estimada de esos genes. El procesamiento descrito en la presente memoria se lleva a cabo preferiblemente en MATLAB® (The Mathworks, Natick, Massachusetts) un lenguaje de programación y entorno de desarrollo para informática técnica.

Procedimientos iterativos

Los procedimientos del método se pueden repetir de forma iterativa. Por ejemplo, un ácido nucleico (o, el ácido nucleico) responsable de un fenotipo de fosfolipasa alterado se identifica, realísa, modifica de nuevo, se ensaya de nuevo la actividad. Este procedimiento se puede repetir de forma iterativa hasta que se modifique genéticamente un fenotipo deseado. Por ejemplo, se pueden modificar genéticamente una ruta anabólica o catabólica bioquímica entera en una célula, incluyendo la actividad de fosfolipasa.

De forma similar, si se determina que un oligonucleótido particular no tiene ningún efecto en el rasgo deseado (p. ej., un nuevo fenotipo de fosfolipasa) se puede eliminar como una variable sintetizando oligonucleótidos originales más largos que incluyen la secuencia que se va a eliminar. Puesto que incorporar la secuencia dentro de una secuencia más larga previene cualquier suceso de entrecruzamiento, ya no habrá ninguna variación de esta secuencia en los polinucleótidos progenie. Esta práctica iterativa de determinación de qué oligonucleótidos están más relacionados con el rasgo deseado, y cuales no están relacionados, permite una exploración más eficaz de todas las posibles variantes de proteínas que pueden proporcionar un rasgo o actividad particular.

Barajado in vivo

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

Se describe en la presente memoria un método para producir un polinucleótido híbrido a partir de al menos un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido. El método se puede usar para producir un polinucleótido híbrido introduciendo al menos un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido que comparten al menos una región de homología de secuencia parcial, en una célula hospedante adecuada. Las regiones de homología de secuencia parcial promocionan procesos que dan como resultado la reorganización de secuencias que producen un polinucleótido híbrido. La expresión "polinucleótido híbrido", como se usa en la presente memoria, es cualquier secuencia de nucleótidos que sea resultado del método descrito en la presente memoria y contenga la secuencia de al menos dos secuencias de polinucleótidos originales. Dichos polinucleótidos híbridos pueden ser resultado de sucesos de recombinación intermolecular que promueven la integración de secuencias entre moléculas de ADN. Además, dichos polinucleótidos híbridos pueden ser resultado de procesos de redistribución reductora intramolecular que usar secuencias repetidas para alterar una secuencia de nucleótidos dentro de una molécula de ADN.

Producción de variantes de secuencia

También se describen en la presente memoria métodos para hacer variantes de secuencias de las secuencias de ácido nucleico y fosfolipasa de la invención, o aislar la enzima fosfolipasa, p. ej., fosfolipasa, variantes de secuencia que usan los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención. Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan variantes de un gen de fosfolipasa, que se puede alterar por cualquier medio, incluyendo, p. ej., métodos aleatorios o estocásticos, o métodos no estocásticos o de "evolución dirigida", como se ha descrito antes.

Las variantes aisladas se pueden encontrar de forma natural. La variante también se puede crear in vitro. Se pueden crear variantes usando técnicas de ingeniería genética tales como mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis química aleatoria, procedimientos de eliminación por exonucleasa III, y técnicas de clonación estándar. Alternativamente, dichas variantes, fragmentos, análogos o derivados se pueden crear usando síntesis química o procedimientos de modificación. Otros métodos para hacer variantes también son familiares para los expertos en la técnica. Estos incluyen procedimientos en los que secuencias de ácidos nucleicos obtenidas de aislados naturales se modifican para generar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que tienen características que potencian su valor en aplicaciones industriales o de laboratorio. En dichos procedimientos, se generan y caracterizan un gran número de secuencias variantes que tienen una o más diferencias de nucleótidos con respecto a la secuencia obtenida del aislado natural. Estas diferencias de nucleótidos pueden producir cambios de aminoácidos con respecto a los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos de los aislados naturales.

Por ejemplo, se pueden crear variantes usando la PCR propensa a error. En la PCR propensa a error, la PCR se lleva a cabo en condiciones donde la fidelidad de copiado de la ADN polimerasa es baja, de modo que se obtiene una tasa alta de mutaciones puntuales a lo largo de toda la longitud del producto de la PCR. La PCR propensa a error, se describe, p. ej., en Leung, D.W., et al., *Technique*, 1:11-15, 1989) y Caldwell, R. C. y Joyce G.F., *PCR Methods Applic.*, 2:28-33, 1992. Brevemente, en dichos procedimientos, los ácidos nucleicos que se van a mutagenizar se mezclan con cebadores de la PCR, tampón de reacción, MgCl₂, MnCl₂, polimerasa Taq y una concentración adecuada de dNTP para lograr una tasa alta de mutación puntual a lo largo de toda la longitud del producto de la PCR. Por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo usando 20 fmoles de ácido nucleico que se va a mutagenizar, 30 pmol de cada cebador de la PCR, un tampón de reacción que comprende KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM (pH 8,3) y gelatina al 0,01%, MgCl₂ 7 mM, MnCl₂ 0,5 mM, 5 unidades de polimerasa Taq, dGTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dCTP 1 mM, y dTTP 1 mM. La PCR se puede llevar a cabo durante 30 ciclos de 94° C durante 1 min, 45° C durante 1 min, y 72° C durante 1 min. Sin embargo, se apreciará que estos parámetros se pueden variar según sea adecuado. Los ácidos nucleicos mutagenizados se clonan en un vector adecuado y se evalúan las actividades de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos mutagenizados.

También se pueden crear variantes usando mutagénesis dirigida por oligonucleótidos para generar mutaciones específicas de sitio en cualquier ADN clonado de interés. La mutagénesis por oligonucleótidos se describe, p. ej., en Reidhaar-Olson (1988) *Science* 241:53-57. Brevemente, en dichos procedimientos se sintetizan una pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios que llevan una o más mutaciones que se van a introducir en el ADN clonado y se insertan en el ADN clonado que se va a mutagenizar. Se recuperan los clones que contienen el ADN mutagenizado y se evalúan las actividades de los polipéptidos que codifican.

Otro método para generar variantes es la PCR de ensamblaje. La PCR de ensamblaje implica el ensamblaje de un producto de la PCR de una mezcla de fragmentos de ADN pequeños. Se producen en paralelo un gran número de diferentes reacciones de PCR en el mismo vial, con los productos de una reacción cebando los productos de otra reacción. El ensamblaje se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. n° 5.965.408.

Otro método más de generación de variantes es la mutagénesis por PCR sexual. En la mutagénesis por PCR sexual, se produce la recombinación homóloga forzada entre moléculas de ADN de secuencias de ADN diferentes pero muy relacionadas in vitro, como resultado de la fragmentación aleatoria de la molécula de ADN basada en la homología de secuencia, seguido de fijación del entrecruzamiento por extensión del cebador en una reacción de PCR. La mutagénesis por PCR sexual se describe, p. ej., en Stemmer (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10747-10751. Brevemente, en dichos procedimientos, una pluralidad de ácidos nucleicos que se van a recombinar se digiere con DNasa para generar fragmentos que tienen un tamaño medio de 50-200 nucleótidos. Se purifican fragmentos del tamaño medio deseado y se vuelven a suspender en una mezcla de PCR. La PCR se lleva a cabo en

condiciones que facilitan la recombinación entre los fragmentos de ácidos nucleicos. Por ejemplo, la PCR se puede llevar a cabo por resuspensión de los fragmentos purificados a una concentración de 10-30 ng/μl en una solución de 0,2 mM de cada dNTP, MgCl₂ 2,2 mM, KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM, pH 9,0, y Triton X-100 al 0,1%. 2,5 unidades de polimerasa Taq por 100:1 de mezcla de reacción que se añade y la PCR se lleva a cabo usando el siguiente régimen: 94°C durante 60 segundos, 94°C durante 30 segundos, 50-55°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos (30-45 veces) y 72°C durante 5 minutos. Sin embargo, se apreciará que estos parámetros se pueden variar según sea adecuado. En algunos casos, se pueden incluir oligonucleótidos en las reacciones de PCR. En otros casos, se puede usar el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I en un primer conjunto de reacciones de PCR y se puede usar la polimerasa Taq en un conjunto posterior de reacciones de PCR. Las secuencias recombinantes se aíslan y se evalúan las actividades de los polipéptidos que codifican.

También se pueden crear variantes por mutagénesis in vivo. En algunos casos, las mutaciones aleatorias en una secuencia de interés se generan por propagación de la secuencia de interés en una cepa bacteriana, tal como una cepa de *E. coli* que lleva la mutación en una o más de las rutas de reparación del ADN. Dichas cepas "mutadoras" tienen una tasa de mutación aleatoria más alta que la de un pariente de tipo natural. La propagación del ADN en una de estas cepas finalmente generará mutaciones aleatorias en el ADN. Las cepas mutadoras adecuadas para usar en la mutagénesis in vivo se describen, p. ej., en la publicación PCT N° WO 91/16427.

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

La mutagénesis de ensamblaje recursivo también se puede usar para generar variantes. La mutagénesis de ensamblaje recursivo es un algoritmo para la modificación genética de proteínas (mutagénesis de proteínas) desarrollado para producir diversas poblaciones de mutantes fenotípicamente relacionados, cuyos miembros difieren en la secuencia de aminoácidos. Este método usa un mecanismo de retroalimentación para controlar los ciclos sucesivos de mutagénesis de casete combinatoria. La mutagénesis de ensamblaje recursivo se describe p. ej., en Arkin (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:7811-7815.

En algunos casos, se crean variantes usando la mutagénesis de ensamblaje exponencial. La mutagénesis de ensamblaje exponencial es un procedimiento para generar bibliotecas combinatorias con un porcentaje alto de mutantes únicos y funcionales, en donde grupos pequeños de restos se aleatorizan en paralelo para identificar, en cada posición alterada, aminoácidos que conducen a proteínas funcionales. La mutagénesis de ensamblaje exponencial se describe, p. ej., en Delegrave (1993) *Biotechnology Res.* 11:1548-1552. La mutagénesis aleatoria y dirigida al sitio se describe, p. ej., en Arnold (1993) *Current Opinion in Biotechnology* 4:450-455.

En algunos casos, las variantes se crean usando procedimientos de barajado en donde partes de una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican distintos polipéptidos se fusionan entre sí para crear secuencias de ácidos nucleicos quiméricos que codifican polipéptidos quiméricos como se describe, p. ej., en las patentes de EE.UU. n° 5.965.408; 5.939.250.

También se describen en la presente memoria variantes de polipéptidos de la invención que comprenden secuencias en las que uno o más de los restos de aminoácidos (p. ej., de un polipéptido de ejemplo de la invención) se sustituyen por un resto de aminoácido conservado o no conservado (p. ej., un resto de aminoácido conservado) y dicho resto de aminoácidos conservado sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético. Las sustituciones conservadoras son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares. Por lo tanto, los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen aquellos con sustituciones conservadoras de secuencias de la invención, que incluyen pero no se limitan a las siguientes sustituciones: sustituciones de un aminoácido alifático tal como alanina, valina, leucina e isoleucina por otro aminoácido alifático; sustitución de una serina por una treonina o viceversa; sustitución de un resto ácido tal como ácido aspártico y ácido glutámico por otro resto ácido; sustitución de un resto que lleva un grupo amida, tal como asparagina y glutamina, por otro resto que lleva un grupo amida; intercambio de un resto básico tal como lisina y arginina por otro resto básico; y sustitución de un resto aromático tal como fenilalanina, tirosina por otro resto aromático. Otras variantes son aquellas en las que uno o más de los restos de aminoácidos de los polipéptidos de la invención incluyen un grupo sustituyente.

Otras variantes descritas en la presente memoria, son aquellas en las que el polipéptido está asociado con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido, por ejemplo, polietilenglicol.

Variantes adicionales descritas en la presente memoria son aquellas en las que se fusionan aminoácidos adicionales al polipéptido, tales como una secuencia líder, una secuencia secretora, una secuencia de proproteína o una secuencia que facilita la purificación, enriquecimiento o estabilización del polipéptido.

En algunos casos, las variantes, fragmentos, derivados y análogos de los polipéptidos de la invención retienen alguna función o actividad biológica como los polipéptidos de ejemplo, p. ej., una actividad de fosfolipasa, como se describe en la presente memoria. En otros casos, la variante, fragmento, derivado o análogo incluye una

proteína, de modo que la variante, fragmento, derivado o análogo se pueden activar por escisión de la parte de proteína para producir un polipéptido activo.

Optimización de codones para lograr niveles altos de expresión de proteínas en células hospedantes

Se describen en la presente memoria métodos para modificar ácidos nucleicos que codifican fosfolipasas para modificar el uso de codones. Se proporcionan en la presente memoria métodos para modificar codones en un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa para aumentar o disminuir su expresión en una célula hospedante. También se proporcionan en la presente memoria ácidos nucleicos que codifican una fosfolipasa modificada para aumentar su expresión en una célula hospedante, enzimas fosfolipasas así modificadas, y métodos para hacer las enzimas fosfolipasas modificadas. El método comprende identificar un codón "no preferido" o "menos preferido" en el ácido nucleico que codifica una fosfolipasa y sustituir uno o más de esos codones no preferidos o menos preferidos por un "codón preferido" que codifica el mismo aminoácido que el codón sustituido, y al menos un codón no preferido o menos preferido en el ácido nucleico se ha sustituido por un codón preferido que codifica el mismo aminoácido. Un codón preferido es un codón representado en exceso en las secuencias codificantes en genes en la célula hospedante y un codón no preferido o menos preferido es un codón subrepresentado en menos cantidad en secuencias codificantes en genes en la célula hospedante.

Las células hospedantes para la expresión de ácidos nucleicos, expresión de casetes y vectores descritos en la presente memoria incluyen bacterias, levaduras, hongos, células de plantas, células de insectos y células de mamíferos. Por lo tanto, se proporcionan en la presente memoria métodos para optimizar el uso de codones en todas estas células, ácidos nucleicos de codones alterados y polipéptidos hechos por los ácidos nucleicos de codones alterados. Las células huésped de ejemplo incluyen bacterias Gram negativas, tales como *Escherichia coli*; bacterias Gram positivas, tales como cualquier *Bacillus* (p. ej., *B. cereus*) o *Streptomyces*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Bacillus subtilis*. Las células hospedantes de ejemplo incluyen organismos eucariotas, p. ej., diferentes levaduras tales como *Saccharomyces* sp., que incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, y *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus niger*, y células de mamíferos en líneas celulares y células de insectos en líneas celulares. Por lo tanto, se proporcionan en la presente invención ácidos nucleicos y polipéptidos optimizados para la expresión en estos organismos y especies.

Por ejemplo, los codones de un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa aislados de una célula bacteriana se modifican de modo que el ácido nucleico es expresado de forma óptima en una célula bacteriana diferente de la bacteria de la que se obtuvo la fosfolipasa, una levadura, un hongo, una célula vegetal, una célula de insecto o una célula de mamífero. Los métodos para optimizar codones son bien conocidos en la técnica, véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 5.795.737; Baca (2000) *Int. J. Parasitol.* 30:113-118; Hale (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:185-188; Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253. Véase también Narum (2001) *Infect. Immun.* 69:7250-7253, que describe la optimización de codones en sistemas de ratón; Outchkourov (2002) *Protein Expr. Purif.* 24:18-24, que describe la optimización de codones en levaduras; Feng (2000) *Biochemistry* 39:15399-15409, que describe la optimización de codones en *E. coli*; Humphreys (2000) *Protein Expr. Purif.* 20:252-264, que describe la optimización del uso de codones que afecta a la secreción en *E. coli*.

Animales no humanos transgénicos

Se describen en la presente memoria animales no humanos transgénicos que comprenden un ácido nucleico, un polipéptido, un casete o vector de expresión o una célula transfectada o transformada. Los animales no humanos transgénicos pueden ser, p. ej., cabras, conejos, ovejas, cerdos, vacas, ratas y ratones, que comprenden los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria. Estos animales se pueden usar, p. ej., como modelos in vivo para estudiar la actividad de fosfolipasa o como modelos para cribar moduladores de actividad de fosfolipasa in vivo. Las secuencias codificantes de los polipéptidos que se van a expresar en animales no humanos transgénicos se pueden diseñar para que sean constitutivas, o esté bajo control de factores reguladores de la transcripción específicos, de tejido, específicos de desarrollo o inducibles. Los animales no humanos transgénicos se pueden diseñar y generar usando cualquier método conocido en la técnica; véase, p. ej., las patentes de EE.UU. n° 6.211.428; 6.187.992; 6.156.952; 6.118.044; 6.111.166; 6.107.541; 5.959.171; 5.922.854; 5.892.070; 5.880.327; 5.891.698; 5.639.940; 5.573.933; 5.387.742; 5.087.571, que describen la fabricación y uso de células y huevos transformados y ratones, ratas, conejos, ovejas, cerdos y vacas transgénicos. Véase también, p. ej., Pollock (1999) *J. Immunol. Methods* 231:147-157, que describen la producción de proteínas recombinantes en la leche de animales lecheros transgénicos; Baguisi (1999) *Nat. Biotechnol.* 17:456-461, que demuestran la producción de cabras transgénicas. La patente de EE.UU. n° 6.211.428, describe la fabricación y uso de mamíferos no humanos transgénicos que expresan en sus cerebros una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ADN. La patente de EE.UU. n° 5.387.742, describe la inyección de secuencias de ADN sintéticas o recombinantes clonadas en huevos de ratón fertilizados, implantar los huevos inyectados en hembras pseudopreñadas y llevar a término los ratones transgénicos cuyas células expresan proteínas relacionadas con la patología de la enfermedad de Alzheimer. La patente de EE.UU. n° 6.187.992, describe la fabricación y uso de un ratón transgénico cuyo genoma comprende una alteración del gen que codifica la proteína precursora de amiloide (APP).

También se pueden usar "animales con inactivación génica" para la práctica de los métodos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los animales transgénicos o modificados comprenden un "animal con inactivación génica", p.

ej., un “ratón con inactivación génica”, genéticamente modificados para no expresar o no ser capaces de expresar una fosfolipasa.

Plantas y semillas transgénicas

Se describen en la presente memoria plantas y semillas transgénicas que comprenden un ácido nucleico, un polipéptido (p. ej., una fosfolipasa), un casete o vector de expresión o una célula transfectada o transformada descritos en la presente memoria. Se describen además en la presente memoria productos de plantas, p. ej., aceites, semillas, hojas, extractos y similares, que comprenden un ácido nucleico y/o polipéptido (p. ej., una fosfolipasa), descritos en la presente memoria. La planta transgénica puede ser dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot). Se proporcionan además en la presente memoria métodos para fabricar y usar estas plantas y semillas transgénicas. La planta o célula vegetal transgénica que expresa un polipéptido descrito en la presente memoria, se puede construir de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 6.309.872.

Los ácidos nucleicos y construcciones de expresión descritos en la presente memoria, se pueden introducir en una célula vegetal por cualquier medio. Por ejemplo, los ácidos nucleicos o construcciones de expresión se pueden introducir en el genoma de un hospedante vegetal deseado, o los ácidos nucleicos o construcciones de expresión pueden ser episomas. La introducción en el genoma de una planta deseada puede ser de modo que la producción de fosfolipasa por el hospedante está regulada por elementos de control transcripcionales o traduccionales endógenos. Se proporcionan además en la presente memoria “plantas con inactivación génica” donde la inserción de la secuencia génica, p. ej., por recombinación homóloga, ha alterado la expresión del gen endógeno. Los medios para generar plantas “con inactivación génica” se conocen bien en la técnica, véase, p. ej., Strepp (1998) *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95:4368-4373; Miao (1995) *Plant J* 7:359-365. Véase la discusión sobre plantas transgénicas más adelante.

Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria se pueden usar para conferir rasgos deseados esencialmente a cualquier planta, p. ej., a plantas que contienen semillas oleaginosas, tales como semillas de arroz, soja, colza, girasol, sésamo y cacahuetes. Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria se pueden usar para manipular rutas metabólicas de una planta con el fin de optimizar o alterar la expresión de fosfolipasa en el hospedante. Pueden cambiar la actividad de fosfolipasa en una planta. Alternativamente, una fosfolipasa descrita en la presente memoria se puede usar en la producción de una planta transgénica para producir un compuesto no producido de forma natural por esa planta. Esto puede disminuir los costes de producción o crear un nuevo producto.

En un caso, la primera etapa en la producción de una planta transgénica implica hacer una construcción de expresión para la expresión en una célula vegetal. Estas técnicas son bien conocidas en la materia. Pueden incluir seleccionar y clonar un promotor, una secuencia codificante para facilitar la unión eficaz de ribosomas a ARNm y seleccionar las secuencias terminadoras de genes adecuadas. Un promotor de ejemplo constitutivo es CaMV35S, del virus del mosaico de la coliflor, que en general produce un grado alto de expresión en plantas. Un promotor inducible por luz de ejemplo es el promotor del gen *cab* la proteína de unión a la clorofila *a/b* principal.

En un caso, el ácido nucleico se modifica para lograr mayor expresión en una célula vegetal. Por ejemplo, una secuencia descrita en la presente memoria es probable que tenga mayor porcentaje de pares de nucleótidos A-T comparado con el visto en una planta, algunas de las cuales prefieren las parejas de nucleótidos G-C. Por lo tanto, los nucleótidos A-T en la secuencia codificante se pueden sustituir por nucleótidos G-C sin cambiar significativamente la secuencia de aminoácidos, para potenciar la producción del producto génico en células vegetales.

Se puede añadir gen de marcador seleccionable a la construcción de gen con el fin de identificar células vegetales o tejidos que hayan integrado satisfactoriamente el transgén. Esto puede ser necesario porque lograr la incorporación y expresión de genes en células vegetales es un suceso raro, que ocurre en solo un porcentaje pequeño de los tejidos o células a los que se dirige. Los genes de marcadores seleccionables codifican proteínas que proporcionan resistencia a agentes que normalmente son tóxicos para las plantas, tales como antibióticos o herbicidas. Solo las células vegetales que han integrado el gen de marcador seleccionable sobrevivirán cuando crezcan en un medio que contiene el antibiótico o herbicida adecuado. Como para otros genes insertados, los genes marcadores también requieren promotor y secuencias de terminación para la función adecuada.

En un aspecto, hacer plantas o semillas transgénicas comprende incorporar secuencias descritas en la presente memoria y, opcionalmente, genes de marcadores en una construcción de expresión objetivo (p. ej., un plásmido), junto con la colocación del promotor y secuencias terminadoras. Esto puede implicar transferir el gen modificado en la planta por un método adecuado. Por ejemplo, se puede introducir una construcción directamente en el ADN genómico de la célula vegetal usando técnicas tales como electroporación y microinyección de protoplastos de células vegetales, o las construcciones se pueden introducir directamente en tejido de planta usando métodos balísticos, tales como bombardeo de partículas de ADN. Por ejemplo, véase, p. ej., Christou (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:197-203; Pawlowski (1996) *Mol. Biotechnol.* 6:17-30; Klein (1987) *Nature* 327:70-73; Takumi (1997) *Genes Genet. Syst.* 72:63-69, que describen el uso de bombardeo de partículas para introducir transgenes en el trigo; y

Adam (1997) véase antes, para el uso de bombardeo de partículas para introducir YAC en células vegetales. Por ejemplo, Rinehart (1997) véase antes, usaba el bombardeo de partículas para generar plantas de algodón transgénicas. Se describen aparatos para acelerar partículas en la patente de EE.UU. n° 5.015.580; y, el instrumento de aceleración de partículas BioRad (Biolistics) PDS-2000 disponible en el mercado; véase también, John, patente de EE.UU. n° 5.608.148; y Ellis, patente de EE.UU. n° 5.681.730, que describe la transformación mediada por partículas de gimnospermas.

En un caso, los protoplastos se pueden inmovilizar e inyectar ácidos nucleicos, p. ej. una construcción de expresión. Aunque la regeneración de la planta a partir de protoplastos no es fácil con cereales, la regeneración de la planta es posible en legumbres usando embriogénesis somática a partir de protoplastos derivados del callo. Los tejidos organizados se pueden transformar con ADN desnudo usando una técnica de pistola génica, donde el ADN se aplica como recubrimiento sobre microproyectiles de tungsteno, disparo de 1/100 del tamaño de las células, que llevan al ADN profundo en las células y los orgánulos. El tejido transformado se induce después para la regeneración, normalmente por embriogénesis somática. Esta técnica ha tenido éxito en varias especies de cereales incluyen el maíz y el arroz.

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

Alternativamente, los ácidos nucleicos p. ej. una construcción de expresión, se pueden combinar con regiones flanqueadoras de ADN-T adecuadas y introducir en un vector hospedante de *Agrobacterium tumefaciens*. Las funciones de virulencia en el hospedante *Agrobacterium tumefaciens* dirigirán la inserción de la construcción y el marcador adyacente en el ADN de la célula vegetal cuando la célula es infectada por las bacterias. Las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, que incluyen desarmado y uso de vectores binarios, están bien descritos en la bibliografía científica. Véase, p. ej., Horsch (1984) *Science* 233:496-498; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803 (1983); Gene Transfer to Plants, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlin 1995). El ADN en una célula de *A. tumefaciens* está contenido en el cromosoma bacteriano, así como en otra estructura conocida como el plásmido Ti (inductor tumoral). El plásmido Ti contiene un tramo de ADN denominado ADN-T (~20 kb de longitud) que es transferido a la célula vegetal en el proceso de infección y una serie de genes vir (virulencia) que dirigen el proceso de infección. *A. tumefaciens* solo puede infectar una planta a través de heridas: cuando la raíz o tallo de una planta es dañada desprende determinadas señales químicas, en respuesta a las cuales, los genes vir de *A. tumefaciens* son activados y dirigen una serie de sucesos necesarios para la transferencia del ADN-T desde el plásmido Ti al cromosoma de la planta. El ADN-T entra en la célula de la planta a través de la herida. Una especulación es que el ADN-T espera hasta que el ADN de la planta se ha replicado o transcrito, después se inserta el mismo en el ADN de la planta expuesta. Con el fin de usar *A. tumefaciens* como un vector transgénico, se ha eliminado la sección de inducción tumoral del ADN-T, mientras que se retienen las regiones del borde del ADN-T y los genes vir. Después el transgén se inserta entre las regiones borde del ADN-T, donde es transferido a la célula vegetal y queda integrado en los cromosomas de la planta.

Los métodos descritos en la presente memoria proporcionan la transformación de plantas monocotiledóneas usando los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, que incluyen cereales importantes, véase Hiei (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:205-218. Véase también, p. ej., Horsch (1984) *Science* 233:496; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803; Thykjaer (1997) véase antes; Park (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1135-1148, que describen la integración de ADN-T en ADN genómico. Véase, también D'Halluin, patente de EE.UU. n° 5.712.135, que describe un procedimiento para la integración estable de un ADN que comprende un gen que es funcional en una célula de un cereal u otra planta monocotiledónea.

En un aspecto, la tercera etapa puede implicar la selección y regeneración de plantas enteras capaces de transmitir el gen objetivo incorporado a la siguiente generación. Dichas técnicas de regeneración se basan en la manipulación de algunas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo tisular, basándose típicamente en un marcador de biocida y/o herbicida que se ha introducido junto con las secuencias de nucleótidos deseadas. La regeneración de la planta a partir de protoplastos cultivados se describe en Evans et al., *Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant Cell Culture*, pág. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; y Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pág. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. La regeneración también se puede obtener de callos, explantes, órganos o partes de la planta. Dichas técnicas de regeneración se describen en general en Klee (1987) *Ann. Rev. of Plant Phys.* 38:467-486. Para obtener plantas enteras a partir de tejidos transgénicos tales como embriones inmaduros, se pueden cultivar en condiciones ambientales controladas en una serie de medios que contienen nutrientes y hormonas, un procedimiento conocido como cultivo tisular. Una vez que se han generado plantas enteras y producen semillas, empieza la evaluación de la progenie.

Después de que el casete de expresión se incorpora establemente en plantas transgénicas, se puede introducir en otras plantas por cruce sexual. Se puede usar cualquiera de una serie de técnicas de cruce convencionales, dependiendo de las especies que se van a cruzar. Puesto que la expresión transgénica de los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria conduce a cambios fenotípicos, las plantas que comprenden los ácidos nucleicos recombinantes, se pueden cruzar sexualmente con una segunda planta para obtener un producto final. Por lo tanto,

la semilla se puede obtener de un cruce entre dos plantas transgénicas proporcionadas en la presente memoria, o un cruce entre una planta proporcionada en la presente memoria y otra planta. Los efectos deseados (p. ej., expresión de los polipéptidos descritos en la presente memoria para producir una planta en la que se ha alterado el comportamiento de la floración) se pueden potenciar cuando ambas plantas parentales expresan los polipéptidos (p. ej., una fosfolipasa) descritos en la presente memoria. Los efectos deseados se pueden pasar a las generaciones futuras de plantas por medios de propagación convencionales.

Los ácidos nucleicos y polipéptidos descritos en la presente memoria son expresados o se insertan en cualquier planta o semilla. Las plantas transgénicas proporcionadas en la presente memoria pueden ser dicotiledóneas o monocotiledóneas. Los ejemplos de plantas transgénicas monocotiledóneas son hierbas, tales como hierba de pradera (*Poa*), hierba forrajera tales como festuca, *Lolium*, hierba templada, tales como *Agrostis*, y cereales, p. ej., trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz. Los ejemplos de plantas transgénicas dicotiledóneas son tabaco, legumbres, tales como altramuces, patata, remolacha azucarera, guisantes, judías y soja, y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), tales como coliflor, semilla de colza y el organismo modelo estrechamente relacionado *Arabidopsis thaliana*. Por lo tanto, las plantas y semillas transgénicas incluyen una amplia variedad de plantas, que incluyen, pero no se limitan a especies de los géneros *Anacardium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glicina*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachia*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solanum*, *Sorghum*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vitis*, *Vigna*, y *Zea*.

En casos alternativos, los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria son expresados en plantas (p. ej., como plantas transgénicas), tales como plantas que contienen semillas oleaginosas, p. ej., semillas de arroz, soja, colza, girasol, sésamo y cacahuetes. Los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria pueden ser expresados en plantas que contienen células de fibra, que incluyen, p. ej., algodón, árbol de algodón de seda (*kapok*, ceiba pentandra), sauce del desierto, arbusto de creosota, *Krascheninnikovia lanata*, balsa, ramio, kenaf, cáñamo, roselle, yute, abacá sisal y lino. En casos alternativos, las plantas transgénicas pueden ser miembros del género *Gossypium*, que incluye miembros de cualquiera de las especies *Gossypium*, tales como *G. arboreum*, *G. herbaceum*, *G. barbadense*, y *G. hirsutum*.

También se proporcionan en la presente invención plantas transgénicas que se van a usar para producir grandes cantidades de los polipéptidos (p. ej., una fosfolipasa o anticuerpo) de la invención. Por ejemplo, véase Palmgren (1997) *Trends Genet.* 13:348; Chong (1997) *Transgenic Res.* 6:289-296 (que produce proteína de la leche humana beta-caseína en plantas de patata transgénicas usando un promotor de mannopina sintasa bidireccional (*mas1'*,*2'*) inducible por auxina con métodos de transformación de disco de hoja mediados por *Agrobacterium tumefaciens*).

Usando procedimientos conocidos, un experto en la técnica puede cribar plantas proporcionadas en la presente memoria, detectando el aumento o disminución del ARNm transgénico o proteína en plantas transgénicas. Los medios para detectar y cuantificar los ARNm o proteínas son bien conocidos en la técnica.

Polipéptidos y péptidos

Se proporcionan en la presente memoria polipéptidos sintéticos o recombinantes aislados que tienen una identidad de secuencia (p. ej., al menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más o de identidad de secuencia completa (100%)) con una secuencia de ejemplo que tiene uno o más cambios de secuencia (p. ej., mutaciones) como se expone en las tablas 12 a 15, como se describe en el ejemplo 3, más adelante, o uno de sus fragmentos enzimáticamente activos.

Como se ha descrito anteriormente, la identidad puede ser a lo largo de la longitud entera del polipéptido, o la identidad puede ser a lo largo de una subsecuencia del mismo. p. ej., una región de al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o más restos. Los polipéptidos descritos en la presente memoria también pueden ser más cortos que la longitud entera de los polipéptidos de ejemplo. También se proporcionan en la presente invención polipéptidos (péptidos, fragmentos) que varían de tamaño entre aproximadamente 5 y la longitud entera un polipéptido, p. ej., una enzima, tal como una fosfolipasa, p. ej., fosfolipasa; siendo tamaños de ejemplo aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400 o más restos, p. ej., restos contiguos de las fosfolipasas de ejemplo. Los péptidos descritos en la presente memoria pueden ser útiles como, p. ej., sondas de marcaje, antígenos, toleragenes, motivos, sitios activos de fosfolipasa, dominio de unión, dominios reguladores, y similares.

Se describen en la presente memoria polipéptidos que tienen secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 6 que comprenden (y tienen) uno o más cambios de restos de aminoácidos (p. ej., mutaciones) como se expone en las tablas 12 a 15, y sus subsecuencias, p. ej., sus sitios activos ("dominios catalíticos") que tienen una actividad de fosfolipasa, p. ej., una actividad de fosfolipasa C (PLC), p. ej., una actividad de PI-PLC. En un caso, el polipéptido tiene una actividad de fosfolipasa pero carece de actividad de hidrólisis de aceite neutro (triglicérido). Por ejemplo,

en un caso, el polipéptido tiene una actividad de fosfolipasa pero carece de cualquier actividad que afecte a la fracción de aceite neutro (triglicérido). En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de desgomado que comprende el uso de un polipéptido de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa, pero no actividad de lipasa.

- 5 "Aminoácido" o "secuencia de aminoácidos" como se usa en la presente memoria se refiere a un oligopéptido, péptido, polipéptido o secuencia de proteína, o a un fragmento, porción o subunidad de cualquiera de ellos, y a moléculas que se encuentran de forma natural o sintéticas.

Los términos "polipéptido" y "proteína" como se usan en la presente memoria se refieren a aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isómeros peptídicos, y pueden contener aminoácidos modificados distintos de los 20 aminoácidos codificados por genes. El término "polipéptido" también incluye péptidos y fragmentos de polipéptidos, motivos y similares. El término también incluye polipéptidos glucosilados. Los péptidos y polipéptidos descritos en la presente memoria también incluyen todas las formas "miméticas" y "peptidomiméticas" como se describe con más detalle más adelante.

10 Como se usa en la presente memoria, el término "aislado" significa que el material se separa de su entorno original (p. ej., el entorno natural si se encuentra de forma natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido que se encuentra de forma natural en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o polipéptido separado de parte o todos los materiales que coexisten en el sistema natural, está aislado. Dichos polinucleótidos podrían ser parte de un vector y/o dichos polinucleótidos o polipéptidos podrían ser parte de una composición, y todavía estar aislados en cuanto que dicho vector o composición no es parte de su entorno natural. Como se usa en la presente memoria, un material o composición aislados también puede ser una composición "purificada", es decir, no requiere pureza absoluta; más bien, está previsto como una definición relativa. Los ácidos nucleicos individuales obtenidos de una biblioteca se pueden purificar de forma convencional hasta homogeneidad electroforética. Se proporcionan en la presente memoria ácidos nucleicos que se han purificado del ADN genómico o de otras secuencias en una biblioteca u otro entorno por al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más órdenes de magnitud.

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

20 Los péptidos y polipéptidos de la invención también se pueden glucosilar. La glucosilación se puede añadir postraduccionalmente por mecanismos químicos o de biosíntesis celular, en donde estos últimos incorporan el uso de motivos de glucosilación conocidos, que pueden ser naturales para la secuencia o se pueden añadir como un péptido o añadir en la secuencia codificante de ácido nucleico. La glucosilación puede ser unida a O o unida a N.

25 Los péptidos y polipéptidos, como se han definido antes, incluyen todas las formas "miméticas" y "peptidomiméticas". Los términos "mimético" y "peptidomimético" se refieren a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente la misma estructura y/o características funcionales de los polipéptidos de la invención. El mimético puede estar compuesto enteramente por análogos sintéticos, no naturales de aminoácidos, o es una molécula quimérica de aminoácidos peptídicos parcialmente naturales y análogos parcialmente no naturales de aminoácidos. Los miméticos también pueden incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales con la condición de que dichas sustituciones no alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético. Como con los polipéptidos de la invención que son variantes conservadoras, la experimentación rutinaria determinará si un mimético está dentro del alcance de la invención, es decir, que su estructura y/o función no está sustancialmente alterada.

30 Las composiciones de miméticos de polipéptidos pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales. Las composiciones de miméticos descritas en la presente memoria incluye uno o todos los tres siguientes grupos estructurales: a) grupos de unión de restos distintos de las uniones de enlace amida natural ("enlace peptídico"); b) restos no naturales en lugar de restos de aminoácidos que se encuentran de forma natural; o c) restos que inducen imitación estructura secundaria, es decir, inducen o estabilizan una estructura secundaria, p. ej., una conformación de giro beta, giro gamma, lámina beta, hélice alfa, y similares. Por ejemplo, un polipéptido se puede caracterizar como un mimético cuando todos o algunos de sus restos están unidos por medios químicos distintos de los enlaces peptídicos naturales. Los restos peptidomiméticos individuales se pueden unir por enlaces peptídicos, otros enlaces químicos o medios de acoplamiento, tales como, p. ej., glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, maleimidias bifuncionales, N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-di-isopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos de unión que pueden ser una alternativa a la uniones por enlace amida tradicional ("enlace peptídico") incluyen, p. ej., cetometileno (p. ej., -C(=O)-CH₂- para -C(=O)-NH-), aminometileno (CH₂-NH), etileno,

olefina (CH=CH), éter (CH₂-O), tioéter (CH₂-S), tetrazol (CN₄-), tiazol, retroamida, tioamida, o éster (véase, p. ej., Spatola (1983) en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. 7, pág. 267-357, "Peptide Backbone Modifications," Marcell Dekker, NY).

Un polipéptido también se puede caracterizar como un mimético al contener todos o algunos restos no naturales en el lugar de restos de aminoácidos que se encuentran de forma natural. Los restos no naturales están descritos en la bibliografía científica y de patentes; se describen a continuación algunas composiciones no naturales de ejemplo útiles como miméticos de restos de aminoácidos naturales y se describen directrices más adelante. Los miméticos de aminoácidos aromáticos se pueden generar sustituyendo por, p. ej., D- o L- naftilalanina; D- o L- fenilglicina; D- o L-2 tienilalanina; D- o L-1, -2, 3-, o 4-pireneilalanina; D- o L-3 tienilalanina; D- o L-(2-piridinil)-alanina; D- o L-(3-piridinil)-alanina; D- o L-(2-pirazinil)-alanina; D- o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluoro-fenilalanina; D- o L-p-bifenilfenilalanina; K- o L-p-metoxi-bifenilfenilalanina; D- o L-2-indol-(alquil)alaninas; y, D- o L-alquilaininas, donde alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, iso-butilo, sec-isotilo, iso-pentilo, sustituidos o no sustituidos, o un aminoácido no ácido. Los anillos aromáticos de un aminoácido no natural incluyen, p. ej., anillos aromáticos de tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo, y piridilo.

Los miméticos de aminoácidos ácidos se pueden generar por sustitución, p. ej., aminoácidos no carboxilato mientras mantengan una carga negativa; (fosfono)alanina; treonina sulfatada. Los grupos laterales carboxilo (p. ej., aspartilo o glutamilo) también se pueden modificar selectivamente con carbodiimidas (R'-N-C-N-R') tales como, p. ej., 1-ciclohexil-3(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. El aspartilo o glutamilo también se pueden convertir en restos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones amonio. Los miméticos de aminoácidos básicos se pueden generar por sustitución con, p. ej., (además de lisina y arginina) los aminoácidos ornitina, citrulina, o ácido (guanidino)-acético, o ácido (guanidino)alquil-acético, donde alquilo es como se ha definido antes. Los derivados de nitrilo (p. ej., que contiene el resto CN en lugar de COOH) se pueden sustituir por asparagina o glutamina. Los restos asparaginilo y glutaminilo se pueden desaminar a los correspondientes restos aspartilo o glutamilo. Los miméticos de restos arginina se pueden generar haciendo reaccionar arginilo con, p. ej., uno o más reactivos convencionales, que incluyen, p. ej., fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona, o ninhidrina, preferiblemente en condiciones alcalinas. Los miméticos de restos de tirosina se pueden generar haciendo reaccionar tirosilo con, p. ej., compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Se pueden usar N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar las especies de O-acetil-tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los miméticos de restos de cisteína se pueden generar haciendo reaccionar restos de cisteinilo con, p. ej., alfa-halogenoacetatos tales como ácido 2-cloroacético o cloroacetamida y aminos correspondientes; para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los miméticos de restos cisteína también se pueden generar haciendo reaccionar restos cisteinilo, p. ej., bromo-trifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidazoil)propiónico; cloroacetil-fosfato, N-alquilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil-disulfuro; metil-2-piridil-disulfuro; p-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4-nitrofenol; o, cloro-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol. Los miméticos de lisina se pueden generar (y los restos amino terminal se pueden alterar) haciendo reaccionar la lisina con, p. ej., anhídrido de ácido succínico u otros ácidos carboxílicos. Los miméticos de restos que contiene lisina y otros alfa-amino también se pueden generar por reacción con imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo, piridoxal-fosfato, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitro-bencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4, pentanediona, y reacciones catalizadas por transamidasa con glioxilato. Los miméticos de metionina se pueden generar por reacción con, p. ej., metionina-sulfóxido. Los miméticos de prolina incluyen, p. ej., ácido pipecólico, ácido tiazolidina-carboxílico, 3- o 4-hidroxi-prolina, deshidroprolina, 3- o 4-metilprolina, o 3,3-dimetilprolina. Los miméticos de resto histidina se pueden generar haciendo reaccionar histidilo con, p. ej., procarbonato de dietilo o bromuro de para-bromofenacilo. Otros miméticos incluyen, p. ej., los generados por hidroxilación de prolina y lisina; fosforilación de los grupos hidroxilo de restos serilo o treonilo; metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina e histidina; acetilación de la amina N-terminal; metilación de la cadena principal de restos amida o sustitución con N-metilaminoácidos; o amidación de grupos carboxilo C-terminales.

Un resto, p. ej., un aminoácido, de un polipéptido de la invención también se puede sustituir por un aminoácido (o resto peptidomimético) de quiralidad opuesta. Por lo tanto, cualquier aminoácido que se encuentra de forma natural en la configuración L (que también se puede denominar R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) se puede sustituir por el aminoácido del mismo tipo de estructura química o un peptidomimético, pero de quiralidad opuesta, denominado el aminoácido D, pero también se puede denominar como la forma R o S.

También se proporcionan en la presente memoria métodos de modificación de los polipéptidos descritos en la presente memoria por procedimientos naturales, tales como procesamiento postruccional (p. ej., fosforilación, acilación, etc.), o por técnicas de modificación química, y los polipéptidos modificados resultantes. Las modificaciones se pueden producir en cualquier sitio en el polipéptido, incluyendo la cadena principal peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y el extremo amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o grados variables en varios sitios en un polipéptido dado. También un polipéptido dado puede tener muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de un fosfatidilinositol, ciclación entrecruzada, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación,

procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación y adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteína tal como arginilación. Véase, p. ej., Creighton, T.E., *Proteins - Structure and Molecular Properties* 2ª Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pp. 1-12 (1983).

Los métodos de síntesis peptídica química en fase sólida también se pueden usar para sintetizar el polipéptido o fragmentos de la invención. Dicho método se conoce en la técnica desde principios de la década de 1960 (Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963) (Véase también, Stewart, J. M. y Young, J. D., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pág. 11-12)) y recientemente se ha usado en el diseño y kits de síntesis de péptidos, de laboratorio disponible en el mercado (Cambridge Research Biochemicals). Dichos kits de laboratorio disponibles en el mercado han usado en general las enseñanzas de H. M. Geysen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81:3998 (1984) y proporcionan la síntesis de péptidos por los extremos de una multitud de "varillas" y "agujas" los cuales están todos conectados a una placa individual. Cuando se usa dicho sistema, una placa de varillas o agujas se invierte y se inserta en una segunda placa de pocillos o reservorios correspondientes, que contiene soluciones para unir o anclar un aminoácido adecuado al extremo de la aguja o varilla. Repitiendo dicha etapa del procedimiento, es decir, invirtiendo e insertando los extremos de la varilla y aguja en soluciones adecuadas, los aminoácidos construyen los péptidos deseados. Además, están disponibles una serie de sistemas de síntesis de péptidos con Fmoc disponibles. Por ejemplo, el ensamblaje de un polipéptido o fragmento se puede llevar a cabo en un soporte sólido que usa un sintetizador de péptidos automático Applied Biosystems, Inc. Model 431A™. Dicho equipo proporciona acceso fácil a los péptidos de la invención, se por síntesis directa o por síntesis de una serie de fragmentos que se pueden acoplar usando otras técnicas conocidas.

Enzimas fosfolipasa

La invención proporciona polipéptidos que tienen una actividad de fosfolipasa. En un caso, los polipéptidos de la invención tienen una actividad de fosfolipasa, o cualquier combinación de actividades de fosfolipasa, como se describe en la presente memoria (p. ej., una actividad de enzima fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol (PI-PLC), etc.). En casos alternativos, las fosfolipasas de la invención que se han modificado des las de las fosfolipasas de ejemplo descritas en la presente memoria.

Como se usa en la presente memoria, el término "fosfolipasa" abarca enzimas que tienen cualquier actividad de fosfolipasa, por ejemplo, escisión de un enlace éster glicerolfosfato (cataliza la hidrólisis de un enlace éster glicerolfosfato), p. ej., en un aceite, tal como un aceite bruto o un aceite vegetal. La actividad de fosfolipasa de la invención puede generar una base fosforilada extraíble en agua y un diglicérido. La expresión "una actividad de fosfolipasa" es la hidrólisis de enlaces éster glicerofosfato a altas temperaturas, bajas temperaturas, pH alcalinos y a pH ácidos, escisión de un éster glicerofosfato para generar una base fosforilada extraíble en agua y un diglicérido, corte de enlaces éster de glicerina y ácido fosfórico en fosfolípidos, y otras actividades, tales como la capacidad para unirse a e hidrolizar un sustrato, tal como un aceite, p. ej., un aceite bruto o un aceite vegetal, incluyendo también el sustrato fosfatidilcolinas vegetales y animales, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas y esfingomielinas. La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de fosfolipasa C (PLC); una actividad de PI-PLC, una actividad de fosfolipasa A (PLA), tal como una actividad de fosfolipasa A1 o fosfolipasa A2; una actividad de fosfolipasa B (PLB), tal como una actividad de fosfolipasa B1 o fosfolipasa B2, incluyendo actividad de lisofosfolipasa (LPL) y/o actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA); una actividad de fosfolipasa D (PLD), tal como una actividad de fosfolipasa D1 o fosfolipasa D2; y/o una actividad de patatina o cualquiera de sus combinaciones. La actividad de fosfolipasa puede comprender la hidrólisis de una glucoproteína, p. ej., como una glucoproteína encontrada en un tubérculo de patata o cualquier planta del género *Solanum*, p. ej., *Solanum tuberosum*. En casos alternativos la actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad enzimática de patatina, tal como una actividad de patatina esterasa (véase, p. ej., Jimenez (2002) *Biotechnol. Prog.* 18:635-640). En algunas realizaciones, la actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de lípido acil hidrolasa (LAH).

En realizaciones alternativas, las fosfolipasas PLC de la invención (p. ej., catalizan la hidrólisis de) una variedad de sustratos fosfolípidos que incluyen fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), y/o ácido fosfatídico (PA) o una de sus combinaciones. Además, estas enzimas pueden tener grados variables de actividad sobre las formas de lisofosfolípido de estos fosfolípidos. En varios aspectos, las enzimas PLC de la invención pueden mostrar preferencia por la fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina como sustratos.

En realizaciones alternativas, las fosfolipasas fosfatidilinositol PLC de la invención usan una variedad de sustratos fosfolípidos que incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico, o una de sus combinaciones. En realizaciones alternativas, estas enzimas pueden tener grados variables de actividad sobre las formas de lisofosfolípido de estos fosfolípidos. En varios aspectos, las enzimas fosfatidilinositol PLC de la invención pueden tener preferencia por fosfatidilinositol como sustrato.

En realizaciones alternativas, la actividad de fosfolipasa puede comprender ser específica para uno o más sustratos específicos, p. ej., una enzima de la invención puede tener una especificidad de acción por PE y PC; PE y PI; PE y PS; PS y PC; PS y PI; PI y PC; PS, PI y PC; PE, PI y PC; PC, PE y PS; PE, PS y PI; o, PE, PS, PI y PC, o una de sus combinaciones.

En casos alternativos una fosfolipasa de la invención puede tener actividad multifuncional, p. ej., una combinación de una o más de las actividades de enzimas descritas en la presente memoria. Por ejemplo, en un aspecto, un polipéptido de la invención es enzimáticamente activo, pero carece de una actividad de lipasa o carece de cualquier actividad que afecte a una fracción de aceite neutro (triglicérido). Puede ser conveniente usar dicho polipéptido en un procedimiento particular, p. ej., en un procedimiento de desgomado donde es importante no dañar (disminuir degradar, p. ej., hidrolizar) la fracción de aceite neutro. Por lo tanto, en un aspecto, la invención proporciona un procedimiento de desgomado que comprende el uso de un polipéptido de la invención que tiene actividad de fosfolipasa, pero no una actividad de lipasa.

Se describen en la presente memoria polipéptidos que tienen una actividad de enzima patatina que pueden usar una variedad de sustratos fosfolípidos que incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico, o una de sus combinaciones. Además, estas enzimas pueden tener grados variables de actividad sobre las formas de lisofosfolípido de estos fosfolípidos. Las patatinas descritas en la presente memoria se basan en una conservación de la similitud de secuencia de aminoácidos. En varios casos, estas enzimas presentan un conjunto diverso de propiedades bioquímicas y pueden llevar a cabo reacciones características de clases de enzimas PLA1, PLA2, PLC, o PLD. Las fosfolipasas PLD pueden usar una variedad de sustratos fosfolípidos que incluyen fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y ácido fosfatídico, o una de sus combinaciones. Además, estas enzimas pueden tener grados variables de actividad sobre las formas de lisofosfolípido de estos fosfolípidos. En un caso, estas enzimas son útiles para llevar a cabo reacciones de transesterificación para producir fosfolípidos estructurados.

En casos alternativos, los polipéptidos proporcionados en la presente memoria tienen una actividad que comprende la escisión de una unión éster glicerofosfato, la capacidad de hidrolizar enlaces éster fosfato, incluyendo actividad de patatina, lípido acil hidrolasa (LAH), fosfolipasa A, B, C y/o fosfolipasa D, o cualquiera de sus combinaciones.

Como se usa en la presente memoria, 1 unidad enzimática es la cantidad de una enzima que hay que añadir para hacer que una reacción procese 1 micromol de sustancia por minuto en condiciones especificadas.

En realizaciones alternativas, la invención proporciona polipéptidos con y sin secuencias señal, y las propias secuencias señal (p. ej., péptidos de secuencia señal aislados). También se proporcionan en la presente memoria fragmentos o subsecuencias de enzimas de la invención, p. ej., péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en dominio catalíticos ("sitios activos"), sitios de unión, dominios reguladores, epítopos, secuencias señal, preprodominios, y similares. También se describen en la presente memoria, fosfolipasas inmovilizadas, anticuerpos anti-fosfolipasas y sus fragmentos. También se describen en la presente memoria, heterocomplejos, p. ej., proteínas de fusión, heterodímeros, etc., que comprenden las fosfolipasas de la invención. La determinación de los péptidos que representan los sitios antigénicos de enzimas (epítopos), sitios activos, sitios de unión, secuencias señal, y similares, se puede hacer por protocolos de cribado rutinarios.

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

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

Se describen en la presente memoria composiciones, p. ej., que comprenden citrato sódico a pH neutro para hidratar los no hidratables. Se proporcionan en la presente memoria soluciones de citrato sódico en un intervalo de pH de entre aproximadamente 4 a 9, o, 5 a 8, o, 6 a 7, que se pueden usar para hidratar fosfolípidos no hidratables (que incluyen enzimas de la invención) en aceites con alto contenido de fósforo. En un aspecto, la hidratación de fosfolípidos no hidratables es por quelación del calcio y magnesio asociado con los fosfolípidos, permitiendo así que las sales de fosfolípidos insolubles anteriormente se repartan más fácilmente en la fase acuosa. En un aspecto, una

vez que los fosfolípidos se mueven a la interfase de agua/aceite o a la fase acuosa, una fosfolipasa de la invención (p. ej., una fosfohidrolasa específica de fosfolipasa de la invención), u otra fosfolipasa, convertirá el fosfolípido en diacilglicerol y un éster fosfato. En un aspecto, el contenido de metales magnesio y calcio disminuye tras la adición de ácido y producto cáustico (véase la descripción sobre procedimientos cáusticos).

Las enzimas de la invención son catalizadores muy selectivos. Como con otras enzimas, catalizan reacciones que son altamente estereo, regio y quimioselectivas que no tienen paralelo en la química sintética convencional. Además, las enzimas de la invención son notablemente versátiles. Se pueden diseñar para funcionar en disolvente orgánicos, operar a pH extremos (por ejemplo, pH altos y pH bajos), temperaturas extremas (por ejemplo, altas temperaturas y bajas temperaturas), niveles de salinidad extremos (por ejemplo, alta salinidad y baja salinidad), y catalizar reacciones con compuestos que no están estructuralmente relacionados con sus sustratos naturales fisiológicos. Las enzimas de la invención se pueden diseñar para ser reactivas hacia una amplia variedad de sustratos naturales y no naturales, permitiendo así la modificación de prácticamente cualquier compuesto orgánico principal. Las enzimas de la invención también se pueden diseñar para ser altamente enantioselectivas y regioselectivas. El grado alto de especificidad de grupo funcional que presentan estas enzimas, permite seguir cada reacción en una secuencia sintética que conduce a un nuevo compuesto activo. Las enzimas de la invención también se pueden diseñar para catalizar reacciones muy diversas no relacionadas con su función fisiológica natural en la naturaleza.

La presente invención explota las propiedades catalíticas útiles de enzimas. Aunque el uso de biocatalizadores (es decir, enzimas purificadas o brutas, células no vivas o vivas) en transformaciones químicas normalmente requiere la identificación de un biocatalizador particular que reaccione con un compuesto de partida específico. La presente invención usa biocatalizadores seleccionados, es decir, las enzimas de la invención, y las condiciones de reacción que son específicas para grupos funcionales que están presentes en muchos compuestos de partida. Cada biocatalizador es específico para un grupo funcional, o varios grupos funcionales relacionados, y pueden reaccionar con muchos compuestos de partida que contienen este grupo funcional. Las reacciones biocatalíticas producen una población de derivados a partir de un solo compuesto de partida. Estos derivados se pueden someter a otro ciclo de reacciones biocatalíticas para producir una segunda población de compuestos derivados. Se pueden producir miles de variaciones del compuesto original con cada iteración de derivatización biocatalítica.

Se proporcionan en la presente memoria métodos para identificar una enzima PLC activa individual en una biblioteca, donde la biblioteca se caracteriza por las series de reacciones biocatalíticas usadas para producirla, una llamada "historia biosintética". Uno comprende el cribado de la biblioteca en cuanto a actividades biológicas y el seguimiento de la historia biosintética identifica la secuencia de reacciones específicas que producen el compuesto activo. La secuencia de reacciones se puede repetir y determinar la estructura del compuesto sintetizado. En este caso, para este modo de identificación, no se requiere una tecnología de inmovilización; se pueden sintetizar y ensayar los compuestos libres en solución usando prácticamente cualquier tipo de ensayo de cribado. En este caso, el alto grado de especificidad de las reacciones enzimáticas en grupos funcionales permite el "seguimiento" de reacciones enzimáticas específicas que componen la biblioteca producida de forma biocatalítica.

Se describen en la presente memoria métodos para descubrir nuevas fosfolipasas usando ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos descritos en la presente memoria. En un caso, se criban bibliotecas de fagos lambda para descubrir fosfolipasas basándose en la expresión. El uso de bibliotecas de fagos lambda en el cribado permite la detección de clones tóxicos; acceso mejorado a sustrato; menor necesidad de modificación genética en un hospedante, eludiendo el potencial de cualquier sesgo que resulte de escisión de la masa de la biblioteca; y, crecimiento más rápido con bajas densidades de clones. El cribado de las bibliotecas de fagos lambda puede ser en fase líquida o en fase sólida. El cribado en fase líquida da mayor flexibilidad en condiciones de ensayo; flexibilidad de sustrato adicional; mayor sensibilidad para clones débiles; y facilidad de automatización frente al cribado en fase sólida.

En casos alternativos, se llevan a cabo etapas de procedimiento usando automatización robótica; p. ej., permitiendo la ejecución de muchos miles de reacciones biocatalíticas y ensayos de cribado al día, así como asegurando un nivel alto de precisión y reproducibilidad (véase la descripción sobre matrices, más adelante). Como resultado, se puede producir una biblioteca de compuestos derivados en cuestión de semanas. Para enseñanzas adicionales sobre la modificación de moléculas, incluyendo moléculas pequeñas véase el documento PCT/US94/09174.

Secuencias señal de fosfolipasas

Se describen en la presente memoria secuencias señal de fosfolipasas (p. ej., péptidos señal (SP)), p. ej., péptidos que comprenden secuencias señal y/o polipéptidos quiméricos, donde los péptidos o quimeras tiene una secuencia señal como se describe en la presente memoria. Se proporcionan en la presente memoria ácidos nucleicos que codifican estas secuencias señal (SP, p. ej., un péptido que tiene una secuencia que comprende/ consiste en restos terminales amino de un polipéptido de la invención). Se proporciona en la presente memoria una secuencia señal que comprende un péptido que comprende/ consiste en una secuencia como se expone en los restos 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24, 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 28, 1 a 30, 1 a 31, 1 a 32 o 1 a 33 de un polipéptido descrito en la presente memoria y que tiene una o más mutaciones como se exponen en las tablas 12 to 15, o uno de sus fragmentos enzimáticamente activos. Cualquiera de estos péptidos puede ser parte de una proteína quimérica, p. ej.,

una proteína recombinante. Un péptido señal se puede corresponder con otra enzima de la invención (p. ej., una fosfolipasa de la invención de la cual no se ha obtenido), o con otra fosfolipasa, o con cualquier polipéptido, como se describe con detalle más adelante.

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

En algunos aspectos, las fosfolipasas de la invención no tienen secuencias señal. En un aspecto, la invención proporciona las fosfolipasas de la invención que carecen de toda o parte de una secuencia señal. Se proporciona en la presente memoria una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal de una fosfolipasa operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico de una fosfolipasa diferente, u opcionalmente, puede ser deseable una secuencia señal de una proteína no fosfolipasa.

Dominios prepro, dominios de unión y dominios catalíticos de fosfolipasa

Además de las secuencias señal (p. ej., péptidos señal (SP)), como se ha descrito antes, se proporcionan en la presente memoria dominios prepro, dominios de unión (p. ej., dominio de unión al sustrato) y dominios catalíticos (CD). Los dominios de SP, dominio de unión, dominios prepro y/o CD se pueden ser péptidos sintéticos o recombinantes o pueden ser parte de una proteína de fusión, p. ej., como un dominio heterólogo en una proteína quimérica. Se proporcionan en la presente memoria ácidos nucleicos que codifican estos dominios catalíticos (CD) (p. ej., "sitios activos"), dominios prepro, dominios de unión y secuencias señal (SP, p. ej., un péptido que tiene una secuencia que comprende/ consiste en los restos amino terminales de un polipéptido de la invención).

Las secuencias señal de fosfolipasa (SP), dominios de unión, dominios catalíticos (CD) y/o secuencias prepro pueden ser péptidos aislados, o secuencias unidas a otra fosfolipasa o un polipéptido no fosfolipasa, p. ej., como una proteína de fusión (quimérica). En un caso, los polipéptidos que comprenden secuencias señal de fosfolipasa SP y/o prepro comprenden secuencias heterólogas de fosfolipasas de la invención (p. ej., una proteína de fusión que comprende una SP y/o prepro de la invención y secuencias de otra fosfolipasa o una proteína no fosfolipasa). En un caso, la invención proporciona fosfolipasas de la invención con secuencias CD, SP y/o prepro heterólogas, p. ej., secuencias con una secuencia señal de levadura. Una fosfolipasa de la invención puede comprender una CD, SP y/o prepro heteróloga en un vector, p. ej., un vector de la serie pPIC (Invitrogen, Carlsbad, CA).

En un caso, las secuencias CD, SP y/o prepro se identifican después de la identificación de polipéptidos fosfolipasa. Las rutas por las que las proteínas son separadas y transportadas a su sitio celular adecuado se denominan con frecuencia rutas de dirección de proteínas. Uno de los elementos más importantes en todos estos sistemas de dirección es una secuencia de aminoácidos corta en el extremo amino de un polipéptido recién sintetizado llamada secuencia señal. Esta secuencia señal dirige una proteína a su sitio adecuado en la célula y es eliminada durante el transporte o cuando la proteína llega a su destino final. La mayoría de las proteínas lisosomales, de membrana o secretadas tienen una secuencia señal amino terminal que las marca para la traslocación a la luz del retículo endoplásmico. Las secuencias señal pueden variar de longitud de 13 a 45 o más restos de aminoácidos. Los expertos en la técnica conocen diferentes métodos de reconocimiento de secuencias señal. Por ejemplo, en un aspecto, se identifican nuevos péptidos señal hidrolasa por un método denominado SignalP. SignalP usa una red neuronal combinada que reconoce tanto péptidos señal como sus sitios de escisión. (Nielsen, et al., "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites." *Protein Engineering*, vol. 10, no. 1, p. 1-6 (1997).

En algunos aspectos, una fosfolipasa de la invención puede no tener secuencias SP y/o prepro, y/o dominios catalíticos (CD). En un aspecto, la invención proporciona fosfolipasas que carecen de todo o parte de un dominio SP, CD y/o prepro. En un aspecto, la invención proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia señal (SP), CD y/o prepro de una fosfolipasa operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico de una fosfolipasa diferente u, opcionalmente, se puede desear una secuencia señal (SP), CD y/o prepro de una proteína no fosfolipasa.

Se describen en la presente memoria polipéptidos sintéticos o recombinantes, aislados, que comprenden secuencias señal (SP), dominio prepro y/o dominios catalíticos (CD) de la invención y secuencias heterólogas. Las secuencias heterólogas son secuencias no asociadas naturalmente (p. ej., a una fosfolipasa) con una SP, dominio prepro y/o CD. La secuencia a la que la SP, dominio prepro y/o CD no están naturalmente asociadas puede ser el extremo amino terminal, extremo carboxi terminal extremos de la SP, dominio prepro y/o CD, y/o ambos de la SP y/o CD. Se proporciona en la presente memoria un polipéptido sintético o recombinante aislado que comprende (o consiste en) un polipéptido que comprende una secuencia señal (SP), dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) de la invención con la condición de que no esté asociado con ninguna secuencia a la que está asociado naturalmente (p. ej., secuencia de fosfolipasa). De forma similar, se describen en la presente memoria ácidos nucleicos sintéticos o recombinantes, aislados, que codifican estos polipéptidos. Por lo tanto, en un caso, el ácido nucleico sintético o recombinante, aislado, comprende la secuencia codificante para una secuencia señal (SP), dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) y una secuencia heteróloga (es decir, una secuencia no asociada naturalmente con una secuencia señal (SP), dominio prepro y/o dominio catalítico (CD)). La secuencia heteróloga puede estar en el extremo 3', el extremo 5' y/o ambos extremos de la secuencia codificante SP, dominio prepro y/o CD.

Los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen fosfolipasas en una forma activa o inactiva. Por ejemplo, los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen proproteínas antes de “maduración” o procesamiento de secuencias prepro, p. ej., por una enzima de procesamiento de proproteína, tal como una proproteína convertasa para generar una proteína madura “activa”. Los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen fosfolipasas inactivas por otras razones, p. ej., antes de “activación” por suceso de procesamiento postraducciona, p. ej., una acción de endo o exopeptidasa o proteinasa, un suceso de fosforilación, una amidación, una glucosilación, una desglucosilación, una sulfatación, un suceso de dimerización, y/o similares. Los métodos para identificar las secuencias dominio “prepro”, CD, dominios de unión y secuencias señal son rutinarios y bien conocidos en la técnica, véase, p. ej., Van de Ven (1993) *Crit. Rev. Oncog.* 4(2):115-136; cribados de dos híbridos de levaduras para identificar interacciones de proteína-proteína, descritos p. ej., por Miller (2004) *Methods Mol. Biol.* 261:247-62; Heynink (2004) *Methods Mol. Biol.* 282:223-41, USPN 6.617.122; 6.190.874. Por ejemplo, para identificar una secuencia prepro la proteína se purifica del espacio extracelular y la secuencia de proteína N-terminal se determina y se compara con la forma no procesada.

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

Los polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen todas las formas activas, que incluyen subsecuencias activas p. ej., dominios catalíticos (CD) o sitios activos, de una enzima de la invención. Se proporcionan en la presente memoria dominios catalíticos o sitios activos como se expone más adelante. Se proporciona en la presente memoria un péptido o polipéptido que comprende o consiste en un dominio de sitio activo como se predice por el uso de una base de datos tal como Pfam (que es una gran colección de alineamientos de secuencias múltiples y modelos ocultos de Markov que cubren muchas familias de proteínas comunes, las bases de datos de familias de proteínas Pfam, A. Bateman, E. Birney, L. Cerruti, R. Durbin, L. Ewinger, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K.L. Howe, M. Marshall, y E.L.L. Sonnhammer, *Nucleic Acids Research*, 30(1):276-280, 2002) o equivalentes.

Se describen en la presente memoria subsecuencias N-terminales o C-terminales de la invención (p. ej., secuencias señal, secuencias prepro) con otros polipéptidos, proteínas activas o fragmentos de proteínas. La producción de una enzima de la invención (p. ej., enzima fosfolipasa C) también se puede lograr expresando la enzima como una proteína de fusión inactiva que es activada más tarde por un suceso de escisión proteolítica (usando una actividad de proteasa endógena o exógena, p. ej., tripsina) que produce la separación de la pareja de la proteína de fusión y la enzima madura, p. ej., la enzima fosfolipasa C. En un caso, la proteína de fusión se expresa a partir de una construcción de nucleótidos híbrida que codifica un solo marco de lectura abierto que contiene los siguientes elementos: la secuencia de nucleótidos para la proteína de fusión, una secuencia conectora (definida como una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos flexible que une dos dominios de proteína menos flexibles), sitio de reconocimiento de proteasas y la secuencia de la enzima madura (p. ej., cualquier enzima de la invención, p. ej., una fosfolipasa). En casos alternativos, la proteína de fusión puede comprender una secuencia de pectato liasa, una secuencia de ácido fosfatídico fosfatada, u otra secuencia, p. ej., una secuencia que se ha mostrado previamente que es expresada en exceso en un sistema hospedante de interés.

Se puede usar cualquier sistema hospedante (véase la descripción antes), por ejemplo, cualquier bacteria, p. ej., una bacteria Gram positiva, tal como *Bacillus*, o una bacteria Gram negativa, tal como *E. coli*, o cualquier levadura, p. ej., *Pichia pastoris*. La organización de las secuencias de nucleótidos en la construcción de nucleótidos química se puede determinar basándose en los niveles de expresión de proteínas logrados con cada construcción de fusión. Procediendo del extremo 5' de la construcción de nucleótidos al extremo 3' del cebador de la construcción, en un aspecto, la secuencia de nucleótidos se ensambla como sigue: secuencia señal/proteína de fusión/secuencia conectora/sitio de reconocimiento de escisión de proteasa/enzima madura (p. ej., cualquier enzima de la invención, p. ej., una fosfolipasa) o secuencia señal/secuencia pro/enzima madura/secuencia conectora/proteína de fusión. La expresión de la enzima (p. ej., cualquier enzima de la invención, p. ej., una fosfolipasa) como una proteína de fusión inactiva puede mejorar la expresión global de la secuencia de la enzima, puede reducir cualquier toxicidad potencial asociada con la sobreproducción de enzima activa y/o puede aumentar la vida en anaquel de la enzima antes de uso porque la enzima estaría inactiva hasta que la proteína de fusión, p. ej., pectato liasa se separe de la enzima, p. ej., proteína fosfolipasa.

Se proporcionan en la presente memoria formulaciones específicas para la activación de fosfolipasa de la invención expresada como una proteína de fusión. En un aspecto, la activación de la actividad de la fosfolipasa expresada inicialmente como una proteína de fusión inactiva se lleva a cabo usando una actividad proteolítica o potencialmente una actividad proteolítica en combinación con una peptidasa amino terminal o carboxilo terminal. Este suceso de activación se puede llevar a cabo en una variedad de formas y una variedad de puntos en el proceso de fabricación/almacenamiento antes de la aplicación en un desgomado de aceite. Los procedimientos de ejemplo incluyen: escisión por una actividad endógena expresada por el hospedante de fabricación tras la secreción de la construcción de fusión en el medio de fermentación; escisión por una actividad de proteasa endógena que es activada o se pone en contacto con la construcción de fusión expresada intracelularmente después de la ruptura de las células hospedantes; paso de la construcción de fusión bruta o purificada por una columna de actividad de

proteasa inmovilizada para llevar a cabo la escisión y activación de la enzima (p. ej., fosfolipasa de la invención, p. ej., una fosfolipasa C) antes de la formulación de la enzima; tratamiento de la construcción de fusión bruta o purificada con una fuente soluble de actividad proteolítica; activación de una fosfolipasa (p. ej., una fosfolipasa de la invención, p. ej., una fosfolipasa C) en el refinado del aceite usando una fuente soluble o insoluble de actividad proteolítica inmediatamente antes del uso en el procedimiento; y / o, activación de la actividad de fosfolipasa (p. ej., una fosfolipasa de la invención, p. ej., una fosfolipasa C) haciendo circular continuamente la formulación de la construcción de fusión a través de una columna de actividad de proteasa inmovilizada a temperatura reducida (por ejemplo, cualquiera entre aproximadamente 4°C y 20°C). Este suceso de activación se puede llevar a cabo antes de suministrar en el sitio de uso o puede ocurrir en el sitio en el refinado del aceite.

10 Glucosilación

Los péptidos y polipéptidos de la invención también se pueden glucosilar, por ejemplo, en un aspecto, comprenden al menos un sitio de glucosilación, p. ej., una glucosilación unida a N o unida a O. En un aspecto, el polipéptido se puede glucosilar después de ser expresado en *P. pastoris* o *S. pombe*. La glucosilación se puede añadir por mecanismos químicos o biosintéticos celulares, en donde estos últimos incorporan el uso de motivos de glucosilación conocidos, que pueden ser naturales para la secuencia o se pueden añadir como un péptido o añadir en la secuencia codificante de ácido nucleico.

Ensayos de actividad de fosfolipasa

Se proporcionan en la presente memoria polipéptidos sintéticos o recombinantes, aislados, (p. ej., enzimas, anticuerpos) que tienen una actividad de fosfolipasa o cualquier combinación de actividades de fosfolipasa y ácidos nucleicos que los codifican. Se puede usar cualquiera de los muchos ensayos de actividad de fosfolipasa conocidos en la técnica para determinar si un polipéptido tiene actividad de fosfolipasa y está dentro del alcance de la invención. Los protocolos rutinarios para determinar las actividades de fosfolipasa A, B, D y C, patatina y lípido acil hidrolasa, o actividad de lipasa, son bien conocidos en la técnica.

Los ejemplos de ensayos de actividad incluyen ensayos de turbidez, ensayos de metilumbeliferil fosfocolina (fluorescentes), ensayos de fosfolipasa con rojo Amlex (fluorescentes), ensayos de cromatografía de capa fina (TLC), ensayos citolíticos y ensayos de p-nitrofenilfosforilcolina. Usando estos ensayos, los polipéptidos, péptidos o anticuerpos se pueden cribar rápidamente para detectar una actividad de fosfolipasa.

La actividad de fosfolipasa puede comprender una actividad de una lípido acil hidrolasa (LAH). Véase, p. ej., Jimenez (2001) *Lipids* 36:1169-1174, que describe un ensayo micelar mixto basado en éter monodecílico del octaetilenglicol para determinar la actividad de lípido acil hidrolasa de una patatina. Pinsirodom (2000) *J. Agric. Food Chem.* 48:155-160, describe un ejemplo de actividad de lípido acil hidrolasa (LAH) patatina.

Los ensayos de turbidez se describen, p. ej., en Kauffmann (2001) "Conversion of *Bacillus thermocatenulatus* lipase into an efficient phospholipase with increased activity towards long-chain fatty acyl substrates by directed evolution and rational design," *Protein Engineering* 14:919-928; Ibrahim (1995) "Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*," *Infect. Immun.* 63:1993-1998.

Los ensayos de metilumbeliferil fosfocolina (fluorescentes) para determinar la actividad de fosfolipasa se describen, p. ej., en Goode (1997) "Evidence for cell surface and internal phospholipase activity in ascidian eggs," *Develop. Growth Differ.* 39:655-660; Diaz (1999) "Direct fluorescence-based lipase activity assay," *BioTechniques* 27:696-700.

Los ensayos de fosfolipasa de rojo Amplex (fluorescente) para determinar la actividad de fosfolipasa están disponibles como kits, p. ej., para la detección de la fosfolipasa específica de fosfatidilcolina usando un kit de ensayo de fosfolipasa específica de fosfatidilcolina de rojo Amplex de Molecular Probes Inc. (Eugene, OR), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La fluorescencia se mide en un lector de microplaca usando excitación a 560 ± 10 nm y detección de fluorescencia a 590 ± 10 nm. El ensayo es sensible a concentraciones muy bajas de enzima.

Los ensayos de cromatografía en placa fina (TLC) para determinar la actividad de fosfolipasa se describen, p. ej., en Reynolds (1991) *Methods in Enzymol.* 197:3-13; Taguchi (1975) "Phospholipase from *Clostridium novyi* type A.I," *Biochim. Biophys. Acta* 409:75-85. La cromatografía en capa fina (TLC) es una técnica ampliamente utilizada para detectar la actividad de la fosfolipasa. Se han usado diversas modificaciones de este método para extraer los fosfolípidos de las mezclas de ensayo acuosas. En algunos ensayos de PLC, la hidrólisis se detiene mediante la adición de cloroformo / metanol (2:1) a la mezcla de reacción. El material de partida sin reaccionar y el diacilglicerol se extraen en la fase orgánica y se pueden fraccionar por TLC, mientras que el producto de cabeza permanece en la fase acuosa. Para una medición más precisa de la digestión con fosfolípidos, se pueden usar sustratos radiomarcados (véase, p. ej., Reynolds (1991) *Methods in Enzymol.* 197:3-13). Las proporciones de productos y reaccionantes se pueden usar para calcular el número real de moles de sustrato hidrolizado por unidad de tiempo. Si todos los componentes son extraídos por igual, cualquier pérdida en la extracción afectará a todos los componentes por igual. La separación de productos de digestión de fosfolípidos se puede lograr por TLC en gel de sílice con cloroformo/metanol/agua (65: 25: 4) usando como un sistema solvente (véase, p. ej., Taguchi (1975) *Biochim. Biophys. Acta* 409:75-85).

Los ensayos de p-nitrofenilfosforilcolina para determinar la actividad de fosfolipasa se describen, p. ej., en Korbsrisate (1999) *J. Clin. Microbiol.* 37:3742-3745; Berka (1981) *Infect. Immun.* 34:1071-1074. Este ensayo se basa en la hidrólisis enzimática del sustrato análogo p-nitrofenilfosforilcolina para liberar un compuesto cromógeno amarillo, el p-nitrofenol, detectable a 405 nm. Este sustrato es conveniente para el cribado de alta capacidad.

- 5 Un ensayo citolítico puede detectar fosfolipasas con actividad citolítica basado en la lisis de eritrocitos. Las fosfolipasas tóxicas pueden interaccionar con membranas de células eucariotas e hidrolizar fosfatidilcolina y esfingomielina, conduciendo a la lisis celular. Véase, p. ej., Titball (1993) *Microbiol. Rev.* 57:347-366.

Fosfolipasas híbridas (quiméricas) y bibliotecas de péptidos

- 10 Se proporcionan en la presente memoria, fosfolipasas híbridas y proteínas de fusión, que incluyen bibliotecas de péptidos, que comprenden secuencias de la invención. Las bibliotecas de péptidos descritas en la presente memoria se pueden usar para aislar moduladores peptídicos (p. ej., activadores o inhibidores) de dianas, tales como sustratos de fosfolipasa, receptores, enzimas. Las bibliotecas de péptidos descritas en la presente memoria se pueden usar para identificar parejas de unión formales de dianas, tales como ligandos, p. ej., citoquinas, hormonas y similares. Se proporcionan en la presente memoria proteínas quiméricas que comprenden una secuencia señal (SP) y / o dominio catalítico (CD) de la invención y una secuencia heteróloga (véase más arriba).

- 15 Se describen en la presente memoria métodos para generar fosfolipasas "mejoradas" e híbridas que usan los ácidos nucleicos y polipéptidos de la invención. Se proporcionan en la presente memoria métodos para generar enzimas que tienen actividad, p. ej., actividad de fosfolipasa (tal como, p. ej., actividad de fosfolipasa A, B, C o D, actividad de esterasa patatina, escisión de un enlace éster de glicerofosfato, escisión de un enlace éster en un fosfolípido en un aceite vegetal) a pH alcalinos y/o pH ácidos extremos, temperaturas altas y bajas, condiciones osmóticas y similares. Se proporcionan en la presente memoria métodos para generar enzimas híbridas (p. ej., fosfolipasas híbridas).

- 25 Los métodos proporcionados en la presente memoria pueden producir polipéptidos híbridos nuevos usando procedimientos celulares que integran la secuencia de un primer polinucleótido de modo que resulten polinucleótidos híbridos que codifican polipéptidos que demuestran actividades derivadas de los primeros polipéptidos biológicamente activos. Por ejemplo, los primeros polinucleótidos pueden ser una secuencia de ácido nucleico de ejemplo que codifica una fosfolipasa de ejemplo de la invención. El primer ácido nucleico puede codificar una enzima de un organismo que funciona eficazmente en unas condiciones ambientales particulares, p. ej., alta salinidad. Se puede "integrar" con una enzima codificada por un segundo polinucleótido de un organismo diferente que funciona eficazmente en condiciones ambientales diferentes, tales como temperaturas extremadamente altas. Por ejemplo, cuando los dos ácidos nucleicos pueden producir una molécula híbrida p. ej., mediante recombinación y/o redistribución reductora. Un polinucleótido híbrido que contiene secuencias del primer y segundo polinucleótidos originales puede codificar una enzima que presenta características de ambas enzimas codificadas por los polinucleótidos originales. De este modo, la enzima codificada por el polinucleótido híbrido puede funcionar eficazmente en condiciones ambientales compartida por cada una de las enzimas codificadas por el primer y segundo polinucleótidos, p. ej., alta salinidad y temperaturas extremas.

- 40 Alternativamente, un polipéptido híbrido que resulta de este método puede presentar actividad enzimática especializada no presentada en las enzimas originales. Por ejemplo, después de recombinación y/o redistribución reductora de polinucleótidos que codifican actividades de fosfolipasa, el polipéptido híbrido resultante codificado por un polinucleótido híbrido se puede cribar para detectar actividades especializadas obtenidas de cada una de las enzimas originales, es decir, el tipo de enlace en el que actúa la fosfolipasa y la temperatura a la que funciona la fosfolipasa. Por lo tanto, por ejemplo, la fosfolipasa se puede cribar para determinar las funcionalidades químicas que distinguen a la fosfolipasa híbrida de las fosfolipasas originales, tales como (a) amida (enlaces peptídicos), es decir, fosfolipasas; (b) enlaces éster, es decir, fosfolipasas y lipasas; (c) acetales, es decir, glucosidasas, y por ejemplo, la temperatura, pH o concentración salina a la que funciona el polipéptido híbrido.

- 45 Se pueden aislar fuentes de polinucleótidos que se van a "integrar" con ácidos nucleicos de organismos individuales ("aislados"), colecciones de organismos que se han cultivado en medios definidos ("cultivos de enriquecimiento") u organismos no cultivados ("muestras ambientales"). El uso de un procedimiento independiente del cultivo para obtener polinucleótidos que codifican nuevas bioactividades a partir de muestras ambientales es más preferible, puesto que permite acceder a los recursos no explotados de la biodiversidad. Las "bibliotecas ambientales" se generan a partir de muestras ambientales y representan genomas colectivos de organismos que se encuentran de forma natural archivados en vectores de clonación que se pueden propagar en hosts procariotas adecuados. Debido a que el ADN clonado realmente se extrae inicialmente de muestras ambientales, las bibliotecas no están limitadas a la pequeña fracción de procariotas que se pueden cultivar en cultivo puro. Además, una normalización del ADN ambiental presente en estas muestras podría permitir una representación más equitativa del ADN de todas las especies presentes en la muestra original. Esto puede aumentar drásticamente la eficacia de encontrar genes de interés de constituyentes minoritarios de la muestra que pueden estar subrepresentados por varios órdenes de magnitud comparados con las especies dominantes.

Por ejemplo, se criban bibliotecas de genes generadas a partir de uno o más microorganismos no cultivados para detectar una actividad de interés. Las rutas potenciales que codifican moléculas bioactivas de interés se capturan primero en células procariotas en forma de bibliotecas de expresión génica. Los polinucleótidos que codifican actividades de interés se aíslan de las bibliotecas y se introducen en una célula hospedante. La célula hospedante se cultiva en condiciones que promueven la recombinación y/o redistribución reductora creando biomoléculas potencialmente activas con actividades nuevas o mejoradas.

Los microorganismos a partir de los cuales pueden prepararse polinucleótidos híbridos incluyen microorganismos procariotas, tales como *Eubacteria* y *Archaeobacteria*, y microorganismos eucarióticos inferiores tales como hongos, algunas algas y protozoos. Los polinucleótidos se pueden aislar de muestras ambientales. El ácido nucleico puede recuperarse sin cultivar un organismo o se puede recuperar de uno o más organismos cultivados. En un caso, dichos microorganismos pueden ser extremófilos, tales como hipertermófilos, psicrófilos, psicrotrofos, halófilos, barófilos y acidófilos. En un caso, los polinucleótidos que codifican enzimas fosfolipasa aisladas de microorganismos extremófilos se usan para producir enzimas híbridas. Dichas enzimas pueden funcionar a temperaturas superiores a 100°C en, p. ej., fuentes termales de tierra y fuentes termales de mar profundo, a temperaturas inferiores a 0°C en, p. ej., en aguas árticas, en entornos salinos saturados, de p. ej., el Mar Muerto, a valores de pH alrededor de 0 en, p. ej., depósitos de carbón y manantiales geotérmicos ricos en azufre, o a valores de pH superiores a 11 en, por ejemplo, lodo de alcantarillado. Por ejemplo, las fosfolipasas clonadas y expresadas a partir de organismos extremófilos pueden mostrar alta actividad en un amplio intervalo de temperaturas y pH.

Se introducen polinucleótidos seleccionados y aislados como se describe en la presente memoria, que incluyen al menos un ácido nucleico descrito en la presente memoria, en una célula hospedante adecuada. Una célula hospedante adecuada es cualquier célula que sea capaz de promover la recombinación y/o redistribución reductora. Los polinucleótidos seleccionados pueden estar en un vector que incluye secuencias de control adecuadas. La célula hospedante puede ser una célula eucariota superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariota inferior, tal como una célula de levadura, o preferiblemente, la célula hospedante puede ser una célula procariota, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula hospedante se puede realizar por transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano o electroporación (Davis et al., 1986).

Los hospedantes de ejemplo adecuados pueden ser cualquiera de las células hospedantes familiares para los expertos en la técnica, que incluyen células procariotas, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de mamífero, células de insecto o células vegetales. Las células bacterianas de ejemplo incluyen cualquier especie dentro de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, que incluyen, p. ej., *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Las células fúngicas de ejemplo incluyen cualquier especie de *Aspergillus*. Las células de levadura de ejemplo incluyen cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Schwanniomyces*, incluyendo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de insecto de ejemplo incluyen cualquier especie de *Spodoptera* o *Drosophila*, incluyendo *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Las células animales de ejemplo incluyen CHO, COS o melanoma de Bowes o cualquier línea de células de ratón o humanas. La selección de un hospedante adecuado está en la experiencia de los expertos en la técnica. La selección de un hospedante adecuado para la recombinación y/o redistribución reductora o solo para expresión de proteína recombinante se considera que está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de la presente memoria. Los sistemas de células de mamífero que se pueden usar para la recombinación y/o redistribución reductora o solo para expresión de proteína recombinante incluyen, p. ej., líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritos en "SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants" (Gluzman, 1981), las líneas de células C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender un origen de replicación, un promotor adecuado y potenciador, y sitios de unión al ribosoma necesarios, sitio de poliadenilación, sitios de donador y aceptor de corte y empalme, secuencias de terminación de la transcripción, y secuencias no transcritas flanqueadoras 5'. Las secuencias de ADN derivadas de los sitios de corte y empalme y poliadenilación de SV40 se pueden usar para proporcionar los elementos genéticos no transcritos requeridos.

Las células hospedantes que contienen los polinucleótidos de interés (para recombinación y/o redistribución reductora o simplemente para expresión de proteína recombinante) se pueden cultivar en medios nutrientes convencionales modificados según sea adecuado para activar promotores, seleccionar transformantes o amplificar genes. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula hospedante seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica. Los clones que se identifican como que tienen la actividad enzimática especificada se pueden secuenciar para identificar la secuencia de polinucleótidos que codifica una enzima que tiene actividad potenciada.

Los ácidos nucleicos y métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para generar nuevos polinucleótidos para rutas bioquímicas, p. ej., rutas desde uno o más operones o grupos de genes o porciones de los mismos. Por ejemplo, las bacterias y muchas eucariotas tienen un mecanismo coordinado para regular genes cuyos productos están involucrados en procesos relacionados. Los genes están agrupados, en estructuras denominadas "conjunto génico", en un único cromosoma y se transcriben juntos bajo el control de una única secuencia reguladora, que incluye un único promotor que inicia la transcripción de todo el grupo. Por lo tanto, un conjunto génico es un grupo de genes adyacentes que son idénticos o relacionados, generalmente en cuanto a su función.

El ADN de conjuntos génicos se puede aislar de diferentes organismos y ligar en vectores, en particular vectores que contienen secuencias reguladoras de la expresión que pueden controlar y regular la producción de una proteína detectable o actividad de matriz relacionada con la proteína de los conjuntos génicos ligados. El uso de vectores que tienen una capacidad excepcionalmente grande para la introducción de ADN exógeno es particularmente adecuado para usar con dichos conjuntos génicos y se describen a modo de ejemplo en la presente memoria, para incluir el factor *f* (o factor de fertilidad) de *E. coli*. Este factor *f* de *E. coli* es un plásmido que afecta a la transferencia de alta frecuencia de sí mismo durante la conjugación y es ideal para lograr y propagar establemente fragmentos de ADN grandes, tales como conjuntos génicos de muestras microbianas mixtas. Los "fósmidos", cósmidos o vectores cromosomas artificiales bacterianos (BAC) se pueden usar como vectores de clonación. Estos se obtienen del factor *f* de *E. coli* que es capaz de integrar de forma estable grandes segmentos de ADN genómico. Cuando se integra ADN a partir de una muestra ambiental no cultivada mixta, esto permite generar fragmentos genómicos grandes en forma de una "biblioteca de ADN ambiental". Los vectores cósmidos se diseñaron originalmente para clonar y propagar segmentos grandes de ADN genómico. La clonación en vectores cósmidos se describe con detalle en Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Una vez ligado en un vector adecuado, se pueden introducir dos o más vectores que contienen diferentes conjuntos génicos de policétido sintasa en una célula hospedante adecuada. Las regiones de homología de secuencia parcial compartidas por los conjuntos génicos promoverán procesos que den como resultado una reorganización de secuencia que da como resultado un conjunto génico híbrido. El conjunto génico híbrido nuevo se puede cribar entonces para detectar actividades mejoradas que no se encuentran en los conjuntos génicos originales.

Se proporciona en la presente memoria, un método para producir un polipéptido híbrido biológicamente activo que usa un ácido nucleico y criba el polipéptido de acuerdo con una actividad (p. ej., actividad potenciada) mediante:

(1) introducción de al menos un primer polinucleótido operativamente unido y un segundo polinucleótido operativamente unido, compartiendo dicho al menos primer polinucleótido y segundo polinucleótido al menos una región de homología de secuencia parcial, en una célula hospedante adecuada;

(2) cultivar la célula hospedante en condiciones que promueven la reorganización de secuencia que da como resultado un polinucleótido híbrido operativamente unido;

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

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

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

Los expertos en la técnica conocen métodos para cribar diferentes actividades enzimáticas y se describen a lo largo de la presente memoria descriptiva. Dichos métodos se pueden usar cuando se aíslan polipéptidos y polinucleótidos descritos en la presente memoria.

La redistribución *in vivo* se puede centrar en procesos "intermoleculares" denominados colectivamente como "recombinación". En las bacterias, generalmente se considera un fenómeno "dependiente de RecA". El método puede basarse en los procesos de recombinación de una célula hospedante para recombinar y redistribuir secuencias, o la capacidad de las células para mediar en procesos reductores para disminuir la complejidad de las secuencias casi repetidas en la célula por eliminación. Este proceso de "redistribución reductora" ocurre por un proceso "intramolecular" independiente de RecA. Por lo tanto, usando los ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, se generan polinucleótidos nuevos por el proceso de redistribución reductora. El método implica la generación de construcciones que contienen secuencias consecutivas (secuencias codificantes originales), su inserción en un vector adecuado y su posterior introducción en una célula hospedante adecuada. La redistribución de identidades moleculares individuales se produce por procesos combinatorios entre las secuencias consecutivas en la construcción que tienen regiones de homología, o entre unidades casi repetidas. El proceso de redistribución recombina y/o reduce la complejidad y extensión de las secuencias repetidas, y da como resultado la producción de nuevas especies moleculares.

Se pueden aplicar varios tratamientos para potenciar la velocidad de redistribución. Estos podrían incluir tratamiento con luz ultravioleta, o productos químicos que dañan el ADN, y/o el uso de líneas celulares hospedantes que presentan niveles potenciados de "inestabilidad genética". Por lo tanto, los procesos de redistribución pueden implicar recombinación homóloga de la propiedad natural de las secuencias casi repetidas para dirigir su propia evolución.

Las secuencias repetidas o "casi repetidas" tienen una función en la estabilidad genética. Las "casi repeticiones" son repeticiones que no están restringidas a su estructura unitaria original. Las unidades casi repetidas se pueden presentar en matrices de secuencias en una construcción; unidades consecutivas de secuencias similares. Una vez ligadas, las uniones entre secuencias consecutivas se vuelven esencialmente invisibles y la naturaleza casi repetitiva de la construcción resultante ahora es continua a nivel molecular. El proceso de eliminación que lleva a cabo la célula para reducir la complejidad de la construcción resultante opera entre secuencias casi repetidas. Las unidades casi repetidas proporcionan un repertorio prácticamente ilimitado de moldes en los que se pueden producir

sucesos de deslizamiento. Las construcciones que contienen casi repeticiones proporcionan así efectivamente suficiente elasticidad molecular de modo que los sucesos de eliminación (y potencialmente inserción) se pueden producir prácticamente en cualquier sitio dentro de las unidades casi repetitivas. Cuando las secuencias casi repetidas están todas ligadas en la misma orientación, por ejemplo, de cabeza a cola, o viceversa, la célula no puede distinguir unidades individuales. Por consiguiente, el proceso reductor puede producirse a lo largo de todas las secuencias. En cambio, cuando, por ejemplo, las unidades se presentan cabeza a cabeza, en lugar de cabeza a cola, la inversión delinea puntos finales de la unidad adyacente de modo que la formación de eliminación favorecerá la pérdida de unidades discretas. Por lo tanto, las secuencias que se van a redistribuir están en la misma orientación. La orientación aleatoria de secuencias casi repetidas dará como resultado la pérdida de eficacia de la redistribución, mientras que la orientación uniforme de las secuencias ofrecerá la mayor eficacia. Sin embargo, aunque el tener menos de las secuencias contiguas en la misma orientación disminuye la eficacia, todavía puede proporcionar suficiente elasticidad para la recuperación eficaz de nuevas moléculas. Las construcciones se pueden hacer con secuencias casi repetidas en la misma orientación para permitir la mayor eficacia.

Las secuencias se pueden ensamblar en la orientación de cabeza a cola usando cualquiera de una variedad de métodos, que incluyen los siguientes: a) Cebadores que incluyen una cabeza de poli-A y cola de poli-T que cuando se hacen monocatenarios proporcionarían la orientación que se puede usar. Esto se lleva a cabo teniendo primero algunas bases de los cebadores hechas a partir de ARN y por lo tanto fácilmente eliminadas por RNasa H. b) Cebadores que incluyen sitios de escisión de restricción únicos que se pueden usar. Se requerirían múltiples sitios, una batería de secuencias únicas, y etapas de síntesis y ligado repetidas. c) Las pocas bases interiores del cebador se podrían tiliar y usar una exonucleasa para producir moléculas adecuadamente diseñadas.

La recuperación de las secuencias redistribuidas se basa en la identificación de vectores de clonación con un índice repetitivo reducido (RI). Las secuencias de codificación redistribuidas se pueden recuperar entonces mediante amplificación. Los productos son re-clonados y expresados. La recuperación de vectores de clonación con RI reducido se puede realizar por: 1) El uso de vectores solo mantenidos establemente cuando la construcción se reduce en complejidad. 2) La recuperación física de vectores acortados mediante procedimientos físicos. En este caso, el vector de clonación se habría recuperado usando procedimientos de aislamiento de plásmidos convencionales y se habría fraccionado el tamaño en un gel de agarosa o en una columna con un corte de exclusión de peso molecular bajo usando procedimientos convencionales. 3) La recuperación de vectores que contienen genes interrumpidos que pueden seleccionarse cuando disminuye el tamaño del inserto. 4) El uso de técnicas de selección directa con un vector de expresión y la selección apropiada.

Las secuencias codificantes (por ejemplo, genes) de organismos relacionados pueden demostrar un alto grado de homología y codificar bastantes productos proteicos diversos. Estos tipos de secuencias son particularmente útiles como casi repeticiones. Sin embargo, este proceso no está limitado a dichas casi repeticiones idénticas.

Lo siguiente es un método de ejemplo. Las secuencias de ácido nucleico codificantes (casi repeticiones= se obtienen a partir de tres (3) especies. Cada secuencia codifica una proteína con un conjunto distinto de propiedades, que incluyen la enzima de la invención. Cada una de las secuencias difiere en un solo o unos pocos pares de bases en una posición única en la secuencia. Las secuencias casi repetidas se amplifican por separado o colectivamente y se ligan en ensamblados aleatorios de modo que están disponibles todas las posibles permutaciones y combinaciones en la población de moléculas ligadas. El número de unidades casi repetidas se pueden controlar por las condiciones de ensamblaje. El número medio de unidades casi repetidas en una construcción se define por el índice repetitivo (RI). Una vez formadas, las construcciones se pueden, o no, fraccionar por tamaños en un gel de agarosa de acuerdo con protocolos publicados, insertar en un vector de clonación, y transfectar en una célula hospedante adecuada. Después las células se propagan y se realiza la "redistribución reductora". La tasa de la redistribución reductora se puede estimular por la introducción de daño al ADN si se desea. El que la reducción en RI sea mediada por la formación de eliminación entre secuencias repetidas por un mecanismo "intramolecular", o se mediado por sucesos de tipo recombinación por mecanismos "intermoleculares" es poco importante. El resultado final es la redistribución de moléculas en todas las posibles combinaciones. En un caso, el método comprende la etapa adicional de cribar los miembros de la biblioteca del conjunto barajado, para identificar miembros de la biblioteca barajada individual que tiene la capacidad de unirse o interaccionar de otra forma, o catalizar una reacción particular (p. ej., tal como dominio catalítico de una enzima) con una macromolécula predeterminada, tal como por ejemplo un receptor proteico, un oligosacárido, virión u otro compuesto o estructura predeterminada. Los polipéptidos, p. ej., fosfolipasas, que se identifican de dichas bibliotecas se pueden usar para diferentes fines, p. ej., los procedimientos industriales descritos en la presente memoria y/o se pueden someter a uno o más ciclos adicionales de barajado y/o selección.

En otro caso, se prevé que, antes o durante la recombinación o redistribución, los polinucleótidos generados por el método descrito en la presente memoria, se puedan someter a agentes o procedimientos que promuevan la introducción de mutaciones en los polinucleótidos originales. La introducción de dichas mutaciones aumentaría la diversidad de polinucleótidos híbridos y polipéptidos resultantes codificados por los mismos resultantes. Los agentes o procedimiento que promueven la mutagénesis pueden incluir, pero no se limitan a: (+)-CC-1065, o un análogo sintético tal como (+)-CC-1065-(N3-Adenina (Véase, Sun y Hurley, (1992); un aducto de 4'-fluro-4-aminobifenilo N-acetilado o desacetilado capaz de inhibir la síntesis de ADN (véase, por ejemplo, van de Poll et al. (1992)); o un aducto de 4-aminobifenilo N-acetilado o desacetilado capaz de inhibir la síntesis de ADN (véase también, van de Poll

et al. (1992), pág. 751-758); cromo trivalente, una sal de cromo trivalente, un aducto de hidrocarburo aromático policíclico (PAH) y ADN capaz de inhibir la replicación del ADN, tal como el 7-bromometil-benz[a]antraceno ("BMA"), tris(2,3-dibromopropil)fosfato ("Tris-BP"), 1,2-dibromo-3-cloropropano ("DBCP"), 2-bromoacroleína (2BA), benzo[a]pireno-7,8-dihidrodiol-9-10-epóxido ("BPDE"), una sal de platino(II)- halógeno, N-hidroxi-2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]-quinolina ("N-hidroxi-IQ"), y N-hidroxi-2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-f]-piridina ("N-hidroxi-PhIP"). Los medios especialmente preferidos para ralentizar o detener la amplificación por PCR consisten en luz UV, (+)-CC-1065 y (+)-CC-1065-(N3-Adenina). Los medios abarcados en particular son aductos de ADN o polinucleótidos que comprenden los aductos de ADN de los polinucleótidos o grupos de polinucleótidos, que se pueden liberar o separar por un procedimiento que incluye calentar la solución que comprende los polinucleótidos antes del procesamiento posterior.

Metodologías de cribado y dispositivos de vigilancia "en línea"

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

Soportes sólidos de enzimas inmovilizadas

Las enzimas fosfolipasa, fragmentos de las mismas y ácidos nucleicos que codifican las enzimas y fragmentos pueden fijarse a un soporte sólido. Esto es a menudo económico y eficiente en el uso de las fosfolipasas en procedimientos industriales. Por ejemplo, un consorcio o cóctel de enzimas fosfolipasa (o fragmentos activos de los mismos), que se usan en una reacción química específica, se puede unir a un soporte sólido y sumergirlo en una cuba de proceso. La reacción enzimática puede producirse. Después, el soporte sólido puede sacarse de la cuba, junto con las enzimas fijadas en el mismo, para un uso repetido. En un caso, se fija un ácido nucleico aislado a un soporte sólido. En otro caso, el soporte sólido se selecciona del grupo de un gel, una resina, un polímero, un material cerámico, un vidrio, un microelectrodo y cualquier combinación de los mismos.

Por ejemplo, los soportes sólidos pueden incluir geles. Algunos ejemplos de geles incluyen Sepharose, gelatina, glutaraldehído, glutaraldehído tratado con chitosán, albúmina-glutaraldehído, chitosán-Xantana, gel toyopearl (gel polimérico), alginato, alginato-polilisina, carragenano, agarosa, glioxil-agarosa, agarosa magnética, dextranagarosa, hidrogel de poli(carbamoil-sulfonato), hidrogel de BSA-PEG, poli(alcohol vinílico) fosforilado (PVA), monoaminoetil-N-aminoetilo (MANA), amino, o cualquiera de sus combinaciones.

Otro soporte sólido puede ser resina o polímeros. Los ejemplos de resinas o polímeros incluyen celulosa, acrilamida, nailon, rayón, poliéster, resina de intercambio aniónico, AMBERLITE™ XAD-7, AMBERLITE™ XAD-8, AMBERLITE™ IRA-94, AMBERLITE™ IRC-50, polivinilo, poliacrílico, polimetacrilato, o cualquiera de sus combinaciones.

Otro tipo de soporte sólido puede ser cerámico. Algunos ejemplos incluyen material cerámico no poroso, cerámico poroso, SiO₂, Al₂O₃. Otro tipo de soporte sólido puede ser vidrio. Algunos ejemplos incluyen vidrio no poroso, vidrio poroso, vidrio de aminopropilo, o cualquiera de sus combinaciones. Otro tipo de soporte sólido que se puede usar es un microelectrodo. Un ejemplo es magnetita recubierta de polietilenimina. Se pueden usar partículas gráficas como un soporte sólido.

Otros soportes sólidos de ejemplo que se pueden usar comprenden productos de tierra de diatomeas y silicatos. Algunos ejemplos incluyen CELITE® KENITE®, DIACTIV®, PRIMISIL®, DIAFIL® diatomites y MICRO-CEL®, CALFLO®, SILASORB™, y CELKATE® silicatos de calcio y magnesio sintéticos. Otro ejemplo de un soporte sólido es una célula, tal como un glóbulo rojo.

Métodos de inmovilización

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

Matrices capilares

Se pueden usar matrices capilares, tales como GIGAMATRIX™, Diversa Corporation, San Diego, CA, can en los métodos descritos en la presente memoria. Se pueden inmovilizar ácidos nucleicos o polipéptidos o aplicar en una matriz, que incluye matrices capilares. Las matrices se pueden usar para el cribado y vigilancia de bibliotecas de

composiciones (p. ej., moléculas pequeñas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) según su capacidad para unirse o modular la actividad de un ácido nucleico o un polipéptido. Las matrices capilares proporcionan otro sistema para mantener y cribar muestras. Por ejemplo, un aparato de cribado de muestras puede incluir una pluralidad de capilares formados en una matriz de capilares adyacentes, en donde cada capilar comprende al menos una pared que define una luz para retener una muestra. El aparato puede incluir además material intersticial dispuesto entre capilares adyacentes en la matriz, y uno o más indicios de referencia formados dentro del material intersticial. Un capilar para cribar una muestra, en donde el capilar está adaptado para estar unido en una matriz de capilares, puede incluir una primera pared que define una luz para retener la muestra, y una segunda pared formada de un material filtrante, para filtrar la energía de excitación proporcionada a la luz, para excitar la muestra.

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

La matriz de capilares puede incluir una pluralidad de capilares individuales que comprenden al menos una pared exterior que define una luz. La pared exterior del capilar puede ser una o más paredes fusionadas juntas. De forma similar, la pared puede definir la luz que es cilíndrica, cuadrada, hexagonal o de cualquier otra forma geométrica con la condición de que las paredes formen una luz para la retención de un líquido o muestra. Los capilares de la matriz de capilares pueden mantener muy próximos entre sí para formar una estructura planar. Los capilares pueden estar unidos entre sí, estando fusionados (p. ej., donde los capilares están hechos de vidrio), pegados, enlazados o sujetados lado a lado. La matriz de capilares puede estar formada por cualquier número de capilares individuales, por ejemplo, en el intervalo de 100 a 4.000.000 capilares. Una matriz de capilares puede formar una placa de microvaloración que tiene aproximadamente 100.000 o más capilares individuales unidos entre sí.

Matrices o "biochips"

Los ácidos nucleicos o polipéptidos se pueden inmovilizar o aplicar a una matriz. Las matrices se pueden usar para el cribado o control de bibliotecas de composiciones (p. ej., moléculas pequeñas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) por su capacidad para unirse a o modular la actividad de un ácido nucleico o polipéptido. Por ejemplo, en un caso, un parámetro controlado es la expresión del transcrito de un gen de fosfolipasa. Uno o más, o todos los transcritos de una célula se pueden medir por hibridación de una muestra que comprende transcritos de la célula, o ácidos nucleicos representativos o complementarios de transcritos de una célula, mediante hibridación con ácidos nucleicos inmovilizados en una matriz, o "biochip". Al usar una "matriz" de ácidos nucleicos en un microchip, algunos o todos los transcritos de una célula se pueden cuantificar simultáneamente. Alternativamente, se pueden usar matrices que comprenden el ácido nucleico genómico para determinar el genotipo de una cepa modificada genéticamente nueva por los métodos descritos en la presente memoria. Las "matrices de polipéptidos" también se pueden usar para cuantificar una pluralidad de proteínas.

También se proporcionan en la presente memoria "matrices" o "micromatrices" o "biochips" o "chips" que comprenden una pluralidad de elementos objetivo, donde cada elemento objetivo puede comprender una cantidad definida de uno o más polipéptidos (incluyendo anticuerpos) o ácidos nucleicos inmovilizados sobre un área definida de una superficie de sustrato, y al menos un ácido nucleico y/o polipéptido es un ácido nucleico y/o polipéptido descrito en la presente memoria.

El método se puede poner en práctica con, o puede comprender, cualquier "matriz" conocida también denominada una "micromatriz" o "matriz de ácidos nucleicos" o "matriz de polipéptidos" o "matriz de anticuerpos" o "biochip" o variaciones de los mismos. Las matrices genéricamente son una pluralidad de "manchas" o "elementos objetivo", comprendiendo cada elemento objetivo una cantidad definida de una o más moléculas biológicas, p. ej., oligonucleótidos, inmovilizados sobre un área definida de una superficie del sustrato para la unión específica a una molécula de muestra, p. ej., transcritos de ARNm.

En la práctica de los métodos descritos en la presente memoria, cualquier matriz y/o método conocido para hacer y usar matrices se puede incorporar todo o en parte, o sus variaciones, como se describe, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 6,277,628; 6,277,489; 6,261,776; 6,258,606; 6,054,270; 6,048,695; 6,045,996; 6,022,963; 6,013,440; 5,965,452; 5,959,098; 5,856,174; 5,830,645; 5,770,456; 5,632,957; 5,556,752; 5,143,854; 5,807,522; 5,800,992; 5,744,305; 5,700,637; 5,556,752; 5,434,049; véase también, p. ej., WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; véase también, p. ej., Johnston (1998) *Curr. Biol.* 8:R171-R174; Schummer (1997) *Biotechniques* 23:1087-1092; Kern (1997) *Biotechniques* 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) *Genes, Chromosomes & Cancer* 20:399-407; Bowtell (1999) *Nature Genetics* Supp. 21:25-32. Véase también las solicitudes de patentes de

EE.UU. publicadas nº 20010018642; 20010019827; 20010016322; 20010014449; 20010014448; 20010012537; 20010008765.

Anticuerpos y métodos de cribado basados en anticuerpos

5 Se proporcionan en la presente memoria anticuerpos sintéticos o recombinantes, aislados, que se unen específicamente a una fosfolipasa de la invención. Estos anticuerpos pueden usarse para aislar, identificar o cuantificar las fosfolipasas de la invención o polipéptidos relacionados. Estos anticuerpos pueden usarse para inhibir la actividad de una enzima de la invención. Estos anticuerpos pueden usarse para polipéptidos aislados relacionados con los de la invención, p. ej., enzimas fosfolipasas relacionadas.

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

20 Los anticuerpos pueden usarse en inmunoprecipitación, tinción (p. ej., FACS), columnas de inmuoafinidad y similares. Si se desea, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican antígenos específicos se pueden generar mediante inmunización seguida de aislamiento del polipéptido o ácido nucleico, amplificación o clonación e inmovilización de polipéptido en una matriz.

Alternativamente, los métodos descritos en la presente memoria pueden usarse para modificar la estructura de un anticuerpo producido por una célula que se va a modificar, p. ej., la afinidad de un anticuerpo puede aumentarse o reducirse. Además, la capacidad para producir o modificar anticuerpos puede ser un fenotipo diseñado en una célula mediante los métodos descritos en la presente memoria.

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

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

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

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

55 Los anticuerpos policlonales generados contra los polipéptidos de la invención se pueden obtener mediante inyección directa de los polipéptidos en un animal o administrando los polipéptidos a un animal, por ejemplo, un ser no humano. El anticuerpo así obtenido se unirá al propio polipéptido. De esta manera, incluso una secuencia que codifica solo un fragmento del polipéptido se puede usar para generar anticuerpos que pueden unirse al polipéptido

natural completo. Dichos anticuerpos se pueden usar entonces para aislar el polipéptido de las células que expresan ese polipéptido.

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

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, p. ej., la patente de EE.UU. N° 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios contra los polipéptidos de la invención. Alternativamente, se pueden usar ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados contra estos polipéptidos o fragmentos de los mismos.

Los anticuerpos generados contra los polipéptidos de la invención se pueden usar en el cribado de polipéptidos similares de otros organismos y muestras. En dichas técnicas, los polipéptidos del organismo se ponen en contacto con el anticuerpo y se detectan aquellos polipéptidos que se unen específicamente al anticuerpo. Cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente se puede usar para detectar la unión de anticuerpos.

Kits

Se proporcionan en la presente memoria kits que comprenden las composiciones, p. ej., ácidos nucleicos, casetes de expresión, vectores, células, polipéptidos (p. ej., un kit que tiene al menos una fosfolipasa de la invención) y/o anticuerpos (p. ej., un kit que tiene al menos un anticuerpo proporcionado en la presente memoria). Los kits pueden contener enzimas para el procesamiento (fabricación) de biocombustibles, detergentes, o para tratar o procesar alimentos, piensos, biomasa, alimentos o aditivos alimentarios o suplementos nutricionales, y similares. Los kits también pueden contener material de instrucciones que enseñe las metodologías y usos industriales de la invención, como se describe en la presente memoria.

Usos industriales y médicos de las enzimas de la invención

Se describen en la presente memoria muchos usos industriales y aplicaciones médicas que usan polipéptidos descritos en la presente memoria, p. ej., fosfolipasa y otras enzimas descritas en la presente memoria, por ejemplo, fosfolipasas A, B, C y D, patatinas, que incluyen convertir un fosfolípido no hidratable en una forma hidratable, fabricar biocombustibles y procesar biomasa, desgomado de aceite, procesamiento de aceites vegetales, de pescado, algas y similares, por nombrar solo algunas aplicaciones. En cualquiera de estos usos industriales alternativos y aplicaciones médicas, se pueden añadir enzimas en un orden específico, p. ej., se añaden fosfolipasas con diferentes especificidades en un orden específico, p. ej., se añade primero una enzima con actividad de hidrólisis de PC y PE (o se añaden dos enzimas, una con actividad de hidrólisis de PC y otra con actividad de hidrólisis de PE), después se añade una enzima con actividad de hidrólisis de PI (p. ej., actividad de PLC o PI-PLC), o cualquiera de sus combinaciones.

Cualquiera o todos los métodos de la invención se pueden usar en una "escala de procedimiento", por ejemplo, un procedimiento de aceite o refinado en una escala de aproximadamente 6.804; 11.340; 22.680; 34.019; 45.359 kg (15.000; 25.000; 50.000; 75.000; o 100.000 lbs) de aceite refinado/día hasta aproximadamente 0,45, 0,91, 1,36, 1,81, 2,27, 2,72 o más millones de kg (1, 2, 3, 4, 5 o 6 o más millones de lbs) de aceite refinado/día.

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

Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para procesar aceites vegetales y fosfolípidos tales como los derivados del salvado de arroz, soja, canola, palma, semilla de algodón, maíz, palmiste, coco, cacahuete, sésamo, girasol. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para procesar aceites esenciales, p. ej., aceites de semillas de frutas, p. ej., semilla de uva, albaricoque, borraja, etc. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para procesar aceites y fosfolípidos en diferentes formas, incluyendo formas en bruto, desgomadas, gomas, agua de lavado, arcilla, sílice, borras de neutralización, y similares. Los fosfolípidos se pueden usar para procesar aceites con alto contenido de fósforo, aceites de pescado, aceites animales, aceites vegetales, aceites de algas y similares. En cualquier caso, cada vez que se puede usar una fosfolipasa C, una alternativa comprende el uso de una fosfolipasa D y una fosfatasa (p. ej., usando una combinación de PLD/fosfatasa para mejorar el rendimiento en un aceite con alto contenido de fósforo, tal como un aceite de soja).

Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para procesar y fabricar aceites comestibles, aceites de biodiesel, liposomas para productos farmacéuticos y cosméticos, fosfolípidos estructurados y lípidos estructurados. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en extracción de aceite. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para procesar y fabricar diversos jabones.

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

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

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

La invención proporciona procedimientos que usan la(s) enzima(s) de la invención para preparar y procesar aceites comestibles, incluida la generación de aceites comestibles con cantidades mayores de 1,3-DAG. Los diacilgliceroles son compuestos naturales que se encuentran en muchos aceites comestibles. En un aspecto de un método de la invención, p. ej., el procedimiento de desgomado de aceite, una base (producto cáustico) causa la isomerización de 1,2-DAG, producido por la PLC, en 1,3-DAG, lo que proporciona un beneficio nutricional para la salud frente al 1, 2-DAG, por ejemplo, el 1,3-DAG se quema como energía en lugar de almacenarse como grasa (como lo hace el 1,2-DAG). Al añadir la PLC en el extremo frontal del procedimiento de refinado cáustico (y el ácido y el cáustico posteriormente), los métodos de la invención generan un nivel elevado de 1,3-DAG (disminuyendo el 1,2-DAG). Nutricionalmente, el 1,3-DAG es mejor para usted que el 1,2-DAG. En aspectos alternativos, la invención comprende un procedimiento de desgomado de aceite que usan una PLC de la invención, por el cual el producto de aceite desgomado final contiene no menos de 0,5%, 1,0%, 2,0% o 3,0% o más de 1,3-DAG.

Por lo tanto, se proporciona en la presente memoria un procedimiento para hacer (mediante interesterificación) un aceite refinado (p. ej., un aceite de diacilglicerol), incluidos aceites comestibles, que contiene niveles aumentados de 1,3-diacilglicerol (1,3-DAG), donde una fosfolipasa, tal como como una enzima de la invención, se "carga frontalmente" o se añade antes de la adición de ácido o producto caustico. La generación por hidrólisis enzimática de un DAG a partir de un triglicérido genera por interesterificación 1,3-DAG a partir de 1,2-DAG. El aceite comestible que comprende 1,3-DAG muestra diferentes efectos metabólicos en comparación con los aceites comestibles convencionales. Las diferencias en las rutas metabólicas entre 1,3-DAG y 1,2-DAG o triglicéridos permiten que una mayor parte de ácidos grasos del 1,3-diacilglicerol se queme como energía en lugar de almacenarse como grasa. Los estudios clínicos han demostrado que el consumo regular de aceite DAG como parte de una dieta sensata puede ayudar a las personas a controlar su peso corporal y su grasa corporal. Además, el metabolismo del 1,3-DAG reduce los triglicéridos posprandiales circulantes en el torrente sanguíneo. Dado que la obesidad y los niveles elevados de lípidos en la sangre se asocian como factores de riesgo de enfermedades crónicas, incluidas las enfermedades cardiovasculares y la diabetes tipo II, estas condiciones de salud relacionadas con el estilo de vida pueden verse afectadas de una manera beneficiosa con el consumo regular de aceites DAG.

El consumo de aceite que comprende DAG puede tener lugar a través de una variedad de medios. Por lo tanto, se proporciona en la presente memoria un procedimiento que usa una enzima de la invención para preparar un alimento, p. ej., un producto horneado, que tiene niveles mayores de 1,3-DAG diacilglicerol y productos horneados que comprenden aceites de diacilglicerol. En un caso, los productos horneados son galletas, pasteles y productos horneados similares.

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

PLC + PI-PLC + PLA (PLA añadido después de la finalización de las reacciones del PLC);

PLD + fosfatasa + PI-PLC seguido de PLA; o,

PLC o (PLC + PI-PLC) + PLA específico para ácido fosfatídico (todas las enzimas añadidas juntas o secuencialmente).

Desgomado de aceite y procesamiento de aceite vegetal

Las enzimas de la invención (p. ej., polipéptidos de la invención que tienen actividad de lipasa, fosfolipasa, esterasa y/o glicosidasa o actividad equivalente) se pueden usar en diversas etapas del procesamiento de aceite vegetal, tales como en la extracción de aceite vegetal, particularmente, en la eliminación de "las gomas de fosfolípidos" en un procedimiento llamado "desgomado de aceite".

Estos procedimientos de la invención se pueden usar en una "escala de procedimiento", por ejemplo, en una escala de aproximadamente 6.804; 11.340; 22.680; 34.019; 45.359 kg (15.000; 25.000; 50.000; 75.000; o 100.000 lbs) de aceite refinado/día hasta aproximadamente 0,45, 0,91, 1,36, 1,81, 2,27, 2,72 o más millones de kg (1, 2, 3, 4, 5 o 6 o más millones de lbs) de aceite refinado/día.

- 5 En un aspecto, la invención proporciona procedimientos de desgomado de aceite que comprenden el uso de una fosfolipasa de la invención, p. ej., una PI-PLC de la invención. En un aspecto, el procedimiento comprende además la adición de otra fosfolipasa, p. ej., otra PLC, una PLA, una PLB, una PLB o una patatina o una enzima que tiene una actividad de lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA) o actividad de lisofosfolipasa (LPL) y lisofosfolipasa-transacilasa (LPTA), o una combinación de las mismas, y/o una fosfolipasa tipo patatina. En un aspecto, todas las enzimas se
10 añaden juntas, o, como alternativa, las enzimas se añaden en un orden específico, p. ej., a la adición de PLC le sigue la adición de PLA y/o patatina; o, se añade primero una enzima o enzimas que tienen actividad de PC y PE, y después se añade en segundo lugar la PI PLC.

- En un aspecto, este procedimiento proporciona una mejora en el rendimiento como resultado del tratamiento con fosfolipasa (p. ej., PLC de la invención). En un aspecto, este procedimiento proporciona una disminución adicional
15 del contenido de fósforo del aceite como resultado del tratamiento con fosfolipasa (p. ej., PLA).

- En un aspecto, la invención proporciona procedimientos que comprenden el uso de una fosfolipasa de la invención, p. ej., una PLC o una PI-PLC de la invención, para reducir la masa de goma y aumentar la ganancia de aceite neutro (triglicéridos) a través del atrapamiento de aceite reducido. En un aspecto, la invención proporciona procedimientos que comprenden el uso de una fosfolipasa de la invención, p. ej., una PLC de la invención, p. ej., una PI-PLC de la
20 invención, para aumentar la producción de aceites neutros y diacilglicerol (DAG) para contribuir a la fase de aceite. En aspectos alternativos, los procedimientos de la invención (p. ej., procedimientos de desgomado) pueden comprender una o más enzimas adicionales tales como una proteasa, una amilasa, una lipasa, una cutinasa, otra fosfolipasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanas, una oxidasa, p. ej., una lactasa y/o una peroxidasa, o polipéptidos con actividad equivalente, o una de sus
25 combinaciones.

- Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en diversas etapas de procesamiento de aceite vegetal, tales como en la extracción de aceite vegetal, particularmente, en la eliminación de "gomas de fosfolípidos" en un procedimiento denominado "desgomado de aceite", como se ha descrito anteriormente. La invención proporciona métodos para procesar aceites vegetales de diversas fuentes, tales como salvado de arroz, soja, colza, cacahuetes y otras nueces, sésamo, girasol, palma y maíz. Los métodos se pueden usar junto con procedimientos basados en la extracción con hexano, con el posterior refinado de los extractos brutos a aceites comestibles, que incluyen el uso de los métodos y
30 enzimas de la invención. El primer paso en la secuencia de refinado es el llamado procedimiento de "desgomado", que sirve para separar los fosfátidos mediante la adición de agua. El material precipitado por el desgomado se separa y procesa adicionalmente a mezclas de lecitinas. Las lecitinas comerciales, tales como la lecitina de soja y lecitina de girasol, son materiales semisólidos o muy viscosos. Consisten en una mezcla de lípidos polares, principalmente fosfolípidos y aceite, principalmente triglicéridos.

- Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en cualquier procedimiento de "desgomado", incluido el desgomado con agua, el desgomado de aceite ALCON (p. ej., para soja), desgomado de Safinco, "super-desgomado", desgomado UF, desgomado TOP, unidesgomado, desgomado seco y desgomado ENZYMAX™. Véase, p. ej., patentes de EE.UU. n° 6.355.693; 6.162.623; 6.103.505; 6.001.640; 5.558.781; 5.264.367. Se describen diferentes procedimientos de "desgomado" incorporado por los métodos de la invención, en Bockisch, M. (1998) en Fats and Oils Handbook, The extraction of Vegetable Oils (capítulo 5), 345-445, AOCS Press, Champaign, Illinois. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en la aplicación industrial del desgomado enzimático de aceites de triglicéridos como se describe, p. ej., en el documento EP 513709.

- 45 En un aspecto, las fosfolipasas de la invención se usan para tratar aceites vegetales, p. ej., aceites brutos, tales como salvado de arroz, soja, canola, flor y similares. En un aspecto, esto mejora la eficacia del procedimiento de desgomado. En un aspecto, la invención proporciona métodos para el desgomado enzimático en condiciones de bajo contenido de agua, p. ej., en el intervalo de entre aproximadamente 0,1% a 20% de agua, o de 0,5% a 10% de agua. En un aspecto, esto da como resultado la separación mejorada de una fase pesada de la fase oleosa durante la centrifugación. La separación mejorada de estas fases puede dar como resultado una eliminación más eficaz de los fosfolípidos del aceite, incluidos los aceites hidratables y no hidratables. En un aspecto, esto puede producir una fracción de goma que contiene menos aceite neutro arrastrado (triglicéridos), mejorando así el rendimiento total del aceite durante el procedimiento de desgomado.

- 55 En un aspecto, las fosfolipasas de la invención, p. ej., un polipéptido que tiene actividad de PLC, p. ej., una actividad de PI-PLC, se usan para tratar aceites (p. ej., aceites vegetales, incluyendo aceites brutos, tales como de salvado de arroz, soja, canola, flor y similares), p. ej., en procedimientos de desgomado, para reducir la masa de goma y aumentar la ganancia de aceite neutro a través del atrapamiento del aceite reducido. En un aspecto, las fosfolipasas de la invención, p. ej., un polipéptido que tiene actividad de PLC, se usan para la producción de diacilglicerol (DAG) y para contribuir a la fase oleosa.

Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en la aplicación industrial de desgomado enzimático como se describe, p. ej., en el documento CA 1102795, que describe un método para aislar lípidos polares de lípidos de cereales mediante la adición de al menos 50% en peso de agua. Este método es un desgomado modificado en el sentido de que usa el principio de añadir agua a una mezcla de aceite bruto.

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

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos enzimáticos que utilizan una enzima fosfolipasa C para hidrolizar un enlace de fosfoéster de glicerilo y así permitir el retorno de la parte de diacilglicéridos de fosfolípidos de vuelta al aceite, p. ej., un aceite vegetal, de pescado o de algas (un "auxiliar de refinado cáustico de la fosfolipasa C (PLC)"); y, reducir el contenido de fosfolípidos en una etapa de desgomado a niveles lo suficientemente bajos como para que los aceites con alto contenido de fósforo sean refinados físicamente (un "auxiliar de desgomado de la fosfolipasa C (PLC)"). Los dos procedimientos pueden generar diferentes valores y tener diferentes aplicaciones objetivo.

En varios procedimientos de ejemplo de la invención, una serie de etapas distintas componen el procedimiento de desgomado que precede a los procedimientos de refinado de desodorización y blanqueo centrales. Estas etapas incluyen calentar, mezclar, mantener, separar y secar. Después de la etapa de calentamiento, se añaden agua y a menudo ácido y se mezclan para permitir que la "goma" de fosfolípidos insoluble se aglomere en partículas que pueden separarse. Aunque el agua separa muchos de los fosfátidos en el desgomado, parte de los fosfolípidos son fosfátidos no hidratables (NHP) presentes en forma de sales de calcio o magnesio. Los procedimientos de desgomado abordan estos NHP mediante la adición de ácido. Después de la hidratación de los fosfolípidos, el aceite se mezcla, se mantiene y se separa por centrifugación. Finalmente, el aceite se seca y se almacena, se envía o se refina, como se ilustra, p. ej., en la figura 1. Las gomas resultantes se procesan adicionalmente para productos de lecitina o se vuelven a añadir a la comida.

En una realización, se proporciona en la presente memoria un método para la hidratación de fosfolípidos no hidratables dentro de una matriz lipídica permitiendo que migren a una interfase de aceite-agua. Los fosfolípidos no hidratables después se hacen reaccionar y/o se eliminan de los lípidos. En una realización, el método comprende a) mezclar un ácido acuoso con un aceite comestible para obtener una mezcla ácida que tiene un pH de menos de aproximadamente 4; y b) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene un pH de aproximadamente 6-9, en donde el mezclado en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende una fase acuosa de tamaño medio de gotas entre aproximadamente 15 µm a aproximadamente 45 µm de tamaño. En algunas realizaciones, el mezclado en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen de tamaño de gotas entre aproximadamente 15 µm y aproximadamente 45 µm de tamaño, en donde el porcentaje de la fase acuosa se basa en el volumen total de la fase acuosa. En alguna realización, los métodos proporcionados en la presente memoria permiten que los fosfolípidos no hidratables dentro de una matriz lipídica migren a una interfase de aceite-agua.

En algunos casos, la mezcla en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende una fase acuosa con un tamaño medio de gotas entre aproximadamente 15-40 µm, 15-35 µm, 17-40 µm, 20-40 µm, 20- 30 µm, 25-30 µm, 25-40 µm o 25-35 µm. En algunos casos, la mezcla en el paso a) crea una emulsión que comprende una fase acuosa con un tamaño medio de gotas entre aproximadamente 15-40 µm, 15-35 µm, 17-40 µm, 20-40 µm, 20-30 µm, 25- 30 µm, 25-40 µm o 25-35 µm. En algunos casos, la mezcla en la etapa b) crea una emulsión que comprende una fase acuosa con un tamaño medio de gotas entre aproximadamente 15-40 µm, 15-35 µm, 17-40 µm, 20-40 µm, 20-30 µm, 25- 30 µm, 25-40 µm o 25-35 µm. En algunos casos, el tamaño medio de gotas es aproximadamente 15 µm, 17 µm, 19 µm, 20 µm, 22 µm, 25 µm, 27 µm, 30 µm, 35 µm o 40 µm. En algunos casos, el tamaño medio de gotas es de aproximadamente 20 µm.

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

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

Sin estar ligado a ninguna teoría particular, se cree que en la etapa a), las sales de calcio, magnesio y hierro del ácido fosfatídico y la fosfatidiletanolamina se disocian. Los cationes libres de calcio, magnesio y hierro reaccionan con, por ejemplo, aniones citrato, acetato o fosfato del ácido, para formar sales metálicas. En la etapa b), los cationes metálicos de la base, por ejemplo, iones de sodio o de potasio, forman complejos con el ácido fosfatídico o la fosfatidiletanolamina. En algunas realizaciones, el método comprende además la adición de agua seguido de mezclado de alta cizalladura para formar una emulsión mecánica. Los fosfolípidos emulsionados se separan después mediante desgomado químico o se hacen reaccionar en el desgomado enzimático.

Cualquier dispositivo de cizalladura y/o mezclado que considere adecuado un experto en la técnica se puede usar para el mezclado en los métodos proporcionados en la presente memoria. En algunas realizaciones, el mezclado comprende cizalladura y agitación. En alguna realización, el dispositivo de mezcla es una mezcladora de hélice, que incluye una mezcladora digital IKA RW 20 con una pala de hoja plana. En algunas realizaciones, el dispositivo de mezcla se opera a aproximadamente 50 rpm, 100 rpm, 150 rpm o 200 rpm para la agitación normal y a aproximadamente 250 rpm, 300 rpm, 350 rpm, 400 rpm o más para una agitación vigorosa. En alguna realización, el mezclado de cizalladura se lleva a cabo con el homogeneizador Ultra-Turrax T-50 basic de IKA con un elemento de dispersión S 50 N-G 45 G a 10.000 rpm.

En algunas realizaciones, la mezcladora es una mezcladora de alta cizalladura de rotor/estator con velocidad de punta (velocidad radial en la cámara de la mezcladora) de al menos aproximadamente 1400 cm/s. En algunas realizaciones, y la potencia disipada por la mezcladora es al menos 1,0 KW/tonelada métrica de producto/h. En algunas realizaciones, las emulsiones de aceite/agua a escala industrial se obtienen con velocidades de punta que varían de aproximadamente 1400 cm/s a 2300 cm/s, o incluso más altas. En algunas realizaciones, la velocidad de punta es aproximadamente 1400 cm/s, 1600 cm/s, 1800 cm/s, 2000 cm/s, 2100 cm/s, 2300 cm/s, 2500 cm/s, 3000 cm/s, o 3500 cm/s. En algunas realizaciones, la velocidad de punta es aproximadamente 2300 cm/s. En algunas realizaciones, y la potencia disipada por la mezcladora es de aproximadamente 1,0 a aproximadamente 2,0 KW/tonelada métrica de producto/h. En algunas realizaciones, y la potencia disipada por la mezcladora es de aproximadamente 2,0 KW/tonelada métrica de producto/h. En algunas realizaciones, para un procedimiento continuo, se requieren 10 KW de disipación de potencia en la mezcladora de alta cizalladura para 10 toneladas métricas de aceite por hora.

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

En algunas realizaciones, el mezclado de ácido comprende cizalladura seguido de agitación de aproximadamente 1 minuto hasta aproximadamente 5 horas. En algunas realizaciones, la mezcla ácida se agita durante al menos aproximadamente 1 minuto. En algunas realizaciones, la agitación de ácido se continúa de

aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 5 horas o más. En algunas realizaciones, la agitación del ácido se continúa de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 5 horas o más. En algunas realizaciones, la agitación de ácido se continúa de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 3 horas o más. En algunas realizaciones, la agitación de ácido se continúa de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas o más. En algunas realizaciones, la agitación de ácido se continúa durante aproximadamente 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 150 o 180 minutos.

En algunas realizaciones, el ácido usado en la etapa a) se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico y mezclas de los mismos. En una realización, el ácido es ácido cítrico.

En algunas realizaciones, el pH de la mezcla ácida en la etapa a) es de aproximadamente 1 a aproximadamente 4. En algunas realizaciones, el pH de la mezcla ácida en la etapa a) es aproximadamente 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 o 4.

En algunos casos, la mezcla de ácido continúa hasta que las sales de calcio, magnesio y hierro del ácido fosfatídico y la fosfatidiletanolamina se disocian.

En algunas realizaciones, el ácido acuoso usado en el método comprende al menos aproximadamente 5% en peso de ácido basado en el peso combinado de ácido y agua. En algunas realizaciones, el ácido acuoso usado en el método comprende al menos de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 90%, de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 80%, de aproximadamente 5 hasta aproximadamente 70%, de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 90%, de aproximadamente 20 hasta aproximadamente 60%, de aproximadamente 30 hasta aproximadamente 60%, o de aproximadamente 40 hasta aproximadamente 60% en peso de ácido basado en el peso combinado de ácido y agua. En algunas realizaciones, el ácido acuoso usado en el método comprende al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 85, 90% en peso de ácido basado en el peso combinado de ácido y agua. En algunas realizaciones, el ácido acuoso usado en los métodos comprende al menos aproximadamente 5% en peso de ácido cítrico basado en el peso combinado de ácido cítrico y agua. En algunas realizaciones, el ácido acuoso usado en los métodos comprende al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 o 60% en peso de ácido cítrico basado en el peso combinado de cítrico ácido y agua. En algunas realizaciones, el ácido acuoso usado en los métodos comprende al menos aproximadamente 40, 45, 50, 55 o 60% en peso de ácido cítrico basado en el peso combinado de ácido cítrico y agua. En una realización, el ácido acuoso usado en el método comprende aproximadamente 50% en peso de ácido cítrico basado en el peso combinado de ácido cítrico y agua. En algunas realizaciones, el ácido acuoso usado en los métodos comprende al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 80, 85, 90% en peso de ácido fosfórico basado en el peso combinado de ácido fosfórico y agua.

En algunas realizaciones, el ácido acuoso se usa en al menos aproximadamente 0,01% en peso basado en el peso total del aceite. En algunas realizaciones, el ácido acuoso se usa en al menos aproximadamente 0,05% en peso basado en el peso total del aceite. En algunas realizaciones, el ácido acuoso se usa en al menos aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 10%, de aproximadamente 0,01 hasta aproximadamente 5%, de aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 5%, de aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 3%, de aproximadamente 0,05 hasta aproximadamente 2% o de aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 2% en peso basado en el peso total del aceite. En algunas realizaciones, el ácido acuoso se usa en aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,15, 0,2, 0,25, 0,3, 0,5, 1, 2, 5, 7 o 10% en peso basado en el peso total del aceite.

Se mezcla una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene un pH de aproximadamente 6-9 en la fase acuosa. El mezclado se continúa para permitir que los fosfolípidos no hidratables dentro de una matriz de lípidos migren a una interfase de aceite-agua. Cualquier base que un experto en la técnica considere adecuada se puede usar en la etapa b). En algunas realizaciones, la base se selecciona del grupo que consiste en hidróxido sódico, hidróxido potásico, silicato sódico, carbonato sódico, carbonato cálcico y una de sus combinaciones. En una realización, la base es hidróxido sódico. En algunas realizaciones, la base se añade como una solución acuosa diluida de manera que la base no saponifique ningún aceite neutro. En algunas realizaciones, la base se añade como solución acuosa de aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 8 M, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 4 M, de aproximadamente 1 hasta aproximadamente 3 M, o de aproximadamente 0,5 hasta aproximadamente 3 M. En algunas realizaciones, la base se añade como solución acuosa aproximadamente 0,1 M, 0,5 M, 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M, 6 M, 7 M u 8 M. En una realización, la cantidad mínima de base que se usa para que la eliminación de los NHP para se eficaz es tal que el pH de la fase acuosa se eleva a al menos aproximadamente 6. En algunas realizaciones, la cantidad de base usada es suficiente para elevar el pH de la fase acuosa a aproximadamente 6, 6,5, 7, 7,5 u 8. En algunas realizaciones, el mezclado de la base se continúa durante al menos aproximadamente 1 minuto. En algunas realizaciones, el mezclado de la base se continúa de aproximadamente 1 minuto a aproximadamente 5 horas o más. En algunas realizaciones, el mezclado de la base se continúa durante aproximadamente 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 120, 150 o 180 minutos.

Los métodos proporcionados en la presente memoria se pueden llevar a cabo a cualquier temperatura que el experto en la técnica considere adecuada. En algunas realizaciones, la temperatura durante el procedimiento está en el intervalo de aproximadamente 20°C a aproximadamente 100°C, de aproximadamente 20°C a aproximadamente 90°C, de aproximadamente 40°C a aproximadamente 80°C, o de aproximadamente 40°C a

aproximadamente 70°C. En algunas realizaciones, la temperatura durante el procedimiento es de aproximadamente 20, 30, 40, 50 60, 70, 80, 90 o 100°C.

5 En algunas realizaciones, se añade agua después de la reacción con la base en una cantidad de aproximadamente 0,1 a 5% o más basado en el volumen total de la mezcla de reacción seguido de un mezclamiento de alta cizalladura para formar una emulsión mecánica que permite que los fosfolípidos se emulsionen en el desgomado químico o que reaccionen en el desgomado enzimático. En algunas realizaciones, después se añade agua en aproximadamente 0,1, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5% o más basado en el volumen total de la mezcla de reacción.

10 En una realización, se proporciona en la presente memoria un método en el que a la hidratación de NHP le sigue un tratamiento enzimático para eliminar diversos fosfolípidos y lecitinas. Dichos métodos se pueden practicar con aceites brutos o desgomados con agua.

15 En algunas realizaciones, un método de desgomado de aceite proporcionado en la presente memoria comprende: a) mezclar un ácido acuoso con un aceite comestible para obtener una mezcla ácida que tiene un pH de aproximadamente 1 a 4; b) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene un pH de aproximadamente 6-9; y c) desgomado de la mezcla de reacción con agua o una enzima para obtener un aceite desgomado, en donde la mezcla en las etapas a) y/o b) se lleva a cabo con una mezcladora de alta cizalladura.

20 Cuando se usa una enzima en la etapa de desgomado, se pueden añadir una o más enzimas al aceite por separado o juntas. Los parámetros de la reacción enzimática que incluyen temperatura, pH y concentración de la enzima se pueden controlar para optimizar la reacción para una combinación enzimática particular en un sistema de aceite particular. Muchas variedades de enzimas y sus equivalentes son adecuadas para usar en los métodos proporcionados en la presente memoria, incluyendo las familias de fosfolipasa A y fosfolipasa C que están disponibles en el mercado. Las enzimas de ejemplo se describen en otra parte en la presente memoria.

25 En algunas realizaciones, las diferentes fosfolipasas usadas juntas en la etapa de desgomado enzimático se mezclan juntas antes de la adición al aceite que se va a tratar. Alternativamente, las enzimas se agregan al aceite por separado, sea secuencialmente o simultáneamente.

La cantidad de enzima usada en los métodos proporcionados en la presente memoria depende de las condiciones de reacción, el tipo de aceite y el tipo de uso de la enzima. En algunas realizaciones, la cantidad está en el rango de 10 a 20.000 unidades, de 20 a 10.000 unidades, de 50 a 5.000 unidades, o de 100 a 2.000 unidades, por 1 kg de aceite.

30 En una realización, se proporciona en la presente memoria un método para eliminar NHP, fosfolípidos hidratables y lecitinas (conocidos colectivamente como "gomas") de aceites vegetales para producir un producto de grasa o aceite desgomado que se puede usar para la producción de alimentos y/o aplicaciones no alimentarias. En algunas realizaciones, los métodos de desgomado proporcionados en la presente memoria usan agua, diversos ácidos y/o diversas bases o una de sus combinaciones.

35 En una realización, los métodos proporcionados en la presente memoria son útiles para la eliminación de sales de ácido fosfatídico y fosfatidiletanolamina de aceites vegetales. En algunas realizaciones, las sales de citrato de calcio y magnesio se forman en la etapa a). Los métodos proporcionados en la presente memoria eliminan los problemas asociados con incrustaciones en el equipo debido a la deposición de sales de citrato de calcio y magnesio en los equipos posteriores a la reacción. Las sales de citrato de calcio y magnesio son solubles al pH al que se lleva a cabo la reacción enzimática y el procesamiento adicional en los métodos proporcionados en la presente memoria.

40 En algunos casos proporcionados en la presente memoria, se describen métodos para aumentar la velocidad de reacción de una fosfolipasa usada en un desgomado enzimático, de modo que la reacción enzimática tiene una duración de menos de aproximadamente seis, cinco, cuatro, tres, dos o una hora. En algunos casos, la mejora en la velocidad de reacción se consigue mediante un mezclamiento de alta cizalladura de la mezcla de reacción de la etapa b) para formar una emulsión mecánica que después se hace reaccionar con la enzima.

45 Es otro aspecto más, se proporciona en la presente memoria un método para desgomar una composición de aceite vegetal en la que tanto los fosfolípidos hidratables como no hidratables se pueden tratar en un único procedimiento, en donde se completa una reacción enzimática en menos de aproximadamente una hora.

50 En algunas realizaciones, el aceite comprende aceite de *Neochloris oleoabundans*, aceite de *Scenedesmus dimorphus*, aceite de *Euglena gracilis*, aceite de *Phaeodactylum tricornutum*, aceite de *Pleurochrysis carterae*, aceite de *Prymnesium parvum*, aceite de *Tetraselmis chui*, aceite de *Tetraselmis suecica*, aceite de *Isochrysis galbana*, aceite de *Nannochloropsis salina*, aceite de *Botryococcus braunii*, aceite de *Dunaliella tertiolecta*, aceite de especies de *Nannochloris*, aceite de espirulina, aceite de *Chlorophycease*, aceite de *Bacilliarophy*, aceite de acai, aceite de almendra, aceite de babassu, aceite de semilla de grosella negra, aceite de semilla de borraja, aceite de canola, aceite de anacardo, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de Crambe, aceite de semilla de lino, aceite de semilla de uva, aceite de avellana, aceites de otras nueces, aceite de cáñamo, aceite de *jatropha*, aceite de yoyoba, aceite de linaza, aceite de nuez de macadamia, aceite de

nuez de mango, aceite de *Limnanthes*, aceite de mostaza, aceite de pie de buey, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de cacahuete, aceite de nuez de pecán, aceite de piñones, aceite de pistacho, aceite de semilla de amapola, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de sésamo, manteca de karité, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de resina, aceite de tsubaki, aceite de avellana, variedades de aceites “naturales” que tienen composiciones de ácidos grasos alteradas por organismo genéticamente modificados (OGM) o “cruce” tradicional tal como aceites alto oleico, bajo linoleico o bajos saturados (aceite de canola alto oleico, aceite de soja bajo linoleico o aceites de girasol alto esteárico, o una de sus combinaciones. En una realización, los aceites que se pueden tratar incluyen pero no se limitan a los siguientes: aceite de canola, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de cilantro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de avellana, aceite de cáñamo, aceite de linaza, aceite de nuez de mango, hierba de *Limnanthes* aceite, aceite de pie de buey, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, oleína de palma, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de resina, aceite de tsubaki, y aceite vegetal.

En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria reducen el contenido de fosfolípidos de un aceite a menos de aproximadamente 30 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 20 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 15 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 10 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 7 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 5 ppm de fósforo o menos de aproximadamente 3 ppm de fósforo. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente memoria reducen el contenido de fosfolípidos de un aceite a aproximadamente 10 ppm de fósforo, aproximadamente 7 ppm de fósforo, aproximadamente 5 ppm de fósforo o aproximadamente 3 ppm de fósforo.

Después de la etapa de desgomado, el aceite desgomado se puede separar de las gomas y someter a etapas de procesamiento adicionales conocidas en la técnica que incluyen blanqueo o desodorización, según sea necesario o deseable dependiendo del uso final para el que se destina el producto de aceite desgomado.

En algunos casos, se proporcionan en la presente memoria métodos para obtener fosfolípidos que comprenden:

- a) mezclar un ácido acuoso con el aceite comestible para obtener una mezcla ácida que tiene un pH de menos de aproximadamente 4;
- b) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene un pH de aproximadamente 6-9, en donde la mezcla en las etapas a) y/o b) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen de tamaño de gotas entre aproximadamente 15 μ m a aproximadamente 45 μ m de tamaño;
- c) mezclar una enzima seleccionada de la fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, de SEQ ID NO: 8; y
- d) aislar los fosfolípidos.

En varios procedimientos de ejemplo de la invención, los niveles de fósforo se reducen lo suficientemente para el refinado físico. El procedimiento de separación puede dar como resultado pérdidas de rendimiento potencialmente mayores que el refinado cáustico. Además, los procedimientos de desgomado pueden generar productos de desecho que no se pueden vender como lecitina comercial, véase, por ejemplo, la figura 2 para un procedimiento de desgomado de ejemplo para aceites de refinado físico. Por lo tanto, estos procedimientos no han logrado una participación significativa en el mercado y los procedimientos de refinado cáustico continúan dominando la industria del salvado de arroz, soja, canola y girasol. Sin embargo, obsérvese que una enzima fosfolipasa C usada en un procedimiento especial de desgomado disminuiría la formación de gomas y devolvería la parte de diglicérido del fosfolípido al aceite.

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

En otro aspecto, la mayoría del 1,2-DAG se puede convertir en 1,3-DAG aumentando el pH de la goma después de la reacción con PLC, por ejemplo, mediante la adición de producto cáustico. El 1,3-DAG después se puede extraer de la goma y hacerlo reaccionar con una lipasa en las condiciones adecuadas para transesterificar el 1,3-DAG a la 2ª posición para crear el triacilglicerol estructurado deseado.

En aspectos alternativos, los ácidos grasos utilizados en la reacción de transesterificación podrían provenir de una variedad de fuentes, que incluyen los ácidos grasos libres que se encuentran en el aceite bruto.

En un caso, los fosfolípidos del desgomado con agua se usan en combinación con una PLC de la invención para crear lípidos estructurados. El aceite desgomado con agua se puede exponer a una PLC y/o PLD más fosfatasa o una de estas combinaciones, seguido de PLA para reducir el fósforo a niveles adecuados para el refinado cáustico o físico.

- 5 En realizaciones alternativas, la combinación de enzimas que se puede usar en los métodos de la invención, que incluyen estos procedimientos de desgomado, incluye (donde una de las enzimas en la combinación comprende una enzima de la presente invención):

PLC + PI-PLC + PLA (PLA añadida después de la finalización de las reacciones de la PLC);

PLD + fosfatasa + PI-PLC seguido de PLA; o,

- 10 PLC o (PLC + PI-PLC) + PLA específico para ácido fosfatídico (todas las enzimas se añaden juntas o secuencialmente).

Refinado cáustico

- La invención proporciona procedimientos que usan fosfolipasas (que incluyen enzimas de la invención) en el refinado cáustico, donde las enzimas se usan como coadyuvantes de refinado cáustico. En casos alternativos, se usa una PLC o PLD y/o una fosfatasa en los procedimientos como una adición, sea antes, durante o después de un procedimiento de refinado de neutralización cáustica (refinado continuo o por lotes). La cantidad de enzima añadida puede variar de acuerdo con el procedimiento. El nivel de agua utilizado en el procedimiento puede ser bajo, p. ej., de aproximadamente 0,5 a 5%. Alternativamente, se añade producto cáustico al procedimiento múltiples veces. Además, el procedimiento se puede llevar a cabo a diferentes temperaturas (de 25°C a 70°C), con diferentes ácidos o productos cáusticos, y a pH variable (4-12). Se pueden usar soluciones concentradas de producto cáustico, por ejemplo, más concentradas que el estándar industrial del 11%, para disminuir la masa de goma. En aspectos alternativos, la solución concentrada de producto cáustico es de concentración de aproximadamente 12% a 50%, p. ej., aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50% o 60% o más concentrada.

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

- Los ácidos que se pueden usar en un procedimiento de refinado cáustico incluyen, pero no se limitan a, ácidos fosfórico, cítrico, ascórbico, sulfúrico, fumárico, maleico, clorhídrico y/o acético. Los ácidos se usan para hidratar fosfolípidos no hidratables. Los productos cáusticos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, KOH y NaOH. Los productos cáusticos se usan para neutralizar los ácidos grasos libres. Alternativamente, las fosfolipasas, o más en particular una PLC o una PLD y una fosfatasa, se usan para la purificación de fitoesteres de la goma/borra de neutralización.

- En algunos casos, la fosfolipasa se puede añadir antes del refinado cáustico para expresar la fosfolipasa en una planta. En otro caso, la fosfolipasa se añade durante la trituración de la planta, semillas u otra parte de la planta. Alternativamente, la fosfolipasa se añade después de la trituración, pero antes del refinado (es decir, en recipientes de retención). Además, se añade fosfolipasa como pretratamiento de refinado, con o sin ácido.

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

- En otra realización de la invención, la fosfolipasa se añade después del refinado cáustico (Figura 5) En un caso, la fosfolipasa se añade en una mezcladora intensa o en una mezcladora de retención, antes de la separación. Alternativamente, la fosfolipasa se añade después de la etapa de calentamiento. En otra realización, la fosfolipasa se añade en la etapa de centrifugación. En una realización adicional, la fosfolipasa se añade a la borra de neutralización. Alternativamente, la fosfolipasa se añade al agua de lavado. En otro caso, la fosfolipasa se añade durante las etapas de blanqueado y/o desodorización.

- En un aspecto, una enzima fosfolipasa, p. ej., una fosfolipasa C, de la invención hidrolizará el fosfátido tanto de fosfolípidos hidratables como no hidratables en aceites desgomados y brutos neutralizados antes del blanqueado y la desodorización. Se ilustran procedimientos de ejemplo de "refinado cáustico" de la invención en la figura 4 y figura 6. La figura 4 incluye tiempos, temperatura y pH de ejemplo para la mezcladora estática (30 a 60 min, 50 a 60°C, pH 5 a 6,5) y la mezcladora de retención (3 a 10 min, 20 a 40°C). La enzima objetivo se puede aplicar como un producto de adición en el procedimiento de neutralización cáustica existente, como se ilustra en la figura 4. En este aspecto,

no se requerirá que la enzima soporte niveles extremos de pH si se añade después de la adición de producto cáustico. Como se ilustra en la figura 6 (un procedimiento de ejemplo de "carga frontal" de la enzima), se puede usar cualquier fosfolipasa, que incluye, por ejemplo, una fosfolipasa de la invención, tal como una PLC, PI-PLC, PLB, PLA y/o PLC, en un procedimiento de desgomado de aceite bruto, como se describe, p. ej., en *Bailey's Industrial Oil & Fat Products* v.4 (ed. YH Hui). La figura 7 y figura 8 ilustran variaciones de métodos donde se usan dos o tres etapas de centrifugación, respectivamente, en el procedimiento, que se pueden usar para procesar cualquier aceite, p. ej., un aceite vegetal como el aceite de soja bruto, como se muestra en la figura. El método de ejemplo de la figura 8 tiene una etapa de centrifugación antes del refinado cáustico (además de una etapa de centrifugación después del refinado cáustico y antes del lavado con agua, y, después del lavado con agua), mientras que el método de ejemplo de la figura 7 no tiene una etapa de centrifugación antes del refinado cáustico. La figura 9 ilustra otra variación de ejemplo de este procedimiento que usa tratamiento con ácido y que tiene una etapa de centrifugación antes de una etapa de desgomado; este procedimiento de ejemplo se puede usar para procesar cualquier aceite, p. ej., un aceite vegetal tal como aceite de soja bruto, como se muestra en la figura.

En un aspecto, una fosfolipasa de la invención permite eliminar el fósforo hasta los niveles bajos aceptables en el refinado físico. En un aspecto, una PLC de la invención hidrolizará el fosfátido tanto de fosfolípidos hidratables como no hidratables en aceites brutos antes de blanqueado y desodorización. La enzima objetivo se puede aplicar como un producto de adición en una operación de desgomado existente, véase, p. ej., la figura 5. Dado el mezclamiento subóptimo en equipos comerciales, es probable que se requiera ácido para poner en contacto los fosfolípidos no hidratables con la enzima en la interfase de aceite/agua. Por lo tanto, en un aspecto, se usa una PLC estable frente a ácidos de la invención.

En un aspecto, un procedimiento de coadyuvante de desgomado de PLC de la invención puede eliminar pérdidas en una o las tres áreas indicadas en la tabla 4. Las pérdidas asociadas con un procedimiento de PLC puede estimarse que son de aproximadamente 0,8% frente a 5,2% en masa debido a la eliminación del fosfátido.

Tabla 4: Pérdidas abordadas por productos de PLC

	Coadyuvante de refinado cáustico	Coadyuvante de desgomado
1) Pérdida de aceite en la formación y separación 2,1%	X	X
2) Aceite saponificado en adición cáustica 3,1%		X
3) Aceite atrapado en arcilla en blanqueado* <1,0%	X	X
Pérdida de rendimiento total ~5,2%	~2,1%	~5,2%

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

- Adsorbentes reducidos - se requieren menos adsorbentes con nivel inferior de fósforo (<5 ppm)
- Menor uso de productos químicos - menos costes químicos y de procesamiento asociados con la hidratación de fosfolípidos no hidratables
- Menor generación de residuos - se necesita menos agua para eliminar el fósforo del aceite

Los aceites procesados (p. ej., "desgomados") por los métodos de la invención incluyen semillas oleaginosas de plantas, p. ej., aceite de soja, aceite de colza, aceite de salvado de arroz y aceite de girasol. En un aspecto, el "coadyuvante de refinado cáustico de PLC" de la invención puede ahorrar un 1,2% con respecto a los procedimientos de refinado cáustico existentes. La aplicación del coadyuvante de refinado trata el aceite de soja que ha sido desgomado en cuanto a la lecitina y estos también están excluidos de los cálculos de valor/carga.

Los objetivos de rendimiento de los procedimientos de la invención pueden variar de acuerdo con las aplicaciones y más específicamente con el punto de adición de la enzima, véase la tabla 5.

Tabla 5: Objetivos de rendimiento por aplicación

	Coadyuvante de refinado cáustico	Coadyuvante de desgomado
Niveles de fósforo del aceite que entra	<200 ppm*	600-1.400 ppm
Niveles de fósforo del aceite final	<10 ppm [†]	<10 ppm
Gomas hidratables y no hidratables	Si	Si
Tiempo de permanencia	3-10 minutos	30 minutos [‡]
Formulación líquida	Si	Si
pH objetivo	8-10 ^{†††}	5,0-5,5 ^{††}
Temperatura objetivo	20-40°C	~50-60°C
Contenido de agua	<5%	1-1,25%
Pureza de la formulación de la enzima	Sin lipasa/proteasa	Sin lipasa/proteasa
Otros requisitos clave	Eliminación de Fe	Eliminación de Fe

* Aceite de desgomado con agua

† Niveles objetivo alcanzados en la etapa de neutralización cáustica corriente arriba, pero deben mantenerse

‡ 1-2 horas de existencia

‡‡ El desgomado con ácido requerirá una enzima que sea estable en condiciones mucho más ácidas: pH a 2,3 para el ácido cítrico al 5%. (~Roehm USPN 6.001.640).

‡‡‡ El pH del aceite neutralizado NO es neutro. Las pruebas en POS indican que el pH estará en el intervalo alcalino de 6,5-10 (9 de diciembre de 2002). Es necesario determinar el intervalo típico de pH.

Otros procedimientos que se pueden usar con una fosfolipasa pueden convertir fosfolípidos naturales no hidratables en una forma hidratable. En un aspecto, la enzima es sensible al calor. Esto puede ser deseable, puesto que calentar el aceite puede destruir la enzima. Sin embargo, la reacción de desgomado debe ajustarse a pH 4-5 y 60°C para acomodar esta enzima. Con una dosificación de saturación de aceite de 300 unidades/kg, este procedimiento de ejemplo es satisfactorio al tomar aceite desgomado con agua previamente con contenido de fósforo inferior a ≤10 ppm P. Las ventajas pueden ser el menor contenido de H₂O y los ahorros resultantes del uso, manipulación y residuos. La tabla 6 cita aplicaciones de ejemplo para usos industriales para enzimas de la invención:

Tabla 6: Aplicación de ejemplo

	Coadyuvante de refinado cáustico	Coadyuvante de desgomado
Producción de aceite de soja con lecitina	X	
Aceite de soja, aceite de girasol, aceite de canola de refinado químico	X	X
Aceites bajos en fosfátidos (p. ej., palma)		X

Además de estos diferentes procedimientos de "desgomado", las fosfolipasas de la invención se pueden usar en cualquier etapa de procesamiento de aceite vegetal. Por ejemplo, las enzimas fosfolipasa de la invención se pueden usar en lugar de PLA, p. ej., fosfolipasa A2, en cualquier etapa de procesamiento de aceite vegetal. Los aceites que son "procesados" o "desgomados" en los métodos de la invención incluyen aceites de soja, aceites de colza, aceites de maíz, aceites de palmiste, aceites de canola, aceites de girasol, aceites de sésamo, aceites de cacahuete, aceite de salvado de arroz y similares. Los principales productos de este procedimiento incluyen triglicéridos.

En un procedimiento de ejemplo, cuando la enzima se añade y se hace reaccionar con un aceite bruto, la cantidad de fosfolipasa usada es de aproximadamente 10-10.000 unidades, o, alternativamente, aproximadamente, 100-2.000 unidades, por 1 kg de aceite bruto. El tratamiento enzimático se lleva a cabo durante 5 min a 10 horas, a una temperatura de 30°C a 90°C, o, alternativamente, aproximadamente de 40°C a 70°C. Las condiciones pueden variar dependiendo de la temperatura óptima de la enzima. La cantidad de agua añadida para disolver la enzima es de 5-1.000 partes en peso por 100 partes en peso de aceite bruto, o, alternativamente, aproximadamente, de 10 a 200 partes en peso por 100 partes en peso de aceite bruto.

Una vez completado dicho tratamiento enzimático, la enzima líquida se separa con un medio adecuado tal como un separador centrífugo y se obtiene el aceite procesado. Los compuestos que contienen fósforo producidos por descomposición enzimática de sustancias gomosas en dicho procedimiento se transfieren prácticamente todos a la fase acuosa y se eliminan de la fase oleosa. Una vez completado el tratamiento enzimático, si es necesario, el aceite procesado se puede lavar adicionalmente con agua o ácido orgánico o inorgánico tal como, por ejemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido succínico y ácidos equivalentes, o con soluciones salinas.

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

En un procedimiento de ejemplo para un coadyuvante de refinado físico mediado por fosfolipasa, se añaden agua y enzima al aceite bruto (p. ej., aceite vegetal bruto). En un aspecto, se usa una PLC o una PLD y una fosfatasa en el procedimiento. En el refinado físico mediado por fosfolipasa, el nivel de agua puede ser bajo, es decir, 0,5 - 5% y el tiempo del procedimiento debe ser corto (menos de 2 horas o menos de 60 minutos o menos de 30 minutos o menos que 15 minutos o menos de 5 minutos). El procedimiento se puede llevar a cabo a diferentes temperaturas (de 25°C a 70°C), usando diferentes ácidos y/o productos cáusticos, a diferentes pH (por ejemplo, 3-10).

En casos alternativos, se lleva a cabo primero el desgomado con agua para recoger lecitina por centrifugación y después se añade PLC o PLC y PLA para eliminar los fosfolípidos no hidratables (el procedimiento debe realizarse con una concentración baja de agua). En otro caso, se lleva a cabo el desgomado con agua de aceite bruto a menos de 10 ppm (aceites comestibles) y el posterior refinado físico (menos de 50 ppm para el biodiésel). En un aspecto, se añade un emulsionante y/o el aceite bruto se somete a una mezcladora intensa para promover el mezclamiento. Alternativamente, se añade un rompedor de emulsión y/o el aceite bruto se calienta para promover la separación de la fase acuosa. En otro aspecto, se añade un ácido para promover la hidratación de fosfolípidos no hidratables. Adicionalmente, las fosfolipasas se pueden usar para mediar en la purificación de fitoesteroides de la goma/borra de neutralización.

En un aspecto, la invención proporciona composiciones y métodos (que pueden comprender el uso de fosfolipasas de la invención) para el desgomado de aceite que comprende el uso de cantidades variables de ácido y base sin producir borra de neutralización. Usando este aspecto de la invención para el desgomado de aceite, se puede usar ácido (que incluye fosfórico y/o cítrico) para hidratar fosfolípidos no hidratables en aceites con alto contenido de fósforo (que incluyen soja, canola y girasol). Una vez que los fosfolípidos se han hidratado, el pH de la fase acuosa se puede elevar usando la adición de producto cáustico: la cantidad de producto cáustico añadido puede crear un pH favorable para la actividad enzimática pero no dará como resultado la formación de una fracción significativa de borra de neutralización en el aceite. Debido a que no se forma una borra de neutralización, los ácidos grasos libres en el aceite se pueden separar aguas abajo, después de la etapa de desgomado, durante el blanqueado y desodorización.

Las enzimas de la invención se usan para mejorar la extracción de aceite y el desgomado de aceite (p. ej., aceites vegetales). En un aspecto, se usa una PLC de la invención y al menos un degradador de la pared de células vegetales (p. ej., una celulasa, una hemicelulasa o similar para ablandar las paredes y aumentar el rendimiento en la extracción) en un procedimiento de la invención. En este procedimiento de ejemplo para usar enzimas de la invención para mejorar la extracción de aceite y el desgomado de aceite, se usa una fosfolipasa C de la invención, así como otras hidrolasas (p. ej., una celulasa, una hemicelulasa, una esterasa, una proteasa y/o una fosfatasa) durante las etapas de trituración asociadas a la producción de aceite (que incluyen, pero no se limitan a aceite de soja, canola, girasol, aceite de salvado de arroz). Mediante el uso de enzimas antes o en lugar de la extracción con disolvente, se puede aumentar el rendimiento de aceite y reducir la cantidad de fosfolípidos hidratables y no hidratables en el aceite bruto. La reducción en fosfolípidos no hidratables puede ser el resultado de la conversión de fosfolípidos potencialmente no hidratables en diacilglicerol y el éster fosfato correspondiente antes de la complejación con calcio o magnesio. La reducción global de los fosfolípidos en el aceite bruto dará como resultado rendimientos mejorados durante el refinado con el potencial de eliminar el requisito de una etapa de desgomado separada antes del blanqueado y desodorización.

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos que usan una fosfolipasa de la invención (p. ej., una fosfolipasa específica de fosfolipasa de la invención), u otra fosfolipasa, en un "procedimiento de refinado orgánico" modificado, que puede comprender la adición de la enzima (p. ej., una PI-PLC) en un tanque de retención de ácido cítrico.

Las enzimas de la invención se pueden usar en cualquier método de procesamiento de aceite, p. ej., procedimientos de desgomado o equivalentes. Por ejemplo, las enzimas de la invención se pueden usar en procedimientos como se describe en las patentes de EE.UU. n° 5.558.781; 5.264.367; 6.001.640. El procedimiento descrito en USPN 5.558.781 usa bien fosfolipasa A1, A2 o B, descomponiendo esencialmente la lecitina en el aceite que se comporta como emulsionante.

Las enzimas y los métodos de la invención se pueden usar en procedimientos para la reducción de componentes que contienen fósforo en aceites comestibles que comprenden una gran cantidad de fósforo no hidratable mediante el uso de una fosfolipasa de la invención. En un aspecto, el aceite comestible es un aceite bruto, el llamado "aceite no desgomado". En un aspecto, el método trata un aceite no desgomado, que incluye aceites prensados o aceites extraídos, o una mezcla de los mismos, de, p. ej., de colza, soja, sésamo, cacahuete, maíz, salvado de arroz o girasol. El contenido de fosfátidos en un aceite bruto puede variar de 0,5 a 3% en p/p, que corresponde a un contenido de fósforo en el intervalo de 200 a 1200 ppm, o, en el intervalo de 250 a 1200 ppm. Además de los fosfátidos, el aceite bruto también puede contener pequeñas concentraciones de hidratos de carbono, compuestos de azúcar y complejos metal/ácido fosfatídico de Ca, Mg y Fe. En un aspecto, el procedimiento comprende el tratamiento de un fosfolípido o lisofosfolípido con la fosfolipasa de la invención para así hidrolizar grupos acilo grasos. En un aspecto, el fosfolípido o lisofosfolípido comprende lecitina o lisolecitina. En un aspecto del procedimiento, el aceite comestible tiene un contenido de fósforo entre aproximadamente 50 y 250 ppm, y el procedimiento comprende tratar el aceite con una fosfolipasa de la invención para así hidrolizar una parte principal del fosfolípido y separar una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado del aceite. En un caso, antes del procedimiento de desgomado enzimático, el aceite es desgomado con agua. En un caso, los métodos proporcionan la producción de un pienso para animales que comprende mezclar la fosfolipasa de la invención con sustancias de pienso y al menos un fosfolípido.

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

Las enzimas de la invención se pueden usar en procedimientos como se describe en solicitud JP N°: H5-132283, presentada el 25 de abril de 1993, que comprende un procedimiento para la purificación de aceites y grasas, que comprende una etapa de convertir los fosfolípidos presentes en los aceites y las grasas en sustancias solubles en agua que contienen grupos ácido fosfórico y eliminarlos como sustancias solubles en agua. Se usa una acción enzimática para la conversión en sustancias solubles en agua. Se usa preferiblemente una enzima que tiene una actividad de fosfolipasa C como la enzima.

Las enzimas de la invención se pueden usar en procedimientos como se describes en "Organic Refining Process," (ORP) (IPH, Omaha, NE) que es un método de refinado de aceites de semillas. El ORP puede tener ventajas frente al refinado químico tradicional, que incluyen el rendimiento mejorado del aceite refinado, coproductos de valor añadido, costes de capital reducidos y costes ambientales menores.

Las enzimas de la invención se pueden usar en procedimientos para el tratamiento de un aceite o grasa, animal o vegetal, bruto, semiprocado o refinado, que comprenden la adición a dicho aceite o grasa de al menos una enzima de la invención que permite hidrolizar y/o despolimerizar los compuestos no glicéricos contenidos en el aceite, como se describe, p. ej., en la solicitud EP número: 82870032.8. Los métodos de ejemplo de la invención para la hidrólisis y/o despolimerización de compuestos no glicéricos en aceites son:

1) La adición y mezcla en aceites y grasas de una enzima de la invención o complejos enzimáticos previamente disueltos en una pequeña cantidad de disolvente adecuado (por ejemplo agua). Son posibles una serie determinada de disolventes, pero se elige un disolvente no tóxico y adecuado para la enzima. Esta adición se puede hacer en procedimientos con cargas sucesivas, así como en procedimientos continuos. La cantidad de enzima(s) que es necesario añadir a aceites y grasas, de acuerdo con este procedimiento, puede variar, dependiendo de las enzimas y los productos que se van a procesar, de entre aproximadamente 5 y 400 ppm, o entre aproximadamente 20 y 400 ppm; p. ej., de 0,005 kg a 0,4 kg de enzima por 1000 kg de aceite o grasa, y preferiblemente de 5 a 100 ppm, es decir, de 0,005 a 0,1 kg de enzima por 1000 kg de aceite, entendiéndose que estos valores son para enzimas concentradas, es decir, sin diluyente o disolvente.

2) Paso del aceite o grasa a través de un lecho de filtración fijo o insoluble de enzima(s) de la invención sobre soportes sólidos o semisólidos, que preferiblemente presentan una estructura porosa o fibrosa. En esta técnica, las enzimas están atrapadas en las microcavidades de la estructura porosa o fibrosa de los soportes. Estos consisten, por ejemplo, en resinas o polímeros sintéticos, carbonatos de celulosa, geles tales como agarosa, filamentos de polímeros o copolímeros con estructura porosa, que atrapan pequeñas gotas de enzima en solución en sus cavidades. Con respecto a la concentración de la enzima, es posible ir hasta la saturación de los soportes.

3) Dispersión de los aceites y grasas en forma de finas gotitas, en una solución enzimática diluida, en aspectos alternativos que contienen entre aproximadamente 0,05 y 4%, o que contienen entre aproximadamente 0,2 y 4% en volumen de una enzima de la invención. Esta técnica se describe, p. ej., en la patente belga N° 595.219. Una columna cilíndrica con una altura de varios metros, con tapa cónica, se llena con una solución enzimática diluida. Para este fin, se elige un disolvente que no sea tóxico y no miscible en el aceite o la grasa que se va a procesar, preferiblemente agua. La parte inferior de la columna está equipada con un sistema de distribución en el que el aceite o la grasa se inyecta continuamente en una forma extremadamente dividida (aproximadamente 10.000 flujos por m²). De este modo, se forma un número infinito de gotitas de aceite o grasa, que ascienden lentamente en la solución de enzimas y se encuentran en la superficie, para ser evacuadas continuamente en la parte superior de la tapa cónica del reactor.

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

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

El procedimiento de refinado orgánico se puede aplicar tanto al aceite bruto como desgomado. El procedimiento usa la adición en línea de un ácido orgánico en condiciones de procedimiento controladas, junto con la separación centrífuga convencional. El agua separada naturalmente de los fosfolípidos del aceite vegetal ("VOP") se recicla y se reutiliza. El uso total de agua se puede reducir sustancialmente como resultado del procedimiento de refinado orgánico.

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, tal como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N° 6.162.623. En estos métodos de ejemplo, la invención proporciona una enzima anfifílica. Se puede inmovilizar, p. ej., preparando una emulsión que contiene una fase hidrofóbica continua y una fase acuosa dispersa que contiene la enzima y un vehículo para la enzima y eliminando agua de la fase dispersa hasta que esta fase se convierte en partículas sólidas recubiertas con enzima. La enzima puede ser una lipasa. La lipasa inmovilizada se puede usar para reacciones catalizadas por lipasa tales como la interesterificación de mono-, di- o triglicéridos, la desacidificación de un aceite de triglicéridos o la eliminación de fosfolípidos de un aceite de triglicéridos cuando la lipasa es una fosfolipasa. La fase acuosa puede contener un líquido de fermentación, un aceite de triglicéridos comestible puede ser la fase hidrofóbica, y los vehículos incluyen azúcares, almidón, dextrano, derivados de celulosa solubles en agua y residuos de fermentación. Este método de ejemplo se puede usar para procesar triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, glicerol, fosfolípidos, glucolípidos o ácidos grasos, que pueden estar en la fase hidrofóbica. En un aspecto, el procedimiento para la eliminación de fosfolípidos del aceite de triglicéridos comprende mezclar un aceite de triglicéridos que contiene fosfolípidos con una preparación que contiene una fosfolipasa de la invención; hidrolizar los fosfolípidos a lisofosfolípidos; separar los fosfolípidos hidrolizados del aceite, en donde la fosfolipasa es una fosfolipasa inmovilizada.

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N° 6.127.137. Este método de ejemplo hidroliza ambos grupos acilo grasos en fosfolípidos intactos. La fosfolipasa de la invención usada en este método de ejemplo no tiene actividad de lipasa y es activa a pH muy bajo. Estas propiedades lo hacen muy adecuado para su uso en el desgomado de aceites, ya que tanto la hidrólisis enzimática como la alcalina (saponificación) del aceite se pueden suprimir. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para hidrolizar grupos acilo grasos en un fosfolípido o lisofosfolípido que comprende tratar el fosfolípido o lisofosfolípido con la fosfolipasa que hidroliza ambos grupos acilo grasos en un fosfolípido y carece esencialmente de actividad de lipasa. En un aspecto, la fosfolipasa de la invención tiene una temperatura óptima a aproximadamente 50°C, medida a pH 3 a pH 4 durante 10 minutos, y un pH óptimo de aproximadamente pH 3, medido a 40°C durante aproximadamente 10 minutos. En un aspecto, el fosfolípido o lisofosfolípido comprende lecitina o lisolecitina. En un aspecto, después de hidrolizar una parte principal de fosfolípidos, una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado se separa del aceite. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para eliminar fosfolípidos de un aceite comestible, que comprende tratar el aceite a pH de 1,5 a 3 con una dispersión de una solución acuosa de la fosfolipasa de la invención y separar una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado, del aceite. En un aspecto, el aceite se trata para eliminar el mucílago antes del tratamiento con la fosfolipasa. En un aspecto, el aceite antes del tratamiento con la fosfolipasa contiene el fosfolípido en una cantidad que corresponde de 50 a 250 ppm de fósforo. En un caso, el tratamiento con fosfolipasa se hace de 30°C a 45°C, durante 1 a 12 horas, con una dosificación de fosfolipasa de 0,1 a 10 mg/l en presencia de 0,5 a 5% de agua.

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N° 6.025.171. En estos métodos de ejemplo, las enzimas de la invención se inmovilizan preparando una emulsión que contiene una fase hidrofóbica continua, tal como un aceite de triglicéridos, y una fase acuosa dispersa que contiene una enzima anfifílica, tal como lipasa o una fosfolipasa de la invención, y material de vehículo que está parcialmente disuelto y parcialmente no disuelto en la fase acuosa, y eliminando el agua de la fase acuosa hasta que la fase se convierte en partículas vehículo recubiertas de enzimas sólidas. La parte no disuelta del material vehículo puede ser un material que es insoluble en agua y aceite, o un material soluble en agua en forma no disuelta porque la fase acuosa ya está saturada con el material soluble en agua. La fase acuosa puede formarse con un líquido de fermentación de lipasa bruto que contiene residuos de fermentación y biomasa que pueden servir como materiales vehículo. La lipasa inmovilizada es útil para la reorganización del éster y la desacidificación en aceites. Después de una reacción, la enzima inmovilizada se puede regenerar para una reacción posterior añadiendo agua para obtener la disolución parcial del vehículo, y con la enzima resultante y la fase acuosa que contiene vehículo dispersada en una fase hidrofóbica, evaporando agua para formar de nuevo partículas vehículo recubiertas con enzima.

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N° 6.143.545. Este método de ejemplo se usa para reducir el contenido de componentes que contienen fósforo en un aceite comestible que comprende una gran cantidad de contenido de fósforo no hidratable, usando una fosfolipasa de la invención. En un aspecto, el método se usa para reducir el contenido de componentes que contienen fósforo en un aceite comestible que tiene un contenido de fósforo no hidratable de al menos 50 ppm medido pretratando el aceite comestible, a 60°C, por adición de un solución que comprende monohidrato de ácido cítrico en agua (el agua añadida frente al aceite equivale a 4,8% en p/p (ácido cítrico) en fase acuosa = 106 mM, en emulsión de agua/aceite = 4,6 mM) durante 30 minutos; transferir 10 ml de la emulsión de agua en aceite pretratada a un tubo; calentar la emulsión en un baño de agua hirviendo durante

30 minutos; centrifugar a 5000 rpm durante 10 minutos, transfiriendo aproximadamente 8 ml de la fase superior (aceite) a un nuevo tubo y dejar asentar durante 24 horas; y extraer 2 g de la fase transparente superior para medir el contenido de fósforo no hidratable (ppm) en el aceite comestible. El método también puede comprender poner en contacto un aceite a un pH de aproximadamente pH 5 a 8 con una solución acuosa de una fosfolipasa A o B (p. ej., PLA1, PLA2 o una PLB), solución que se emulsiona en el aceite hasta que el contenido de fósforo del aceite se reduce a menos de 11 ppm, y después separar la fase acuosa del aceite tratado.

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N° 5.532.163. La invención proporciona procedimientos para el refinado de aceite y grasa, mediante los cuales los fosfolípidos en el aceite y la grasa que se va a tratar se pueden descomponer y eliminar eficazmente. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para el refinado de aceite y grasa que comprende hacer reaccionar, en una emulsión, el aceite y la grasa con una enzima, p. ej., una enzima que tiene una actividad para descomponer enlaces éster de ácido graso y glicerol en glicerofosfolípidos (p. ej., una PLA2); y otro procedimiento en el que el aceite y la grasa tratados con enzimas se lavan con agua o una solución acuosa ácida. En un aspecto, la solución acuosa ácida que se va a usar en la etapa de lavado es una solución de al menos un ácido, p. ej., ácido cítrico, ácido acético, ácido fosfórico y sus sales. En un aspecto, el estado emulsionado se forma usando 30 partes en peso o más de agua por cada 100 partes en peso del aceite y grasa. Puesto que el aceite y la grasa se pueden purificar sin usar la etapa de refinado alcalino convencional, se puede reducir la generación de aguas residuales de lavado y desechos industriales. Además, se mejora el rendimiento de recuperación de aceite porque la pérdida de grasa y aceite neutro debido a su inclusión en estos residuos no se produce en el procedimiento de la invención. En un aspecto, la invención proporciona un procedimiento para refinar aceite y grasa que contienen aproximadamente de 100 a 10.000 ppm de fosfolípidos, que comprende: hacer reaccionar, en un estado emulsionado, dicho aceite y grasa con una enzima proporcionada en la presente memoria que tiene actividad para descomponer enlaces éster de ácido graso y glicerol en glicerofosfolípidos. En un aspecto, la invención proporciona procedimientos para refinar aceite y grasa que contienen aproximadamente de 100 a 10.000 ppm de fosfolípidos, que comprende hacer reaccionar, en un estado emulsionado, aceite y grasa con una enzima descrita en la presente memoria que tiene actividad para descomponer enlaces éster de ácido graso y glicerol en glicerofosfolípidos; y posteriormente lavar el aceite y la grasa tratados con un agua de lavado.

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N° 5.264.367. El contenido de componentes que contienen fósforo y el contenido de hierro de un aceite comestible vegetal o animal, tal como un aceite, p. ej., aceite de soja, que ha sido refinado en húmedo para eliminar el mucílago, se reducen por descomposición enzimática al poner en contacto el aceite con una solución acuosa de una enzima de la invención, p. ej., una fosfolipasa A1, A2 o B, y después separación de la fase acuosa del aceite tratado. En un caso, la invención proporciona un método enzimático para disminuir el contenido de componentes que contienen fósforo y hierro en aceites, que se han refinado para eliminar el mucílago. Un aceite, que se ha refinado para eliminar el mucílago, se puede tratar con una enzima, p. ej., fosfolipasa C, A1, A2 o B. Se pueden lograr contenidos de fósforo inferiores a 5 ppm y contenidos de hierro inferiores a 1 ppm. El bajo contenido de hierro puede ser ventajoso para la estabilidad del aceite.

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar para preparar aceites transesterificados, como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N° 5.288.619. Se proporcionan en la presente memoria métodos para la transesterificación enzimática para preparar un aceite de margarina que tiene tanto un contenido bajo de ácidos grasos trans como contenido bajo de ácidos grasos de cadena intermedia. El método incluye las etapas de proporcionar una mezcla de reacción de transesterificación que contiene un material fuente de ácido esteárico y un aceite vegetal líquido comestible, transesterificar el material fuente de ácido esteárico y el aceite vegetal usando una lipasa específica de posición 1, 3, y finalmente hidrogenar la mezcla de ácidos grasos para proporcionar un material fuente de ácido esteárico reciclado para una reacción de reciclado con el aceite vegetal. También se proporciona en la presente memoria un método a contracorriente para preparar un aceite transesterificado. El método incluye las etapas de proporcionar una zona de reacción de transesterificación que contiene una lipasa específica de posición 1, 3, introducir un aceite vegetal en la zona de transesterificación, introducir un material fuente de ácido esteárico, llevar a cabo el flujo contracorriente de gas licuado subcrítico o gas supercrítico, llevar a cabo una reacción de transesterificación de la corriente de triglicéridos con la corriente de ácido esteárico o monoéster de ácido esteárico en la zona de reacción, extraer una corriente de aceite de margarina de triglicéridos transesterificados, extraer una fase de fluido contracorriente, hidrogenar el ácido esteárico o monoéster de ácido esteárico transesterificado para proporcionar un material fuente de ácido esteárico de reciclaje hidrogenado, e introducir el material fuente de ácido esteárico de reciclaje hidrogenado en la zona de reacción.

En un caso, el compuesto fosfolípido altamente insaturado se puede convertir en un triglicérido mediante el uso adecuado de una fosfolipasa C de la invención para eliminar el grupo fosfato en la posición sn-3 posición, seguido de la síntesis de éster de acilo de 1,3-lipasa. El fosfolípido 2-sustituido se puede usar directamente como ingrediente alimenticio funcional, o se puede hidrolizar posteriormente de forma selectiva en el reactor 160 usando una fosfolipasa C inmovilizada de la invención para producir un 1-diglicérido, seguido de esterificación enzimática como se describe en la presente memoria para producir un triglicérido producto que tiene un componente de ácido graso poliinsaturado 2-sustituido.

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar en un procedimiento de desgomado enzimático de aceite vegetal como se describe, p. ej., en la presente memoria 6.001.640. Este método de la invención comprende una etapa de desgomado en la producción de aceites comestibles. Los aceites vegetales a partir de los cuales se han eliminado fosfátidos hidratables mediante un procedimiento de desgomado acuoso previo se liberan de fosfátidos no hidratables por tratamiento enzimático usando una fosfolipasa de la invención. El procedimiento puede ser suave, económico y respetuoso con el medio ambiente. Se usan fosfolipasas que solo hidrolizan la lisolecitina, pero no la lecitina, en este procedimiento de desgomado.

En un aspecto, para permitir que la enzima de la invención actúe, ambas fases, la fase oleosa y la fase acuosa que contiene la enzima, deben mezclarse íntimamente. Puede no ser suficiente simplemente agitarlos. Se ayuda a una buena dispersión de la enzima en el aceite si se disuelve en una pequeña cantidad de agua, p. ej., 0,5-5% en peso (con respecto al aceite), y se emulsiona en el aceite en esta forma, para formar gotas de menos de 10 micrómetros de diámetro (media ponderada). Las gotitas pueden ser más pequeñas que 1 micrómetro. La agitación turbulenta se puede hacer con velocidades radiales superiores a 100 cm/s. El aceite también se puede hacer circular en el reactor usando una bomba rotatoria externa. La fase acuosa que contiene la enzima también se puede dispersar finamente por medio de una acción de ultrasonidos. Se puede usar un aparato de dispersión.

La reacción enzimática probablemente tiene lugar en la superficie del borde entre la fase oleosa y la fase acuosa. El objetivo de todas estas medidas para el mezclado es crear la mayor superficie posible para la fase acuosa que contiene la enzima. La adición de tensioactivos aumenta la microdispersión de la fase acuosa. En algunos casos, por lo tanto, se añaden tensioactivos con valores de HLB superiores a 9, tales como dodecilsulfato-Na, a la solución de enzima, como se describe, p. ej., en el documento EP-A 0513709. Un método eficaz similar para mejorar la emulsión es la adición de lisolecitina. Las cantidades añadidas pueden estar en el intervalo de 0,001% a 1%, con referencia al aceite. La temperatura durante el tratamiento con enzimas no es crítica. Se pueden usar temperaturas entre 20°C y 80°C, pero esta última solo se puede aplicar durante un tiempo corto. En este aspecto, se usa una fosfolipasa de la invención que tiene una buena tolerancia a la temperatura y/o al pH bajo. Las temperaturas de aplicación de entre 30°C y 50°C son óptimas. El período de tratamiento depende de la temperatura y puede mantenerse más corto con una temperatura creciente. Por lo general, son suficientes tiempos de 0,1 a 10 horas o de 1 a 5 horas. La reacción tiene lugar en un reactor de desgomado, que se puede dividir en etapas, tal como se describe, p. ej., en el documento DE-A 43 39 556. Por lo tanto, es posible la operación continua, junto con la operación por lotes. La reacción se puede llevar a cabo en diferentes etapas de temperatura. Por ejemplo, la incubación puede tener lugar durante 3 horas a 40°C, después durante 1 hora a 60°C. Si la reacción se produce por etapas, esto también abre la posibilidad de ajustar diferentes valores de pH en las etapas individuales. Por ejemplo, en la primera etapa, el pH de la solución se puede ajustar a 7, por ejemplo, y en una segunda etapa a 2,5, mediante la adición de ácido cítrico. Sin embargo, en al menos una etapa, el pH de la solución de enzima debe estar por debajo de 4 o por debajo de 3. Si el pH se ajustó posteriormente por debajo de este nivel, se puede encontrar un deterioro del efecto. Por lo tanto, el ácido cítrico se puede añadir a la solución de la enzima antes de que esta última se mezcle con el aceite.

Después de completar el tratamiento enzimático, la solución enzimática, junto con los productos de descomposición del NHP que contiene, se puede separar de la fase oleosa, en lotes o de forma continua, p. ej., mediante centrifugación. Puesto que las enzimas se caracterizan por un alto nivel de estabilidad y la cantidad de productos de descomposición contenidos en la solución es poco (pueden precipitar como lodo), la misma fase acuosa de la enzima se puede usar varias veces. También existe la posibilidad de liberar la enzima del lodo, véase, p. ej., el documento DE-A 43 39 556, de modo que una solución de enzima que está esencialmente exenta de lodo se puede usar de nuevo. En un aspecto de este procedimiento de desgomado, se obtienen aceites que contienen menos de 15 ppm de fósforo. Un objetivo es un contenido de fósforo de menos a 10 ppm; o, menos de 5 ppm. Con contenidos de fósforo por debajo de 10 ppm, es posible un procesamiento adicional del aceite según el procedimiento de desacidificación por destilación. Una serie de iones adicionales, como magnesio, calcio, zinc, así como hierro, se pueden eliminar del aceite, p. ej., por debajo de 0,1 ppm. Por lo tanto, este producto posee prerequisites ideales para una buena resistencia a la oxidación durante el procesamiento y almacenamiento posteriores.

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

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar para refinar grasa o aceites como se describe, p. ej., en el documento JP 06306386. La invención proporciona procedimientos para refinar una grasa o aceite que comprende una etapa de convertir un fosfolípido en una grasa o un aceite en una sustancia que contiene grupos fosfóricos solubles en agua y eliminar esta sustancia. La acción de una enzima de la invención (p. ej., una PI-PLC) se usa para convertir el fosfolípido en la sustancia. Por lo tanto, se puede refinar una grasa o aceite sin llevar a cabo una etapa de refinado alcalino a partir del cual se producen desechos industriales que contienen agua residual alcalina y una gran cantidad de aceite. La mejora de los rendimientos se puede lograr porque la pérdida de grasa o aceite neutros por escape con los desechos se puede reducir a cero. En un aspecto, las sustancias gomosas se convierten en sustancias solubles en agua y se eliminan como sustancias solubles en agua añadiendo una enzima

de la invención que tiene una actividad de fosfolipasa C en la etapa de desgomado del aceite bruto y realizando tratamiento enzimático. En un aspecto, la fosfolipasa C de la invención tiene una actividad que corta enlaces éster de glicerina y ácido fosfórico en los fosfolípidos. Si es necesario, el método puede comprender lavar el aceite tratado con enzima con agua o una solución acuosa ácida. En un aspecto, la enzima de la invención se añade y reacciona con el aceite bruto. La cantidad de fosfolipasa C usada puede ser de 10 a 10.000 unidades, o, aproximadamente de 100 a 2.000 unidades, por 1 kg de aceite bruto.

Las fosfolipasas y métodos descritos en la presente memoria también se pueden usar para procedimientos de desgomado con agua como se describe, p. ej., en Dijkstra, Albert J., y col., *Oleagineux, Corps Gras, Lipides* (1998), 5 (5), 367-370. En este método de ejemplo, el procedimiento de desgomado con agua se usa para la producción de lecitina y para procedimientos de desgomado en seco que usan un ácido de desgomado y tierra blanqueadora. Este método puede ser económicamente viable solo para aceites con un bajo contenido de fosfátidos, p. ej., aceite de palma, aceites láuricos, etc. Para aceites de semillas que tienen un alto contenido de NHP, se usa el procedimiento de refinado ácido, por el cual este procedimiento se lleva a cabo en el molino de aceite para permitir la eliminación de la goma a través de la comida. En un aspecto, este aceite refinado con ácido es una posible operación de "pulido" que se debe llevar a cabo antes del refinado físico.

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar para procedimientos de desgomado como se describe, p. ej., en Dijkstra, et al., *Res. Dev. Dep.*, N.V. Vandemoortele Coord. Cent., Izegem, Belg. JAOCS, *J. Am. Oil Chem. Soc.* (1989), 66: 1002 - 1009. En este método de ejemplo, el procedimiento de desgomado total implica la dispersión de un ácido tal como H_3PO_4 o ácido cítrico en aceite de soja, permitiendo un tiempo de contacto, y después mezclado de una base como sosa cáustica o silicato de Na en la emulsión de ácido en aceite. Esto mantiene el grado de neutralización lo suficientemente bajo como para evitar la formación de jabones, ya que eso llevaría a una mayor pérdida de aceite. Posteriormente, el aceite se pasaba a un separador centrífugo donde la mayoría de las gomas se eliminaban de la corriente de aceite para producir una fase de goma con un contenido mínimo de aceite. La corriente de aceite después se pasa a un segundo separador centrífugo para eliminar todas las gomas restantes para producir una fase de goma diluida, que se recicla. El lavado y secado o refinado alcalino en línea completan el procedimiento. Después de la adopción del procedimiento de desgomado total, en comparación con el procedimiento de refinado alcalino clásico, se obtiene una mejora global del rendimiento de aproximadamente 0,5%. El aceite totalmente desgomado posteriormente se puede someter a refinado alcalino, blanqueado y desodorizado, o blanqueado y refinado físico.

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar para la eliminación de fosfolípidos no hidratables de un aceite vegetal, p. ej., aceite de soja, como se describe, p. ej., en Hvolby, y col., *Sojakagefabr.*, Copenhagen, Den., *J. Amer. Oil Chem. Soc.* (1971) 48: 503 - 509. En este método de ejemplo, el aceite desgomado en agua se mezcla a diferentes valores de pH fijos con soluciones tampón con y sin Ca^{++} , reactivos de unión a Mg/Ca y tensioactivos. Los fosfolípidos no deshidratables se pueden eliminar en un estado no convertido como un componente de micelas o de emulsionantes mixtos. Además, los fosfolípidos no hidratables se pueden eliminar por conversión en formas disociadas, p. ej., mediante la eliminación de Mg y Ca de los fosfatidos, lo que puede lograrse por acidulación o por tratamiento con complejos de Mg/Ca o reactivos de precipitación de Mg/Ca. La eliminación o conversión química de los fosfolípidos no deshidratables puede dar como resultado una formación de emulsión reducida y una separación mejorada del aceite desacidificado de la capa de emulsión y la borra de neutralización.

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar para el desgomado de aceites vegetales como se describe, p. ej., Buchold, y col., Frankfurt/Main, Alemania. *Fett Wissenschaft Technologie* (1993), 95 (8), 300-304. En este procedimiento de ejemplo para el desgomado de aceites vegetales comestibles, se usan suspensiones acuosas de una enzima, p. ej., fosfolipasa A2, para hidrolizar el ácido graso unido en la posición sn2 del fosfolípido, dando como resultado 1-acil-lisofosfolípidos que son insolubles en aceite y, por lo tanto, más fáciles para la separación física. Incluso la adición de pequeñas cantidades correspondientes a aproximadamente 700 unidades de lecitina/kg de aceite da como resultado una concentración de P residual de menos de 10 ppm, de modo que el refinado químico es reemplazable por refinado físico, eliminando la necesidad de neutralización, separación de borra de neutralización y tratamiento de aguas residuales.

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

Las fosfolipasas y los métodos de la invención también se pueden usar para el desgomado de aceites vegetales como describen, p. ej., Cleenewerck, y col., N.V. Vamo Mills, Izegem, Belg. *Fett Wissenschaft Technologie* (1992), 94: 317 - 22; y, Clausen, Kim; Nielsen, Munk. Novozymes A/S, Den. *Dansk Kemi* (2002) 83 (2): 24-27. Las fosfolipasas y los métodos de la invención pueden incorporar el prerrefinado de aceites vegetales con ácidos como describen, p. ej., Nilsson-Johansson, y col., Fats Oils Div., Alfa-Laval Food Eng. AB, Tumba, Swed. *Fett Wissenschaft Technologie* (1988), 90 (11), 447 - 51; y, Munch, Ernst W. Cereol Deutschland GmbH, Mannheim,

Alemania. Editor(es): Wilson, Richard F. Proceedings of the World Conference on Oilseed Processing Utilization, Cancún, MX, 12-17 de noviembre, (2001), Fecha del encuentro 2000, 17-20.

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

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

Un procedimiento de ejemplo de la invención para el desgomado de aceite (o un procedimiento de desgomado de aceite que usa una enzima de la invención) altera el procedimiento de desodorización para obtener una fracción de diacilglicerol (DAG). En un aspecto alternativo, si es necesario o deseado, después del desgomado asistido por enzimas, las condiciones de desodorización (temperatura, presión, configuración del aparato de destilación) se pueden modificar con el objetivo de mejorar la separación de los ácidos grasos libres (AGL) del diacilglicerol/fracción de triacilglicerol o modificar adicionalmente para separar el diacilglicerol de la fracción de triacilglicerol. Como resultado de estas modificaciones, usando este método de la invención, se puede obtener FFA de calidad alimentaria y diacilglicerol si se usa una enzima de la invención (p. ej., una fosfatasa, o, una PLC o una combinación de PLC y fosfatasa) para el desgomado del aceite comestible en un procedimiento de refinado físico.

En diversos aspectos, la práctica de los métodos de la invención como se describe en la presente memoria (o el uso de las enzimas de la invención), tiene ventajas tales como: disminuir o eliminar el disolvente y la recuperación de disolvente; menores costes de capital; disminuir los costes de refinado corriente abajo, disminuir el uso de productos químicos, equipos, tiempo de procedimiento, energía (calor) y uso de agua/generación de aguas residuales; producir aceite de mayor calidad; el aceite prensado de la torta de presión se puede usar sin refinar en algunas aplicaciones de cocinado y salteado (este aceite prensado puede tener características de estabilidad, color y olor superiores y alto contenido de tocoferol); producir comida de mayor calidad; producir un contenido de grasa más bajo en la comida (actualmente, la comida que sale de la prensa mecánica causa problemas de digestión en los rumiantes); producir atributos nutricionales mejorados - niveles reducidos de glucosinolatos, taninos, sinapina, ácido fítico (como se describe, p. ej., en "Technology and Solvents for Extracting Oilseeds and Nonpetroleum Oils", AOCS 1997).

En un aspecto, la invención proporciona métodos para refinar aceites vegetales (p. ej., aceite de soja, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de palma, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de cártamo, aceite de semilla de girasol, aceite de semilla de sésamo, aceite de salvado de arroz, aceite de coco o aceite de canola) y sus subproductos, y procedimientos para desodorizar lecitina, p. ej., como se describe en la patente de EE.UU. N° 6.172.248, o 6.172.247, en donde los métodos comprenden el uso de al menos una enzima de la invención, p. ej., una fosfolipasa C de la invención. Por lo tanto, la invención proporciona lecitina y aceites vegetales que comprenden al menos una enzima de la invención. En un procedimiento de refinado de ácido orgánico de ejemplo, el aceite vegetal se combina con una solución de ácido orgánico acuoso diluido y se somete a alta cizalladura para dispersar finamente la solución de ácido en el aceite. La mezcla de ácido y aceite resultante se mezcla a baja cizalladura durante un tiempo suficiente para secuestrar contaminantes en una fase de impurezas hidratadas, produciendo una fase de aceite vegetal purificado. En este procedimiento de ejemplo, se puede usar una mezcladora o sistema de reciclaje (p. ej., un tanque de agua de reciclado) y/o un tanque de almacenamiento de fosfátido o lecitina, p. ej., como se describe en las patentes de EE.UU. N° 4.240.972, 4.049.686, 6.172.247 o 6.172.248. Estos procedimientos se pueden llevar a cabo como un procedimiento por lotes o continuo. El aceite vegetal bruto o desgomado se puede suministrar desde un tanque de almacenamiento (p. ej., a través de una bomba) y se puede calentar. El aceite vegetal que se va a purificar puede ser aceite bruto o "desgomado".

En un aspecto, las enzimas fosfatidilinositol-PLC (PI-PLC) de la invención se usan para el desgomado de aceites vegetales. Las enzimas PI-PLC de la invención se pueden usar solas o en combinación con otras enzimas (p. ej., PLC, PLD, enzimas fosfatasa) para mejorar el rendimiento de aceite durante el desgomado de aceites vegetales (incluyendo soja, canola y girasol). El PI-PLC puede convertir preferentemente fosfatidilinositol en 1, 2-diacilglicerol (DAG) y fosfoinositol, pero también puede demostrar actividad en otros fosfolípidos que incluyen fosfatidilcolina,

fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina o ácido fosfatídico, o una combinación de los mismos. La mejora en el rendimiento se realizará como un aumento en la cantidad de DAG en el aceite vegetal tratado con enzimas y un aumento en el aceite neutro, debido a una disminución en la cantidad de aceite arrastrado en la fracción de goma más pequeña que es resultado del tratamiento con enzimas del aceite vegetal.

5 Procesamiento enzimático de semillas oleaginosas

Se describen en la presente memoria composiciones (p. ej., enzimas) y métodos para el procesamiento enzimático de semillas oleaginosas, que incluyen pasta de soja, canola, coco, aguacate y aceituna. En un caso, estos procedimientos pueden aumentar el rendimiento de aceite y mejorar la calidad nutricional de las comidas obtenidas. En algunos casos, el procesamiento enzimático de semillas oleaginosas usando las enzimas y los métodos descritos en la presente memoria, proporcionará beneficios económicos y medioambientales, así como tecnologías alternativas para la extracción de aceite y el procesamiento de alimentos para consumo humano y animal. En casos alternativos, los procedimientos comprenden el uso de fosfolipasas de la invención, otras fosfolipasas, proteasas, fosfatasas, fitasas, xilanasas, amilasas (p. ej., α -amilasas), glucanasas (p. ej., β -glucanasas), poligalacturonasas, galactolipasas, celulasas, hemicelulasas, pectinasas y otras enzimas de degradación de la pared de células vegetales, así como preparaciones de enzimas mixtas y lisados celulares.

En casos alternativos, los procedimientos pueden ponerse en práctica junto con otros procedimientos, p. ej., tratamientos enzimáticos, p. ej., con carbohidrasas, que incluyen celulasa, hemicelulasa y otras actividades de degradación secundaria, o procedimientos químicos, p. ej., extracción con hexano del aceite de soja. El tratamiento enzimático puede aumentar la extractabilidad del aceite en un 8-10% cuando el tratamiento enzimático se lleva a cabo antes de la extracción con disolvente.

En casos alternativos, los procedimientos pueden ponerse en práctica con procedimientos de extracción acuosa. Los métodos de extracción acuosa pueden ser tecnologías alternativas medioambientalmente más limpias para la extracción de aceite. Los bajos rendimientos de extracción del procedimiento acuoso se pueden superar usando enzimas que hidrolizan los polisacáridos estructurales que forman la pared celular de las semillas oleaginosas, o que hidrolizan las proteínas que forman las membranas celulares y de cuerpos lipídicos, p. ej., usando digestiones que comprenden celulasa, hemicelulasa y/o protopectinasa para la extracción de aceite de células de soja. En un caso, los métodos se ponen en práctica con una enzima de la invención como describe Kasai (2003) *J. Agric. Food Chem.* 51: 6217-6222, que describía que la enzima más eficaz para digerir la pared celular era la celulasa.

En un caso, las proteasas se usan en combinación con los métodos descritos en la presente memoria. Se ha evaluado el efecto combinado de variables operativas y actividad enzimática de proteasa y celulasa en los rendimientos de extracción de aceite y proteínas combinados con otros parámetros del procedimiento, como la concentración de enzima, tiempo de hidrólisis, tamaño de partículas y la relación de sólido a líquido. En un caso, los métodos se ponen en práctica con una enzima de la invención según lo descrito por Rosenthal (2001) *Enzyme and Microb. Tech.* 28: 499-509, que informaban que el uso de proteasa puede dar como resultado rendimientos significativamente mayores de aceite y proteína frente al control cuando se usa harina tratada térmicamente.

En un caso, la extracción completa de proteína, pectina y hemicelulosa se usa en combinación con los métodos descritos en la presente memoria. La célula vegetal consiste en una serie de polisacáridos a menudo asociados con o reemplazados por proteínas o compuestos fenólicos. La mayoría de estos hidratos de carbono son solo parcialmente digeridos o mal usados por las enzimas digestivas. La alteración de estas estructuras a través del procesamiento o degradación de enzimas puede mejorar su disponibilidad de nutrientes. En un caso, los métodos se ponen en práctica con una enzima de la invención como se describe Ouhida (2002) *J. Agric. Comida Chem.* 50: 1933-1938, que informaron que se ha logrado una degradación significativa de la celulosa de la pared celular de la soja (hasta 20%) después de la extracción completa de proteínas, pectina y hemicelulosa.

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

Purificación de fitoesteres de aceites vegetales

Se describen en la presente memoria métodos para la purificación de fitoesteroles y triterpenos, o esteroides vegetales, a partir de aceites vegetales. Los fitoesteroides que se pueden purificar usando fosfolipasas y los métodos descritos en la presente memoria, incluyen β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, estigmastanol, β -sitostanol, sitostanol, desmosterol, calinasterol, poriferasterol, clonasterol y brassicasterol. Los esteroides vegetales son productos agrícolas importantes para las industrias de salud y nutricionales. Por lo tanto, las fosfolipasas y los métodos descritos en la presente memoria se usan para hacer emulsionantes para fabricantes de cosméticos e productos intermedios y precursores esteroideos para la producción de productos farmacéuticos hormonales. Las fosfolipasas y los métodos descritos en la presente memoria se usan para preparar (p. ej., purificar) análogos de fitoesteroides y sus ésteres para usar como agentes reductores del colesterol con beneficios de salud cardiológicos.

Las fosfolipasas y los métodos descritos en la presente memoria se usan para purificar esteroides vegetales para reducir los niveles de colesterol en suero inhibiendo la absorción de colesterol en la luz intestinal. Las fosfolipasas y los métodos descritos en la presente memoria se usan para purificar esteroides vegetales que tienen propiedades inmunomoduladoras en concentraciones extremadamente bajas, que incluyen respuesta celular mejorada de linfocitos T y capacidad citotóxica de linfocitos citolíticos naturales contra una línea celular cancerosa.

Las fosfolipasas y los métodos descritos en la presente memoria se usan para purificar esteroides vegetales para el tratamiento de la tuberculosis pulmonar, artritis reumatoide, tratamiento de pacientes infectados por VIH y la inhibición del inmunostres, p. ej., en corredores de maratón.

Las fosfolipasas y los métodos descritos en la presente memoria se usan para purificar componentes de esteroides presentes en las fracciones de esteroides de aceites vegetales básicos (p. ej., aceites de coco, canola, manteca de cacao, maíz, semilla de algodón, linaza, oliva, palma, cacahuete, salvado de arroz, cártamo, sésamo, soja, girasol), tal como sitosterol (40,2-92,3%), campesterol (2,6-38,6%), estigmasterol (0-31%) y 5-avenasterol (1,5 -29%).

Los métodos descritos en la presente memoria pueden incorporar el aislamiento de esteroides derivados de plantas en semillas oleaginosas por extracción con disolvente con cloroformo-metanol, hexano, cloruro de metileno o acetona, seguido de saponificación y purificación cromatográfica para obtener esteroides totales enriquecidos. Alternativamente, las muestras de plantas se pueden extraer por extracción con fluido supercrítico con dióxido de carbono supercrítico para obtener extractos de lípidos totales a partir de los cuales se pueden enriquecer y aislar los esteroides. Para la posterior caracterización y cuantificación de compuestos de esteroles, el aislado bruto se puede purificar y separar por una amplia variedad de técnicas cromatográficas que incluyen cromatografía en columna (CC), cromatografía de gases, cromatografía en capa fina (TLC), cromatografía líquida de alta resolución en fase normal (HPLC), HPLC de fase inversa y electro-cromatografía capilar. De todas las técnicas de aislamiento y separación cromatográficas, los procedimientos de CC y TLC son los más accesibles, disponibles y adecuados para la depuración, purificación, ensayos cualitativos y cálculos preliminares de los esteroides en las muestras de ensayo.

Los fitoesteroides se pierden en los aceites vegetales como subproductos durante los procedimientos de refinado del aceite comestible. Las fosfolipasas y los métodos usan fitoesteroides aislados de dichos subproductos para hacer productos enriquecidos en fitoesteroides aislados de dichos subproductos. Los métodos de aislamiento y purificación de fitoesteroides descritos en la presente memoria pueden incorporar subproductos de la industria de procesamiento de aceite y pueden comprender operaciones tales como destilación molecular, extracción líquido-líquido y cristalización.

Los métodos descritos en la presente memoria pueden incorporar procedimientos para la extracción de lípidos para extraer fitoesteroides. Por ejemplo, los métodos descritos en la presente memoria pueden usar disolventes no polares como hexano (comúnmente usado para extraer la mayoría de los tipos de aceites vegetales) para extraer cuantitativamente fitoesteroides libres y ésteres de ácidos grasos y fitosterilo. Los esterilglucósidos y los esterilglucósidos acilados grasos se extraen solo parcialmente con hexano, y el aumento de la polaridad del disolvente proporciona un mayor porcentaje de extracción. Un procedimiento que se puede usar es el método de cloroformo-metanol de Bligh y Dyer para la extracción de todas las clases de lípidos esteroides, incluidos los fosfolípidos. Un método de ejemplo tanto para separar cualitativamente como para analizar cuantitativamente las clases de lípidos fitoesteroides, comprende la inyección del extracto de lípidos en el sistema de HPLC.

Las fosfolipasas y los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para separar esteroides de grasas y aceites, como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N° 6.303.803. Este es un método para reducir el contenido de esteroides de las grasas y aceites que contienen esteroides. Es un procedimiento eficaz y rentable basado en la afinidad del colesterol y otros esteroides por las moléculas anfipáticas que forman bicapas hidrófobas y fluidas, tales como las bicapas de fosfolípidos. Los agregados de fosfolípidos se ponen en contacto con, p. ej., una grasa o aceite que contiene esteroles en un entorno acuoso y luego se mezclan. La estructura molecular de esta mezcla agregada de fosfolípidos tiene una alta afinidad por el colesterol y otros esteroides, y puede eliminar selectivamente dichas moléculas de las grasas y los aceites. La mezcla de separación acuosa se mezcla durante un tiempo suficiente para reducir selectivamente el contenido de esteroles del producto de grasa/aceite mediante el reparto del esteroles en la parte de los agregados de fosfolípidos. La grasa o aceite reducidos en esteroides se separa de la mezcla de separación acuosa. Alternativamente, la fracción correspondientemente enriquecida en esteroles también se puede aislar de la mezcla de separación acuosa. Estas etapas se pueden realizar a temperatura ambiente, se minimizan los costes implicados en el calentamiento, así como la posibilidad de degradación térmica del producto. Además, se requiere una cantidad mínima de equipo, y dado que todos los materiales requeridos son de calidad alimentaria, los

métodos no requieren precauciones especiales con respecto a la manipulación, eliminación de desechos o contaminación del(los) producto(s) finales.

Las fosfolipasas y los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para eliminar esteroides de grasas y aceites, como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N° 5.880.300. Los agregados de fosfolípidos se ponen en contacto con, p. ej., una grasa o aceite que contiene esteroles en un entorno acuoso y luego se mezclan. Después de un mezclado adecuado, la grasa o aceite reducido en esteroles se separa de la mezcla de separación acuosa. Alternativamente, el fosfolípido enriquecido en esteroles correspondiente también se puede aislar de la mezcla de separación acuosa. Los aceites vegetales (p. ej., vegetales) contienen esteroides vegetales (fitoesteroides) que también se pueden eliminar usando los métodos descritos en la presente memoria. Este método se puede aplicar a un producto de grasa/aceite en cualquier etapa de un ciclo de procesamiento comercial. Por ejemplo, el procedimiento se puede aplicar a aceites refinados, blanqueados y desodorizados ("aceites RBD"), o a cualquier etapa de procesamiento antes de alcanzar el estado RBD. Aunque el aceite RBD puede tener una densidad alterada en comparación con el aceite pre-RBD, los procedimientos se adaptan fácilmente a los aceites bien RBD o pre-RBD, o a varios otros productos de grasa/aceite, variando el contenido de fosfolípidos, composición de fosfolípidos, proporción de fosfolípidos:agua, temperatura, presión, condiciones de mezcla y condiciones de separación como se describe más adelante.

Alternativamente, las enzimas y los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para aislar fitoesteroides u otros esteroides en etapas intermedias en el procesamiento de aceite. Por ejemplo, se sabe que los fitoesteroides se pierden durante la desodorización de los aceites vegetales. Una fracción de destilado que contiene esteroides de, p. ej., una etapa intermedia de procesamiento se puede someter a los procedimientos de extracción de esteroides descritos anteriormente. Esto proporciona una lecitina enriquecida en esteroides u otro material de fosfolípidos que se puede procesar adicionalmente para recuperar los esteroides extraídos.

Composiciones detergentes

Se describen en la presente memoria composiciones detergentes que comprenden una o más fosfolipasas de la invención, y métodos para preparar y usar estas composiciones. Las composiciones detergentes pueden ser una composición acuosa de una y dos partes, una composición líquida no acuosa, un sólido moldeado, una forma granular, una forma en partículas, un comprimido por presión, un gel y/o una pasta y una forma de suspensión. También se proporcionan en la presente memoria métodos capaces de una eliminación rápida de manchas de comida de grasa, películas de residuos de alimentos y otras composiciones alimentarias menores, que usan estas composiciones detergentes. Las fosfolipasas de la invención pueden facilitar la eliminación de manchas mediante hidrólisis catalítica de fosfolípidos. Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en detergentes para el lavado de vajillas, en detergentes para el lavado de textiles.

El contenido real de enzima activa depende del método de fabricación de una composición detergente y no es crítico, suponiendo que la solución detergente tiene la actividad enzimática deseada. En un caso, la cantidad de fosfolipasa presente en la solución final varía de aproximadamente 0,001 mg a 0,5 mg por gramo de la composición detergente. La enzima particular elegida para el uso en el procedimiento y los productos descritos en la presente memoria depende de las condiciones de uso final, que incluyen la forma física del producto, el pH de uso, la temperatura de uso y los tipos de manchas que se van a degradar o alterar. La enzima se puede elegir para proporcionar actividad y estabilidad óptimas para cualquier conjunto dado de condiciones de uso. Los polipéptidos descritos en la presente memoria son activos en los intervalos de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 y en el intervalo de temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 95°C. Los detergentes descritos en la presente memoria pueden comprender tensioactivos catiónicos, no iónicos semipolares o de ion híbrido; o, sus mezclas.

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

Se describen en la presente memoria composiciones de limpieza o desinfectantes que incluyen composiciones detergentes y/o desinfectantes para limpiar y/o desinfectar superficies duras, composiciones detergentes para limpiar y/o desinfectar tejidos, composiciones para lavavajillas, composiciones de limpieza bucal, composiciones para limpieza de dentaduras y/o soluciones para limpiar lentes de contacto.

Se describe en la presente memoria un método para lavar un objeto, que comprende poner en contacto el objeto con una fosfolipasa de la invención en condiciones suficientes para el lavado. Una fosfolipasa de la invención se puede incluir como un aditivo de detergente. La composición detergente descrita en la presente memoria se puede

formular, p. ej., como una composición detergente para lavado a mano o a máquina que comprende una fosfolipasa de la invención. Un aditivo para el lavado de ropa adecuado para el tratamiento previo de telas manchadas puede comprender una fosfolipasa de la invención. Una composición suavizante de telas puede comprender una fosfolipasa de la invención. Alternativamente, una fosfolipasa de la invención se puede formular como una

5 composición detergente para uso en operaciones generales de limpieza de superficies duras en el hogar. En casos alternativos, los aditivos de detergentes y las composiciones detergentes pueden comprender una o más enzimas diferentes tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, otra fosfolipasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una oxidasas, p. ej., una lactasa y/o una peroxidasa. Las propiedades de la(s) enzima(s) se eligen para que sean compatibles con el detergente seleccionado

10 (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.) y la(s) enzima(s) están presentes en cantidades eficaces. En un caso, las enzimas fosfolipasa de la invención se usan para eliminar materiales malolientes de telas. Se describen diferentes composiciones detergentes y métodos para fabricarlas que se pueden usar en la práctica del en, p. ej., las patentes de EE.UU. N° 6.333.301; 6.329.333; 6.326.341; 6.297.038; 6.309.871; 6.204.232; 6.197.070; 5.856.164.

15 Tratamiento de residuos

Las fosfolipasas de la invención se pueden usar en el tratamiento de residuos. Se proporciona en la presente memoria un procedimiento de digestión de residuos sólidos que usa fosfolipasas de la invención. Los métodos pueden comprender reducir la masa y el volumen de los residuos sólidos sustancialmente no tratados. Los residuos sólidos se pueden tratar con un proceso digestivo enzimático en presencia de una solución enzimática (que incluye

20 fosfolipasas de la invención) a una temperatura controlada. Los residuos sólidos se pueden convertir en un residuo licuado y cualquier residuo sólido residual. El residuo licuado resultante se puede separar de dicho residuo solidificado residual. Véase p. ej., la patente de EE.UU. N° 5.709.796.

Detoxificación

Las fosfolipasas (p. ej., PI-PLC de la invención) se pueden usar en procedimientos de detoxificación, p. ej., para la detoxificación de endotoxinas, p. ej., composiciones que comprenden lipopolisacáridos (LPS), y el método proporciona procedimientos de detoxificación que usan al menos una enzima descrita en la presente memoria, p. ej., un polipéptido que comprende una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 6 y que tiene una o más mutaciones como se expone en las tablas 12 a 15, o un fragmento enzimáticamente activo de la misma.

En un caso, una fosfolipasa de la invención se usa para detoxificar un lipopolisacárido (LPS). En un caso, esta detoxificación es por desacilación de cadenas de ácidos grasos 2' y/o 3' del lípido A. En un caso, se usa una fosfolipasa (p. ej., una PI-PLC) de la invención para hidrolizar una cadena de 2'-lauroilo y/o 3'-miristoilo de un lípido, p. ej., un lípido A (p. ej., de una endotoxina bacteriana). En un caso, el procedimiento se usa para destruir una endotoxina, p. ej., una toxina de una bacteria Gram negativa, como de *E. coli*. En un caso, se usa una fosfolipasa (p. ej., una PI-PLC) de la invención para mejorar los efectos de la intoxicación por toxinas (p. ej., de una infección por

30 Gram negativos en curso), o para prevenir profilácticamente los efectos de la endotoxina durante una infección (p. ej., una infección en un animal o un ser humano). Por consiguiente, se proporciona en la presente memoria una composición farmacéutica que comprende una fosfolipasa (p. ej., PI-PLC) de la invención, y el método que usa una hidrolasa para mejorar o prevenir los efectos tóxicos de los lipopolisacáridos (LPS), p. ej., durante la septicemia.

Procesamiento de alimentos

Las fosfolipasas de la invención se pueden usar para procesar alimentos, p. ej., para cambiar su estabilidad, vida útil, sabor, textura, mejorar su estado nutricional y similares. Por ejemplo, en un caso, las fosfolipasas de la invención se usan para generar fosfolípidos ácidos para controlar el sabor amargo en los alimentos.

Se describen en la presente memoria procedimientos de fabricación de queso que usan fosfolipasas (y, por lo tanto, también se describen quesos que comprenden fosfolipasas). En un caso, las enzimas descritas en la presente memoria (p. ej., fosfolipasa A, lisofosfolipasa o una combinación de las mismas) se usan para procesar quesos para mejorar el sabor, aumentar el rendimiento y/o "estabilizar" quesos, p. ej., reduciendo la tendencia a "salir aceite", o, en un caso, las enzimas descritas en la presente memoria se usan para producir queso a partir de leche de queso. Estos procedimientos pueden incorporar cualquier método o protocolo, p. ej., como se describe, p. ej., en las patentes de EE.UU. N° 6.551.635 y 6.399.121, WO 03/070013, WO 00/054601. Por ejemplo, en un aspecto, las

45 fosfolipasas se usan para estabilizar la emulsión de grasa en la leche o composiciones que comprenden leche, p. ej., crema, y se usan para estabilizar composiciones de leche, p. ej., para la fabricación de cremas o licores cremosos. Se describe en la presente memoria un procedimiento para potenciar el sabor de un queso usando al menos una enzima descrita en la presente memoria, comprendiendo el procedimiento incubar una proteína, una grasa y una proteasa y una lipasa en un medio acuoso en condiciones que producen un sabor mejorado de queso (p. ej., menos amargor), p. ej., como se describe en el documento WO 99/66805. En un caso, las fosfolipasas se usan para mejorar el sabor en un queso (p. ej., una cuajada) mezclando con agua, una proteasa y una lipasa a una temperatura elevada, p. ej., entre aproximadamente 75°C y 95°C, como se describe, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 4.752.483. En un caso, las fosfolipasas se usan para acelerar el envejecimiento del queso mediante la adición de una enzima descrita en la presente memoria (p. ej., una lipasa o una fosfolipasa) a un queso (p. ej., una

50

55

leche de queso) antes de añadir un coagulante a la leche, o añadir una enzima descrita en la presente memoria a una cuajada con sal antes de compresión, p. ej., como se describe, p. ej., en la patente de EE.UU. N° 4.707.364. En un caso, se usa una lipasa descrita en la presente memoria para degradar un triglicérido en la grasa de la leche para liberar ácidos grasos libres, dando como resultado una mejora del sabor. También se puede usar una proteasa en cualquiera de estos procedimientos, véase, p. ej., Brindisi (2001) *J. of Food Sci.* 66: 1100-1107. En otro aspecto, se puede usar una combinación de esterases, lipasas, fosfolipasas y/o proteasas en estos o en cualquier procedimiento descrito en la presente memoria.

En un caso, una fosfolipasa descrita en la presente memoria se usa para reducir el contenido de componentes de fósforo en un alimento, p. ej., un aceite, tal como un aceite vegetal que tiene un alto contenido de fósforo no hidratable, p. ej., como se describe en el documento WO 98/26057.

Conversión de biomasa y producción de biocombustibles limpios

Se describen en la presente memoria polipéptidos, que incluyen enzimas (fosfolipasas (PL), p. ej., PLA, PLC o PLD) y anticuerpos, y métodos para la conversión de una biomasa o cualquier material lignocelulósico (p. ej., cualquier composición que comprende celulosa, hemicelulosa y lignina), en un combustible (p. ej., bioetanol, biopropanol, biobutanol, biopropanol, biometanol, biodiésel), además de piensos, alimentos y productos químicos. Por ejemplo, en casos alternativos, la(s) enzimas usadas para la conversión de biomasa y para la producción de biocombustibles pueden tener una o más actividades de fosfolipasa, que incluyen una actividad de fosfolipasa C (PLC); una actividad de PI-PLC, una actividad de fosfolipasa A (PLA), tal como una actividad de fosfolipasa A1 o fosfolipasa A2; una actividad de fosfolipasa D (PLD), tal como una actividad de fosfolipasa D1 o una fosfolipasa D2; una actividad de fosfolipasa B (PLB), p. ej., una actividad de fosfolipasa y lisofosfolipasa (LPL) o una actividad de fosfolipasa y lisofosfolipasa transacilasa (LPTA) o una actividad de fosfolipasa y lisofosfolipasa (LPL) y lisofosfolipasa transacilasa (LPTA); o actividad de patatina, o una de sus combinaciones.

Por lo tanto, las composiciones y métodos descritos en la presente memoria proporcionan alternativas eficaces y sostenibles o asociadas al uso de productos basados en petróleo, p. ej., como una mezcla de un biocombustible tal como biometanol, bioetanol, biopropanol, biobutanol, y similares, a combustible diésel, gasolina, queroseno y similares. Se proporcionan en la presente memoria organismos que expresan enzimas de la invención para la participación en ciclos químicos que implican la conversión de biomasa natural. En un caso, las enzimas y los métodos para la conversión se usan en conjuntos de enzimas para el procesamiento de fosfolípidos. Se proporcionan en la presente memoria métodos para descubrir e implementar las enzimas más eficaces para permitir estos importantes procedimientos industriales nuevos de "conversión de biomasa" y energía alternativa.

Las composiciones y métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para proporcionar alternativas eficaces y sostenibles o asociada al uso de productos basados en el petróleo, p. ej., como una mezcla de bioetanol, biopropanol, biobutanol, biopropanol, biometanol y/o biodiésel y gasolina. Se proporcionan en la presente memoria organismos que expresan enzimas de la invención para la participación en ciclos químicos que implican la conversión de biomasa natural. Se proporcionan en la presente memoria métodos para descubrir e implementar las enzimas más eficaces para permitir estos importantes procedimientos industriales nuevos de "conversión de biomasa" y energía alternativa.

Se describen en la presente memoria métodos, enzimas y mezclas de enzimas o "cócteles", para procesar un material, p. ej., un material de biomasa, que comprende un celooligosacárido, un oligómero arabinxilano, una lignina, una lignocelulosa, un xilano, un glucano, una celulosa y/o un azúcar fermentable, que comprenden poner en contacto la composición con un polipéptido descrito en la presente memoria, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico descrito en la presente memoria, en donde opcionalmente el material deriva de un cultivo agrícola (p. ej., trigo, cebada, patatas, pasto varillas, madera de álamo), es un subproducto de una producción de alimento o un pienso, es un producto residual lignocelulósico, o es un residuo vegetal o papel residual o producto de papel residual, y opcionalmente el residuo vegetal comprende tallos, hojas, cáscaras, cortezas, mazorcas de maíz o maíz, rastrojo de maíz, fibra de maíz, heno, paja (p. ej., paja de arroz o paja de trigo), bagazo de caña de azúcar, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de cítricos y cáscaras de cítricos, madera, aclareos de madera, astillas de madera, pulpa de madera, residuos de pulpa, desechos de madera, virutas de madera y serrín, desechos y residuos de construcción y/o demolición (p. ej., madera, virutas de madera y serrín), y opcionalmente el residuo de papel comprende papel de fotocopia descartado o usado, papel de impresora, papel de cuaderno, papel de bloc de notas, papel de máquina de escribir, periódicos, revistas, materiales de embalaje de cartón y papel, y materiales de papel reciclado. Además, se pueden usar los residuos urbanos, p. ej., la fracción de papel de los residuos sólidos municipales, los residuos de madera municipales y los residuos verdes municipales, junto con otros materiales que contienen azúcar, almidón y/o celulosa. En casos alternativos, el procesamiento del material, p. ej., el material de biomasa, genera un bioalcohol, p. ej., un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol.

Alternativamente, el polipéptido se puede expresar en el material vegetal de biomasa o la propia materia prima.

Los métodos descritos en la presente memoria también incluyen tomar un material de biomasa o vegetal procesado, o "convertido" (p. ej., por el procedimiento que comprende el uso de una enzima de esta invención), p. ej., un material que comprende lípidos o lignocelulósico (procesado por, p. ej., enzimas de la invención) y convertirlo en un

combustible (p. ej., un bioalcohol, p. ej., un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel) por fermentación (p. ej., mediante levaduras) y/o por síntesis química. En un caso, los azúcares producidos se fermentan y/o los productos no fermentables se gasifican.

5 Los métodos descritos en la presente memoria también incluyen la conversión de algas, aceites vegetales tales como aceites vegetales vírgenes o aceites vegetales residuales, grasas y grasas animales (p. ej., sebo, manteca de cerdo y grasa amarilla) o aguas residuales, usando enzimas de la invención, y convertirlos en un combustible (p. ej., un bioalcohol, p. ej., un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel) por fermentación y/o síntesis química o conversión.

10 Las enzimas de la invención (que incluyen, p. ej., organismos, tales como microorganismos, p. ej., hongos, levaduras o bacterias, que producen y en algunos casos secretan enzimas recombinantes de la invención) se pueden usar o incluir/integrar en cualquier etapa de cualquier procedimiento de conversión de biomasa, p. ej., en cualquier etapa, varias etapas, o incluir en todas las etapas, o todos los siguientes métodos de procedimientos de conversión de biomasa, o todas estas alternativas de biocombustible:

15 - Combustión directa: la quema de material por calor directo y es la tecnología de biomasa más simple; puede ser muy económico si hay una fuente de biomasa cerca.

- Pirólisis: es la degradación térmica de la biomasa por calor en ausencia de oxígeno. En un caso, la biomasa se calienta a una temperatura entre aproximadamente 426,7 y 760°C (800 y 1400 grados Fahrenheit), pero no se introduce oxígeno para soportar la combustión, lo que da como resultado la creación de gas, fueloil y carbón.

20 - Gasificación: la biomasa se puede usar para producir metano por calentamiento o digestión anaeróbica. Syngas, una mezcla de monóxido de carbono e hidrógeno, puede obtenerse de la biomasa.

- Gas de vertedero: se genera por la descomposición (digestión anaeróbica) de la basura enterrada en los vertederos. Cuando los residuos orgánicos se descomponen, generan gas que consiste en aproximadamente 50% de metano, el componente principal del gas natural.

25 - Digestión anaeróbica: convierte la materia orgánica en una mezcla de metano, el componente principal del gas natural y dióxido de carbono. En un caso, la biomasa, tal como las aguas residuales (aguas usadas), estiércol o residuos de procesamiento de alimentos, se mezcla con agua y se introduce en un tanque de digestión sin aire.

- Fermentación

30 Fermentación de alcohol: El alcohol combustible se produce convirtiendo la masa celulósica y/o el almidón en azúcar, fermentando el azúcar en alcohol, y después separando la mezcla de alcohol y agua por destilación. Materias primas tales como cultivos específicos (p. ej., trigo, cebada, patata, pasto, madera de álamo), residuos y desechos agrícolas (p. ej., paja de arroz, rastrojo de maíz, paja de trigo, bagazo de caña de azúcar, cascara de arroz, fibra de maíz, pulpa de remolacha azucarera, pulpa de cítricos y cáscaras de cítricos), residuos forestales (p. ej., madera dura y aclareos de maderas blandas, residuos de madera dura y madera blanda procedentes de operaciones madereras, virutas de madera y serrín), residuos urbanos (p. ej., fracción de papel de residuos sólidos municipales, residuos de madera municipal, residuos verdes municipales), residuos de madera (p. ej., residuos de aserraderos, residuos de fábricas de pasta de papel, residuos de construcción, residuos de demolición, virutas de madera y serrín) y papel usado u otros materiales que contienen azúcar, almidón y/o la celulosa, se pueden convertir en azúcares y luego en alcohol por fermentación con levaduras. Alternativamente, los materiales que contienen azúcares se pueden convertir directamente en alcohol por fermentación.

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

45 Biodiésel: El biodiésel es una mezcla de ésteres alquílicos de ácidos grasos hechos de aceites vegetales, grasas animales o grasas recicladas. El biodiésel se puede usar como combustible para vehículos en su forma pura, pero generalmente se usa como un aditivo de diésel del petróleo para reducir los niveles de partículas, monóxido de carbono, hidrocarburos y tóxicos del aire de los vehículos con motor diésel.

50 Hidrólisis: incluye la hidrólisis de un compuesto, p. ej., una biomasa, tal como un material lignocelulósico, catalizada usando una enzima de la presente invención.

Cogeneración: es la producción simultánea de más de una forma de energía usando un solo combustible e instalación. En un caso, la cogeneración de biomasa tiene más potencial de crecimiento que la generación de biomasa sola porque la cogeneración produce tanto calor como electricidad.

En un caso, los polipéptidos descritos en la presente memoria tienen actividad de hidrolasa, p. ej., fosfolipasa, patatina y/u otra actividad enzimática relacionada para generar un combustible (p. ej., un bioalcohol, p. ej., un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel) a partir de un material, p. ej., una biomasa, tal como composiciones derivadas de plantas y animales, que incluyen cualquier cultivo agrícola u otra materia prima renovable, un residuo agrícola o un residuo animal, los componentes orgánicos de residuos municipales e industriales, o residuos o desechos de construcción o demolición o microorganismos como algas o levaduras.

En un caso, los polipéptidos descritos en la presente memoria se usan en procedimientos para convertir cualquier biomasa, p. ej., una biomasa animal, de algas y/o vegetal que incluye biomasa lignocelulósica o que comprende lípidos, en un combustible (p. ej., un bioalcohol, p. ej., un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel), o de lo contrario se usan en procedimientos para hidrolizar o digerir biomateriales de manera que se pueden usar como un combustible (p. ej., un bioalcohol, p. ej., un bioetanol, biometanol, biobutanol o biopropanol, o biodiésel), o para hacer que sea más fácil procesar la biomasa en un combustible.

Las enzimas que incluyen la mezcla de enzimas o "cócteles" descritas en la presente memoria, también se pueden usar en el refinado de glicerina. El subproducto de glicerina contiene catalizador sin reaccionar y jabones que se neutralizan con un ácido. El agua y el alcohol se eliminan para producir 50% a 80% de glicerina bruta. Los contaminantes restantes incluyen grasas y aceites sin reaccionar, que se pueden procesar usando los polipéptidos de la invención. En una gran planta de biodiésel, la glicerina se puede purificar más, p. ej., hasta una pureza del 99% o superior, para las industrias farmacéutica y cosmética.

Los combustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles o biodiésel) preparados usando los polipéptidos de la invención, que incluyen la mezcla de enzimas o "cócteles" descritos en la presente memoria, se pueden usar con compuestos oxigenados de combustible para mejorar las características de combustión. La adición de oxígeno produce una combustión más completa, lo que reduce las emisiones de monóxido de carbono. Este es otro beneficio ambiental de reemplazar los combustibles derivados del petróleo por biocombustibles. Un biocombustible preparado usando las composiciones y/o métodos descritos en la presente memoria se puede mezclar con gasolina para formar una mezcla E10 (aproximadamente 5% a 10% de etanol y aproximadamente 90% a 95% de gasolina), pero se puede usar en concentraciones más altas tales como E85 o en su forma pura. Un biocombustible hecho usando las composiciones y/o métodos descritos en la presente memoria se pueden combinar con el diésel del petróleo para formar una mezcla B20 (20% de biodiésel y 80% de diésel del petróleo), aunque se pueden usar otros niveles de mezcla hasta B100 (biodiésel puro).

También se describen en la presente memoria procedimientos para hacer biocombustibles (que incluyen bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles o biodiésel) a partir de composiciones que comprenden cualquier biomasa, p. ej., una biomasa animal, de algas y/o vegetal que incluye biomasa lignocelulósica o que comprende lípidos. El material de biomasa se puede obtener de cultivos agrícolas, como un subproducto de la producción de alimentos o piensos, o como productos de desecho lignocelulósicos, tales como residuos vegetales, papel usado o residuos o desechos de la construcción y/o demolición. Los ejemplos de fuentes vegetales adecuadas o residuos vegetales para el tratamiento con polipéptidos de la invención incluyen algas marinas, algas, granos, semillas, tallos, hojas, cáscaras, cortezas, mazorcas de maíz, rastrojo de maíz, paja, hierbas (p. ej., hierba india, tal como *Sorghastrum nutans*; o, pasto varilla, p. ej., especies de *Panicum*, tales como *Panicum virgatum*), y similares, así como madera, astillas de madera, pulpa de madera y serrín. Ejemplos de residuos de papel adecuados para el tratamiento con polipéptidos de la invención incluyen papel de fotocopia descartado, papel de impresora de ordenador, papel para cuaderno, papel para bloc de notas, papel para máquina de escribir y similares, así como periódicos, revistas, cartón y materiales de embalaje basados en papel. Los ejemplos de residuos y desechos de construcción y demolición incluyen madera, restos de madera, virutas de madera y serrín.

En un caso, las enzimas, que incluyen la mezcla de enzimas o "cócteles" descritos en la presente memoria, y los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar junto con medios más "tradicionales" para producir etanol, metanol, propanol, butanol, propanol y/o diésel a partir de biomasa, p. ej., como métodos que comprenden hidrolizar lípidos y/o materiales lignocelulósicos sometiendo en seco cualquier biomasa, p. ej., una biomasa animal, de algas y/o vegetal que incluye material de biomasa lignocelulósica o que comprende lípidos, en un reactor a un catalizador compuesto por una solución diluida de un ácido fuerte y una sal de metal; esto puede reducir la energía de activación, o la temperatura, de la hidrólisis de la celulosa para obtener mayores rendimientos de azúcar; ver, p. ej., las patentes de EE.UU. Nº 6.660.506 y 6.423.145.

Otro método de ejemplo que incorporaba el uso de enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles" descrita en la presente memoria, comprende hidrolizar cualquier biomasa, p. ej., una biomasa animal, de algas y/o vegetal, incluyendo biomasa que comprende lípidos o lignocelulósica que contiene hemicelulosa, celulosa y lignina, o cualquier otro polisacárido que pueda hidrolizarse mediante una enzima descrita en la presente memoria, sometiendo el material a una primera etapa de hidrólisis en un medio acuoso a una temperatura y presión elegidas para efectuar principalmente la despolimerización de hemicelulosa sin despolimerización importante de celulosa a glucosa. Esta etapa da como resultado una suspensión en la que la fase acuosa líquida contiene monosacáridos disueltos que resultan de la despolimerización de hemicelulosa y una fase sólida que contiene celulosa y lignina. Una segunda etapa de hidrólisis puede comprender condiciones tales que al menos una parte importante de la

celulosa se despolimeriza, dando como resultado dicha etapa una fase acuosa líquida que contiene productos de despolimerización de celulosa disueltos/solubles. Véase, p. ej., la patente de EE.UU. N° 5.536.325. Las enzimas de la invención (que incluyen las mezclas descritas, o "cócteles" de enzimas) se pueden añadir en cualquier etapa de este procedimiento de ejemplo.

- 5 Otro método de ejemplo que incorporaba el uso de enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles" descrita en la presente memoria, comprende procesar cualquier biomasa, p. ej., una biomasa animal, de algas y/o vegetal incluyendo material de biomasa que comprende lípidos o lignocelulósica en una o más etapas de hidrólisis con ácido diluido con aproximadamente 0,4% a 2% de ácido fuerte; y tratar un componente lignocelulósico sólido sin reaccionar del material de biomasa hidrolizada con ácido por designificación alcalina para producir
- 10 precursores para termoplásticos y derivados biodegradables. Véase, p. ej., la patente de EE.UU. N° 6.409.841. Las enzimas de la invención se pueden añadir en cualquier etapa de este procedimiento de ejemplo.

- Otro método de ejemplo que incorporaba el uso de enzimas de la invención, incluyendo la mezcla de enzimas o "cócteles" descrita en la presente memoria, comprende prehidrolizar de cualquier biomasa, p. ej., un animal, algas y/o biomasa vegetal que incluye material de biomasa lignocelulósica o que comprende lípidos en un reactor de prehidrólisis; añadir un líquido ácido al material sólido (p. ej., material lignocelulósico) para hacer una mezcla; calentar la mezcla a la temperatura de reacción; mantener la temperatura de reacción durante un tiempo suficiente para fraccionar el material lignocelulósico en una parte solubilizada que contiene al menos aproximadamente 20% de la lignina del material lignocelulósico y una fracción sólida que contiene celulosa; eliminar una parte solubilizada de la fracción sólida mientras está a la temperatura de reacción o cerca de ella, en donde la celulosa en la fracción
- 15 sólida se hace más susceptible a la digestión enzimática; y recuperar una parte solubilizada. Véase, p. ej., la patente de EE.UU. N° 5.705.369. Las enzimas de la invención se pueden añadir en cualquier etapa de este procedimiento de ejemplo.
- 20

- Se describen en la presente memoria métodos para preparar composiciones de combustible para motores (p. ej., para motores de encendido por chispa) basados en hidrocarburos líquidos mezclados con un alcohol de calidad combustible preparado usando una enzima o un método descrito en la presente memoria. En un caso, los combustibles fabricados mediante el uso de una enzima descrita en la presente memoria comprenden, p. ej., mezclas de etanol y gas natural licuado o gas de hulla licuado. En un caso, un codisolvente es 2-metiltetrahidrofurano derivado de biomasa (MTHF). Ver, p. ej., la patente de EE.UU. N° 6.712.866.
- 25

- En un caso, los métodos descritos en la presente memoria para la degradación enzimática de cualquier biomasa, p. ej., una biomasa animal, de algas y/o vegetal que incluye biomasa lignocelulósica o que comprende lípidos, p. ej., para la producción de biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles, o biodiésel) a partir de cualquier material orgánico, y también puede comprender el uso del tratamiento ultrasónico del material de biomasa; véase, p. ej., la patente de EE.UU. N° 6.333.181.
- 30

- En otro caso, los métodos descritos en la presente memoria para producir biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles o biodiésel) a partir de un sustrato celulósico, comprenden proporcionar una mezcla de reacción en forma de una suspensión que comprende sustrato celulósico, una enzima descrita en la presente memoria y una agente de fermentación (p. ej., dentro de un recipiente de reacción, tal como un biorreactor alimentado con sólidos de forma semicontinua), y la mezcla de reacción se hace reaccionar en condiciones suficientes para iniciar y mantener una reacción de fermentación (como se describe, p. ej., en la solicitud de patente de EE.UU. N° 20060014260). En un caso, el experimento o los cálculos teóricos pueden determinar una frecuencia de alimentación óptima. En un caso, se proporcionan cantidades adicionales del sustrato celulósico y la enzima en el recipiente de reacción en uno o varios intervalos de acuerdo con la frecuencia de alimentación optimizada.
- 35
- 40

- Un procedimiento de ejemplo para fabricar biocombustibles (que incluye bioalcoholes tales como bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles o biodiésel) se describe en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 20050069998; 20020164730; y en un caso comprende etapas de trituración de cualquier biomasa, p. ej., una biomasa animal, de algas y/o vegetal que incluye biomasa lignocelulósica o que comprende lípidos (p. ej., a un tamaño de 15-30 mm), someter el producto obtenido a pretratamiento de explosión de vapor (p. ej., a una temperatura de 190-230°C) durante entre 1 y 10 minutos en un reactor; recoger el material pretratado en un ciclón o producto de fabricación relacionado; y separar las fracciones líquidas y sólidas por filtración en un filtro prensa, introducir la fracción sólida en un depósito de fermentación y añadir una o más enzimas, p. ej., una enzima celulasa y/o beta-glucosidasa (p. ej., disuelta en tampón de citrato pH 4,8).
- 45
- 50

- Otro procedimiento de ejemplo para fabricar biocombustibles (incluyendo bioalcoholes tales como bioetanos, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles o biodiésel) que comprenden bioetanoles, biometanoles, biobutanoles o biopropanoles usando enzimas descritas en la presente memoria, comprende pretratar un material de partida que comprende cualquier biomasa, p. ej., una biomasa animal, de algas y/o vegetal que incluye una materia prima de biomasa lignocelulósica o que comprende lípidos, que comprende al menos hemicelulosa y celulosa. En un caso, el material de partida comprende patatas, soja (colza), cebada, centeno, maíz, avena, trigo, remolacha o caña de azúcar, o un componente o residuo o subproducto de producción de alimentos o piensos. El material de partida ("materia prima") se hace reaccionar en condiciones que rompen la estructura de la fibra de la planta para efectuar al
- 55
- 60

menos una hidrólisis parcial de la hemicelulosa y la celulosa. Las condiciones disruptivas pueden comprender, p. ej., someter el material de partida a una temperatura media de 180°C a 270°C, a pH de 0,5 a 2,5, durante un período de aproximadamente 5 segundos a 60 minutos; o, temperatura de 220°C a 270°C, a pH de 0,5 a 2,5, durante un período de 5 segundos a 120 segundos, o equivalente. Esto genera una materia prima con mayor accesibilidad para ser digerida por una enzima, p. ej., una enzima celulasa. Patente de EE.UU. N° 6.090.595.

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

Las glucanasas (o celulasas), mananasas, xilanasas, amilasas, xantanasas y/o glucosidasas, p. ej., celobiohidrolasas, mananasas y/o beta-glucosidasas se pueden usar en la conversión de biomasa a combustibles, y en la producción de etanol, p. ej., como se describe en las solicitudes PCT N° WO 0043496 y WO 8100857. Las glucanasas (o celulasas), mananasas, xilanasas, amilasas, xantanasas y/o glucosidasas, p. ej., celobiohidrolasas, mananasas y/o beta-glucosidasas se pueden usar para producir azúcares fermentables y biomasa que contiene glucano que se puede convertir en etanol combustible.

Biodiésels: Uso de enzimas descritas en la presente memoria para fabricarlos

Se describen en la presente memoria composiciones, que incluyen enzimas descritas en la presente memoria, y métodos para fabricar combustibles biodiésel, incluyendo cualquier biocombustible, p. ej., un biodiésel, que comprende ésteres alquílicos preparados a partir de la transesterificación de aceites vegetales y/o grasas animales.

Por ejemplo, en casos alternativos, los polipéptidos descritos en la presente memoria, que incluyen la mezcla de enzimas o "cócteles" descritos en la presente memoria, se usan en procedimientos para un procedimiento de transesterificación haciendo reaccionar un alcohol (como etanol, propanol, butanol, propanol, metanol) con un aceite de triglicéridos contenido en un aceite vegetal, grasa animal o grasas recicladas, formando ésteres alquílicos de ácidos grasos, incluyendo biodiésel, y glicerina. En un caso, el biodiésel está hecho a partir de aceite de soja o aceites de cocina reciclados. Las grasas de animales, otros aceites vegetales y otros aceites reciclados también se pueden usar (y procesarse mediante enzimas, p. ej., fosfolipasas, de la invención) para producir un biodiésel, dependiendo de sus costes y disponibilidad. En otro caso, se usan mezclas de todo tipo de grasas y aceites para producir un combustible biodiésel usando enzimas de la invención.

Se describen en la presente memoria composiciones, que incluyen enzimas de la invención, y métodos, para procesar "grasa amarilla", un término acuñado inicialmente por la industria de desperdicios de matadero. La grasa amarilla que se puede procesar usando las composiciones y métodos descritos en la presente memoria incluye grasa de aceites de fritura, p. ej., de freidoras o filtros de grasa de restaurantes, o de diferentes grados de sebo (p. ej., de menor calidad) de plantas de desperdicios de matadero. Por lo tanto, también se proporcionan en la presente memoria aceites, grasas, aceites de fritura, aceites vegetales, grasas de residuos de restaurante y grados de procedimientos de sebo que comprenden al menos una enzima de esta invención.

La grasa amarilla procesada usando composiciones descritas en la presente memoria, que incluyen enzimas, y los métodos descritos en la presente memoria, se pueden usar para pulverizar en carreteras, p. ej., para control de polvo, o para aditivos o alimentos de piensos animales, o suplementos alimenticios.

En otro caso, las composiciones descritas en la presente memoria, que incluyen enzimas, y métodos descritos en la presente memoria, se pueden usar para procesar lípidos, p. ej., grasas tales como grasas de residuos de restaurante para hacer un biocombustible, p. ej., un combustible biodiésel, p. ej., para automóviles, autobuses, camiones o barcos. En un caso, el biodiésel fabricado usando una composición o método descrito en la presente memoria, se puede generar a partir de cualquier fuente de planta renovable, p. ej., soja, y/o de una grasa, tal como la "grasa amarilla".

Las composiciones descritas en la presente memoria que incluyen enzimas, y métodos descritos en la presente memoria, se pueden usar para procesar "SVO" o "aceite vegetal directo", que incluye cualquier aceite vegetal que pueda alimentar un motor diésel, p. ej., en donde el procesamiento comprende la transesterificación de lípidos en el combustible, p. ej., para usar a temperaturas más bajas.

Las composiciones descritas en la presente memoria que incluyen enzimas, y métodos descritos en la presente memoria se pueden usar para procesar "WVO", o aceite vegetal residual, para fabricar, p. ej., una grasa amarilla, que incluye la grasa de restaurantes; en un caso, la grasa debe filtrarse para eliminar las partículas de alimentos. La grasa amarilla procesada por las composiciones descritas en la presente memoria que incluyen enzimas y los métodos descritos en la presente memoria pueden caer en la categoría de SVO/WVO, incluyendo cualquier grasa, p. ej., una grasa residual de restaurante, que puede contener sebo de vaca y otros productos de origen animal.

Procesamiento de granos secos de destilería

En otro caso, las enzimas (p. ej., fosfolipasas) descritas en la presente memoria se pueden usar para tratar/procesar "solubles secos de destilería (DDS)", "granos secos de destilería (DDS)", "solubles de destilería condensados (CDS)", "granos húmedos de destilería (DWG)", y " granos secos de destilería con solubles (DDGS)"; los granos secos de destilería pueden ser un subproducto de cereales de un procedimiento de destilación, y pueden incluir solubles. Estos procedimientos pueden comprender subproductos de plantas de trituración en seco, p. ej., para aplicaciones en piensos, p. ej., para aves de corral, bovinos, porcinos y otros animales domésticos. Por lo tanto, las enzimas de la invención se pueden usar para tratar/procesar granos, p. ej., cereales, que son subproductos de cualquier procedimiento de destilación, incluyendo procedimientos que usan cualquier fuente de granos, p. ej., fuentes tradicionales de cerveceros, o alternatively, de una planta productora de etanol (fábrica, molino o similar). Las enzimas de la invención se pueden usar para tratar/procesar la masa de secado de las destilerías; esta masa se puede usar posteriormente para una variedad de propósitos, p. ej., como forraje para el ganado, especialmente rumiantes; por lo tanto se proporcionan en la presente memoria métodos para procesar forraje para ganado tales como rumiantes, y forraje procesado enzimáticamente que comprende fitasas.

Las enzimas de esta invención se pueden usar solas o con otras enzimas para procesar "solubles secos de destilería (DDS)", "granos secos de destilería (DDS)", "condensados de destilería solubles (CDS)", "granos húmedos de destilería (DWG)", y " granos secos de destilería con solubles (DDGS)". Por ejemplo, las enzimas de esta invención se pueden usar en cualquier etapa de un procedimiento de producto de alcohol como se ilustra en la figura 12. Las enzimas de esta invención se pueden usar para aumentar la biodisponibilidad del fósforo en cualquier biocombustible o posible biocombustible, incluido el fósforo que se encuentra en "solubles secos de destilería (DDS)", "granos secos de destilería (DDS)", "condensados secos de destilería (CDS)", "granos húmedos de destilería (DWG)", y "granos secos de destilería con solubles (DDGS)" (véase, p. ej., C. Martínez Amezcua, 2004 *Poultry Science* 83: 971-976).

Producción de alcohol para beber y licores

Las enzimas de esta invención también se pueden usar en el procesamiento de granos secos de destilería para la producción de alcohol - alcohol como en "licores", p. ej., producción de cerveza o whisky (además del uso en el procesamiento de biomasa para producir biocombustibles). Las enzimas de esta invención se pueden usar en plantas de etanol, p. ej., para procesar granos tales como maíz. Los granos secos de destilería se pueden preparar moliendo primero un grano (p. ej., maíz) hasta una consistencia gruesa y añadiendo a agua caliente. Después de enfriar, se añade levadura y la mezcla fermenta durante varios días a una semana. Los sólidos que quedan después de la fermentación son los granos de destilería. Las fitasas se pueden usar en cualquier etapa de este procedimiento.

Formulaciones

Se describen en la presente memoria nuevas formulaciones que comprenden enzimas de esta invención, y formulaciones para fosfolipasas de la invención, que incluyen formulaciones que incluyen las nuevas enzimas de la invención. Las enzimas de la invención se pueden usar o formular solas o como una mezcla de fosfolipasas de la invención u otras fosfolipasas, u otras enzimas tales como xilanasas, celulasas, proteasas, lipasas, amilasas o enzimas redox tales como lacasas, peroxidases, catalasas, oxidasas o reductasas. Se pueden usar formuladas en una forma sólida tal como un polvo, una preparación liofilizada, un gránulo, un comprimido, una barra, un cristal, una cápsula, una píldora, un pelet, o en una forma líquida tal como en una solución acuosa, un aerosol, un gel, una pasta, una suspensión, una emulsión acuosa/aceitosa, una crema, una cápsula, o en una suspensión vesicular o micelar. Las formulaciones pueden comprender cualquiera o una combinación de los siguientes ingredientes: polioles tales como polietilenglicol, un poli(alcohol vinílico), un glicerol, un azúcar tal como una sacarosa, un sorbitol, una trehalosa, una glucosa, una fructosa, una matosa, una manosa, un agente gelificante tal como una goma guar, un carragenano, un alginato, un dextrano, un derivado celulósico, una pectina, una sal tal como un cloruro sódico, un sulfato sódico, un sulfato amónico, un cloruro de calcio, un cloruro de magnesio, un cloruro de cinc, un sulfato de cinc, una sal de un ácido graso y un derivado de ácido graso, un quelador de metales tales como un EDTA, un EFTA, un citrato sódico, un agente antimicrobiano tal como un ácido graso o un derivado de ácido graso, un parabeno, un sorbato, un benzoato, un compuesto modulador adicional para bloquear el impacto de una enzima tal como una proteasa, una proteína voluminosa tal como una BSA, un hidrolizado de trigo, un compuesto de borato, un aminoácido o un péptido, un compuesto modulador de la temperatura o pH adecuado, un emulsionante tal con un detergente no iónico y/o uno iónico, un agente de oxidorreducción tal como cistina/cisteína, un glutatión, un glutatión oxidado, un compuesto reducido o un antioxidante tal como un ácido ascórbico, o un dispersante.

La reticulación y la modificación de proteínas tales como la pegilación, modificación de ácidos grasos, glucosilación también se pueden usar para mejorar la estabilidad de la enzima.

Otros usos para las fosfolipasas de la invención

Las fosfolipasas de la invención también se pueden usar para estudiar el sistema de señalización de fosfoinosítido (PI); en el diagnóstico, pronóstico y desarrollo de tratamientos para los trastornos bipolares (véase, p. ej., Pandey (2002) *Neuropsychopharmacology* 26: 216-228); como antioxidantes; como fosfolípidos modificados; como agentes espumantes y gelificantes; para generar lípidos angiogénicos para vascularizar tejidos; para identificar fosfolipasa, p.

- ej., moduladores de PLA, PLB, PLC, PLD y/o patatina (agonistas o antagonistas), p. ej., inhibidores para usar como agentes antineoplásicos, antiinflamatorios y analgésicos. Se pueden usar para generar fosfolípidos ácidos para controlar el sabor amargo en alimentos y productos farmacéuticos. Se pueden usar en la purificación de grasa. Se pueden usar para identificar inhibidores de péptidos para el tratamiento de enfermedades virales, inflamatorias, alérgicas y cardiovasculares. Se pueden usar para hacer vacunas. Se pueden usar para producir glicéridos de ácidos grasos poliinsaturados y fosfatidilglicerol.

Las fosfolipasas de la invención, por ejemplo enzimas PLC, se usan para generar inmunotoxinas y diversos productos terapéuticos para tratamientos anticancerosos.

- Las fosfolipasas de la invención se pueden usar junto con otras enzimas para decoloración (es decir, eliminación de clorofila) y en detergentes (véase más arriba), p. ej., junto con otras enzimas (p. ej., lipasas, proteasas, esterases, fosfatasa). Por ejemplo, en cualquier caso donde se use una PLC, se pueden usar una PLD y una fosfatasa en combinación, para producir el mismo resultado que una PLC sola.

La siguiente tabla 7 resume varios procedimientos y formulaciones de ejemplo

Tabla 7

Procedimientos de ejemplo	Propósitos
Uso de productos químicos en el desgomado de aceite con PLC	
Sin uso de ácido	Eliminación química
Sin uso de producto cáustico	Eliminación química
Intervalo de uso de ácido y producto cáustico (sin exceso a exceso)	Realización alternativa del procedimiento de reducción/desgomado químico
Otros tipos de ácido y producto cáustico	Realizaciones alternativas del procedimiento de desgomado
Impacto del agua en el desgomado de aceite con PLC	
Uso de gel de sílice	Reemplazo de la etapa de lavado con agua
Uso de agente de secado de agua	Eliminación de agua en producto final
Impacto de baja cantidad de agua durante el tratamiento cáustico	Eliminación de agua en producto final
Contenido mínimo de agua (<5%)	Eliminación de agua en producto final
Contenido máximo de agua (> 5%)	Alternativa de procedimiento
Perfiles de humedad en el desgomado con PLC	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Dependencia del aceite en el contenido de agua para el desgomado con PLC	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Eliminación in situ de ácidos grasos libres, AAL	
Adición de agente quelante de AAL	Realización alternativa del procedimiento de desgomado; mejora las condiciones en el aceite de alubias estropeadas
Impacto del régimen de mezclado en el desgomado de aceite con PLC	
Desgomado con PLC con mezclado mínimo	Protección de la enzima frente a la desnaturalización inducida por mezclado, ahorro de energía
Desgomado con PLC con mezclado de cizalladura inicial, seguido de mezclado con paletas	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Orden de adición de productos químicos	
Orden de adición: enzima-agua seguida de ácido y después producto cáustico	Permite que la PLC funcione antes de la exposición a ácido y/o producto cáustico, causando potencial inactivación de la PLC por pH o quelación de metal.
Realización alternativa de procedimiento de desgomado de aceite con PLC para temperatura y tiempo.	
Etapa de tratamiento enzimático (tiempo): <60 min, preferiblemente <30 min.	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Etapa de tratamiento enzimático (temperatura): 50-70°C, posiblemente <50°C (p. ej., T.a.)	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Beneficios del desgomado de aceite con PLC	
Producción de borra de neutralización con contenido minimizado de PL y enriquecido en ésteres fosfato solubles en agua	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Reducción de aceite neutro en goma mediante el uso de PLC	Realización alternativa de procedimiento de desgomado

Procedimiento de generación de aumento de DAG en aceites vegetales (p. ej., 1,3-DAG)	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Beneficios de usar aceites vegetales con mayor contenido de DAG con otros aceites para beneficios de salud	Beneficio de producto de ejemplo
Investigación del procedimiento de desgomado que no deja actividad de PLC en el aceite	Realización alternativa de procedimiento de desgomado / mejora regulatoria
Investigación del procedimiento de desgomado que no deja proteína PLC detectable en el aceite	Realización alternativa de procedimiento de desgomado / mejora regulatoria
Uso de una enzima para producir DAG a partir de masa de goma de lecitina	Beneficio de producto de ejemplo
Uso de PLC con aceites especiales (enriquecidos en PA, PI)	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Uso de enzimas específicas de PA/PI (p. ej., específico 596ES2/PI)	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Uso de enzimas específicas de PA/PI (p. ej., específico 596ES2/PI) + enzimas específicas de PC/PE; impacto del orden de adición	
Procedimiento por lotes o continuo	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Uso de goma tratada con PLC resuspendida para otras operaciones de desgomado de aceite	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Balance de masa para DAG, FFA, P, metales, aceite neutro en goma	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Varios	
Adición de PLC a granos de semillas oleaginosas en copos antes de la extrusión	Realización alternativa de procedimiento
Ensayo de desgomado a pequeña escala	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Uso de otras enzimas para reducir la masa de goma (p. ej., enzima PYROLASE®, clorofilasa, peroxidasa, lipasa, lacasa, mananasa, proteasa, lactasa, amilasa, etc. o combinaciones de las mismas)	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Uso de compuesto para facilitar la separación de aceite/goma	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Endurecimiento de goma del aceite tratado con PLC	Realización alternativa de procedimiento de desgomado
Variantes glucosiladas/desglucosiladas de fosfolipasa	Propósito
Formulaciones de ejemplo	Estabilización de la enzima para producción máxima de DAG, posiblemente para alterar la especificidad del sustrato o dirigir la formación del producto hacia el tipo 1,3-DAG
Formulación líquida de ejemplo para la estabilidad	Estabilización de la enzima para una producción máxima de DAG, posiblemente para alterar la especificidad del sustrato o dirigir la formación del producto hacia el tipo 1,3-DAG
Uso de compuestos para aumentar la estabilidad de la PLC a diferentes intervalos de pH y temp. (polioles, sales, metales ...)	Estabilización de la(s) enzima(s) y facilidad de separación de la enzima de la fase de aceite o goma después del desgomado; reciclabilidad de la preparación enzimática; separación física de la fase de la enzima durante el procesamiento del aceite; ataque de PI/PA por PLC
Uso de un sistema de suministro hidrófobo para PLC (liposomas, enzima hidratada en gotas de aceite refinado)	Reducción de costes del ingrediente de la formulación, mejor miscibilidad de la enzima con el aceite, termoestabilización de la enzima
Formulación sólida para la estabilidad	
Uso de diferentes PLC, sistemas vehículo de fosfolipasa (resinas de inmovilización, matrices porosas, geles, gránulos, polvos, comprimidos, vesículas/micelas, encapsulados, líquidos estructurados, etc.) para estabilizar la fosfolipasa y las coenzimas	
Uso de materiales residuales de desgomado (componentes de goma, cáscaras de semillas) para formulación de PLC	
Formulación de ejemplo y procedimientos para aumentar la actividad	Tiempo de reacción más rápido/procedimiento de desgomado/reducción del uso de productos químicos
Uso de productos químicos o enzimas para ayudar a dispersar mejor la enzima en el aceite (p. ej., matriz efervescente, etc.)	
Reutilización de gomas/enzima para posteriores reacciones de desgomado	Reciclabilidad de la enzima
Uso de formulaciones que mejoran la segregación o captura de enzimas de los PL para la hidrólisis	Tiempo de reacción más rápido/procedimiento de desgomado/reducción del uso de productos químicos

Uso de múltiples formulaciones para acomodar PLC con diferentes especificidades de PL

Versatilidad del procedimiento; diferentes enzimas pueden requerir formulaciones diferentes o pueden añadirse en diferentes etapas en el procedimiento
Protección de actividades de PLC en una realización de formato multienzimático

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

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

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

Uso de adiciones de producto cáustico intermitentes como en formulación de adición de producto cáustico de liberación prolongada

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

Actividad de inactivación y modulación de enzimas por glucosilación

Se describen en la presente memoria métodos que comprenden el uso de tecnología recombinante para producir y expresar enzimas u otras proteínas con actividad biológica, p. ej., enzimas nocivas o tóxicas (en donde las enzimas u otras proteínas no están normalmente glucosiladas) en una forma inactiva o menos activa, pero reactivable. El método comprende añadir uno o más sitios de glucosilación (p. ej., glucosilación unida a N o unida a O) en las enzimas u otras proteínas con actividad biológica (p. ej., una enzima de la presente invención) diseñando una secuencia codificante que incorpora el(los) nuevos sitios de glucosilación; expresar las secuencias codificantes variantes en células eucariotas o un equivalente diseñado o sistema in vitro capaz de glucosilación postraduccional.

Por ejemplo, la secuencia de 3 aminoácidos NXS/T es el sitio para la glucosilación en células eucarióticas, las células procariotas no hacen esto. Por lo tanto, el método comprende añadir al menos una secuencia de 3 aminoácidos NXS/T a la proteína de forma que su actividad disminuya o se inactiva debido a la glucosilación postraduccional.

La glucosilación puede dar como resultado la adición de 2 moléculas de N-acetil-glucosamina (NGlucNac) al resto N. Las adiciones posteriores pueden ser específicas del organismo. En la mayoría de las especies, después se añaden azúcares de manosa (Mann) al NGlucNac, con un número de restos de Mann que varía de 10 a 100. El ácido siálico también se puede añadir en algunas especies. En *Pichia* después de añadir NGlucNac, se pueden añadir de 10 a 25 restos de Mann.

Estos métodos comprenden el uso de cualquier enzima o conjunto de enzimas desglucosilantes, muchas de las cuales pueden haberse identificado y/o están disponibles en el mercado. Por ejemplo, la enzima endoglucosidasa H se escinde en el último NGlucNac dejando un NGlucNac todavía unido al resto N. La enzima PNGasaF escinde todos los azúcares y convierte la cadena lateral amino del resto N en un grupo hidroxilo dando como resultado que el N aminoácido se convierta en un aminoácido aspartato (D) en la enzima. Por lo tanto, los métodos comprenden el uso de endoglucosidasa H y/o PNGasaF o enzimas equivalentes in vivo o in vitro para reactivar parcial o completamente las proteínas "inactivadas temporalmente" por modificación genética.

El método comprende dirigir las enzimas u otros polipéptidos a la ruta secretora del hospedante de manera que las enzimas serán glucosiladas. Los nuevos sitios de glucosilación se diseñan de manera que la glucosilación inactiva la enzima o modifica su actividad, p. ej., disminuye su actividad o modifica de otra forma su actividad, tal como bloquea un sitio de unión al sustrato. Debido a que la enzima es inactiva o menos activa, las enzimas nocivas o tóxicas podrían expresarse a niveles más altos ya que los efectos negativos de su actividad ya no son una limitación de la cantidad de proteína que se puede acumular en las células hospedantes. La enzima inactiva, glucosilada se puede reactivar (parcial o completamente) eliminando los azúcares, p. ej., usando enzimas desglucosilantes disponibles en el mercado, p. ej., eliminando los azúcares in vitro, o eliminando los azúcares in vivo usando procedimientos de modificación genética de células completas.

En un caso, se añade un sitio diana de glucosilación eucariota tal como NXS/T a cualquier proteína, p. ej., una enzima descrita en la presente memoria. Esto permite a un experto en la técnica añadir sitios de glucosilación a una proteína de interés con la expectativa de convertir esa proteína en una que está temporalmente inactiva cuando esa proteína está glucosilada expresando esa proteína en una célula hospedante eucariótica y dirigiendo la proteína a la ruta secretora de la célula hospedante.

Por lo tanto, se describen en la presente memoria métodos para la producción de enzimas que normalmente son demasiado nocivas o tóxicas, para ser toleradas en grandes cantidades por una célula hospedante. El efecto puede ser temporal ya que es posible regenerar la enzima activa (por desglucosilación, p. ej., mediante modificación/deglucosilación postraduccional) para trabajos futuros que requieren una enzima activa.

Se proporcionan en la presente memoria métodos para preparar y expresar una proteína que tiene una actividad biológica cuya actividad se inactiva temporalmente mediante glucosilación que comprende: (a) proporcionar un ácido nucleico que codifica una proteína que tiene una actividad biológica, en donde la proteína no está glucosilada de forma natural; (b) insertar al menos una secuencia de codificación de motivo de glucosilación en el ácido nucleico

que codifica la proteína, en donde la forma glucosilada de la proteína es inactiva; (c) insertar una secuencia de direccionamiento en la proteína de manera que se dirija a la ruta secretora de la célula hospedante, en donde la célula hospedante es capaz de reconocer el motivo de glucosilación y glucosilar la proteína; y (d) expresar el ácido nucleico modificado en la célula hospedante. En un caso, el método comprende además desglucosilar la proteína expresada, reactivando de este modo la actividad de la proteína, p. ej., una enzima, tal como una enzima de la invención. En un caso, la célula hospedante es una célula eucariota. En un caso, la proteína recombinante expresada inactivada se reactiva in vitro por desglucosilación, ya sea química o enzimática.

La determinación de la colocación de uno o más motivos de glucosilación para inactivar temporalmente una proteína implica solo métodos rutinarios para hacer ácidos nucleicos que codifican proteínas variantes, p. ej., mediante GSSM, y protocolos de cribado de rutina, p. ej., ensayos de actividad o de unión.

Una enzima cuya actividad era perjudicial para la célula hospedante se volvió inactiva debido a la glucosilación. Debido a que era inactiva, podía acumularse en niveles mucho más altos en las células hospedantes eucarióticas. Debido a que ya no era activa, ya no podía ejercer sus efectos negativos. La inactivación de la enzima tóxica era temporal porque la desglucosilación de la enzima usando EndoH o PNGasa F daba como resultado una restauración completa de la actividad normal de la enzima. Una gran cantidad de la enzima inactiva, glucosilada se acumulaba en el medio, lo que sugiere que era bien tolerada por el hospedante como forma inactiva.

La invención se describirá con más detalle con referencia a los siguientes ejemplos; sin embargo, debe entenderse que la invención no está limitada a dichos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo de referencia 1: programa BLAST usado para realizar el perfil de identificación de secuencia

Este ejemplo describe un programa de ejemplo de identidad de secuencia para determinar si un ácido nucleico está dentro del alcance de la descripción. Se usa un programa NCBI BLAST 2.2.2, opciones por defecto para blastp. Se usaron todos los valores por defecto, excepto la configuración de filtrado por defecto (es decir, todos los parámetros configurados como por defecto, excepto el filtrado que está configurado como OFF); en su lugar, se usa una configuración "-F F", que deshabilita el filtrado. El uso del filtrado por defecto a menudo da como resultado violaciones de Karlin-Altschul debido a la longitud de secuencia corta. Los valores por defecto usados en este ejemplo:

```
"Filtro de baja complejidad: encendido
> Tamaño de la palabra: 3
> Matriz: Blosom62
> Costes por hueco: Existencia: 11
> Extensión: 1"
```

Otras configuraciones por defecto fueron: filtro para baja complejidad desactivado, tamaño de palabra de 3 para proteína, matriz BLOSUM62, penalización de existencia de hueco de -11 y una penalización de extensión de hueco de -1. La opción "-W" se estableció por defecto en 0. Esto significa que, si no se establece, el tamaño de palabra por defecto es 3 para las proteínas y 11 para los nucleótidos. La configuración dice:

```
<< README.bls.txt >>
> -----
> argumentos blastall:
>
> -p Nombre del programa [Caracteres]
> -d Base de datos [Caracteres]
> predeterminado = nr
> -i Archivo de consulta [Archivo entrada]
> predeterminado = stdin
> -e Valor de expectativa (E) [Real]
> predeterminado = 10,0
> -m opciones de vista de alineamiento:
> 0 = emparejamiento,
> 1 = consulta-anclada que muestra identidades,
> 2 = búsqueda de identidades sin identidades,
> 3 = consulta anclada plana, muestra identidades,
> 4 = consulta anclada plana, sin identidades,
> 5 = consulta anclada sin identidades y extremos romos,
> 6 = consulta anclada plana, sin identidades y extremos romos,
> 7 = salida XML Blast,
> 8 = tabular,
> 9 tablas con líneas de comentarios [Número entero]
> predeterminado = 0
```


- > -o Informe BLAST Archivo de salida [Archivo salida] Opcional
- > predeterminado = stdout
- > -F secuencia de consulta de filtro (DUST con blastn, SEG con otros) [Caracteres]
- > predeterminado = T
- 5 > -G Coste para abrir un hueco (cero selecciona comportamiento predeterminado) [Número entero]
- > predeterminado = 0
- > -E Coste para extender un hueco (cero selecciona comportamiento predeterminado) [Número entero]
- > predeterminado = 0
- > -X valor X de dropoff para el alineamiento con huecos (en bits) (cero selecciona comportamiento predeterminado)
- 10 [Número entero]
- > predeterminado = 0
- > -I Muestra GI en defines [T/F]
- > predeterminado = F
- > -q Penalización por una falta de coincidencia de nucleótidos (solo blastn) [Número entero]
- 15 > predeterminado = -3
- > -r Recompensa por una coincidencia de nucleótidos (solo blastn) [Número entero]
- > predeterminado = 1
- > -v Número de secuencias de bases de datos para mostrar descripciones de una línea para (V)
- > [Número entero]
- 20 > predeterminado = 500
- > -b Número de secuencia de la base de datos para mostrar alineamiento para (B) [Número entero]
- > predeterminado = 250
- > -f Umbral para extender aciertos, predeterminado si es cero [Número entero]
- > predeterminado = 0
- 25 > -g Realiza alineación con huecos (no disponible con tblastx) [T/F]
- > predeterminado = T
- > -Q Código genético de consulta para usar [Número entero]
- > predeterminado = 1
- > -D Código genético DB (solo para tblast [nx]) [Número entero]
- 30 > predeterminado = 1
- > -a Número de procesadores a usar [Número entero]
- > predeterminado = 1
- > -O Archivo SeqAlign [Archivo de salida] Opcional
- > -J Considera la consulta define [T/F]
- 35 > predeterminado = F
- > -M Matriz [Caracteres]
- > predeterminado = BLOSUM62
- > -W Tamaño de palabra, predeterminado si es cero [Número entero]
- > predeterminado = 0
- 40 > -z Longitud efectiva de la base de datos (use cero para el tamaño real)
- > [Caracteres]
- > predeterminado = 0
- > -K Número de mejores aciertos de una región para mantener (desactivado de forma predeterminada, si se usa se recomienda un valor de 100) [Número entero]
- 45 > predeterminado = 0
- > -P 0 para múltiples aciertos 1-paso, 1 para acierto único 1-paso, 2 para 2-paso
- > [Número entero]
- > default = 0
- > -Y Longitud efectiva del espacio de búsqueda (use cero para el tamaño real)
- 50 > [Real]
- > predeterminado = 0
- > -S Cadenas de consulta para buscar en la base de datos (para blast [nx], y tblastx). 3 es ambos, 1 es superior, 2 es inferior [Número entero]
- > predeterminado = 3
- 55 > -T Produce salida HTML [T/F]
- > predeterminado = F
- > -1 Restringe la búsqueda de base de datos a lista de GI [String] Opcional
- > -U Use el filtrado en minúsculas de la secuencia FASTA [T/F] Opcional
- > predeterminado = F
- 60 > -y Dropoff (X) para extensiones de blast en bits (0,0 selecciona comportamiento predeterminado)
- > [Real]
- > predeterminado = 0,0
- > -Z valor dropoff X para el alineamiento final con huecos (en bits) [Número entero]
- > predeterminado = 0
- 65 > -R Archivo de punto de control PSI-TBLASTN [Archivo de entrada] Opcional
- > -n búsqueda de MegaBlast [T/F]

- > predeterminado = F
- > -L Ubicación en secuencia de consulta [Caracteres] Opcional
- > - A Tamaño de ventana de múltiples aciertos (cero para el algoritmo de un solo acierto) [Número entero]
- > predeterminado = 40

5

Ejemplo de referencia 2: modificaciones a una enzima PLC (ePLC)

Este ejemplo describe protocolos de ejemplo para preparar enzimas PLC de esta invención, que incluyen enzimas PI-PLC de esta invención. Este ejemplo describe enzimas que se pueden usar para poner en práctica esta invención, p. ej., usadas en combinación con enzimas PLC de esta invención (p. ej., una enzima que tiene una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 8, o como se describe en la tabla 12 a 15) Las enzimas que se pueden usar para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria, p. ej., en combinaciones o mezclas que comprenden enzimas PLC de esta invención, incluyen cualquier enzima fosfolipasa, que incluye una enzima que tiene una secuencia como se expone en la tabla 8 o tabla 9, o descrita en el documento WO 2008/036863. En casos alternativos, las enzimas que se pueden usar para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria incluyen polipéptidos que tienen una secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 4 y sus variantes como se describe en las tablas 8 y 9 a continuación.

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

20

MKKKVLALAA MVALAAPVQS VVFAQTNNSE SPAPILRWSA EDKHNEGINS

HLWIVNRAID IMSRNTTIVN PNETALLNEW RADLENGIYS ADYENPPYYD**D**

STYASHFYDP DTGTTYIPFA KHAKETGAKY FNLAGQAYQN QDMQQAFFYL

GLSLHYLGDV NQPMHAA**S****F**T **D**LSYPMGFHS KYENFVDTIK NNYIVSDSNG

YWNWKGANPE DWIEGAAVAA KQDYPGVVND TTKDWFVKAA VSQEYADKWR

AEVTPVTGKR LMEAQRVTAG YIHLWFDTYV NR (SEQ ID NO:4)

WSA EDKHNEGINS

HLWIVNRAID IMSRNTTIVN PNETALLNEW RADLENGIYS ADYENPPYYD**D**

STYASHFYDP DTGTTYIPFA KHAKETGAKY FNLAGQAYQN QDMQQAFFYL

GLSLHYLGDV NQPMHAA**S****F**T **D**LSYPMGFHS KYENFVDTIK NNYIVSDSNG

YWNWKGANPE DWIEGAAVAA KQDYPGVVND TTKDWFVKAA VSQEYADKWR

AEVTPVTGKR LMEAQRVTAG YIHLWFDTYV NR (SEQ ID NO:2)

ATGAAAAAGAAAGTATTAGCACTAGCAGCTATGGTTGCTTTAGCTGCGC
CAGTTCAAAGTGTAGTATTTGCACAAACAAATAATAGTGAAAGTCCTGC
ACCGATTTTAAGATGGTCAGCTGAGGATAAGCATAATGAGGGGATTAAC
 TCTCATTTGTGGATTGTAAATCGTGCAATTGACATCATGTCTCGTAATA
 CAACGATTGTGAATCCGAATGAAACTGCATTATTAAATGAGTGGCGTG
 TGATTTAGAAAATGGTATTTATTCTGCTGATTACGAGAATCCTTATTAT
 GATGATAGTACATATGCTTCTCACTTTTATGATCCGGATACTGGAACAA
 CATATATTCCTTTTGGCGAAACATGCAAAAGAAACAGGCGCAAAATATTT
 TAACCTTGCTGGTCAAGCATACCAAAATCAAGATATGCAGCAAGCATT
 TTCTACTTAGGATTATCGCTTCATTATTTAGGAGATGTGAATCAGCCAA
 TGCATGCAGCATCTTTTACGGATCTTTCTTATCCAATGGGTTTCCATT
 TAAATACGAAAATTTTGTGATACAATAAAAAATAACTATATTGTTTCA
 GATAGCAATGGATATTGGAATTGGAAAGGAGCAAACCCAGAAGATTGGA
 TTGAAGGAGCAGCGGTAGCAGCTAAACAAGATTATCCTGGCGTTGTGAA
 CGATACGACAAAAGATTGGTTTGTAAGCAGCCGTATCTCAAGAATAT
 GCAGATAAATGGCGTGCGGAAGTAACACCGGTGACAGGAAAGCGTTTAA
 TGGAAGCGCAGCGCGTTACAGCTGGTTATATTCATTTGTGGTTTGATAC
 GTATGTAAATCGCTAA (SEQ ID NO:3)

TGGTCAGCTGAGGATAAGCATAATGAGGGGATTAACCTCTCATTGTGGA
 TTGTAAATCGTGCAATTGACATCATGTCTCGTAATACAACGATTGTGAA
 TCCGAATGAACTGCATTATTAAATGAGTGGCGTGCTGATTTAGAAAAT
 GGTATTTATTCTGCTGATTACGAGAATCCTTATTATGATGATAGTACAT
 ATGCTTCTCACTTTTATGATCCGGATACTGGAACAACATATATTCCTTT
 TGCGAAACATGCAAAAGAAACAGGCGCAAAATATTTTAACCTTGCTGGT
 CAAGCATACCAAAATCAAGATATGCAGCAAGCATTCTTCTACTTAGGAT
 TATCGCTTCATTATTTAGGAGATGTGAATCAGCCAATGCATGCAGCATC
 TTTTACGGATCTTTCTTATCCAATGGGTTTCCATTCTAAATACGAAAAT
 TTTGTTGATACAATAAAAAATAACTATATTGTTTCAGATAGCAATGGAT
 ATTGGAATTGGAAAGGAGCAAACCCAGAAGATTGGATTGAAGGAGCAGC
 GGTAGCAGCTAAACAAGATTATCCTGGCGTTGTGAACGATACGACAAAA
 GATTGGTTTGTAAGAGCAGCCGTATCTCAAGAATATGCAGATAAATGGC
 GTGCGGAAGTAACACCGGTGACAGGAAAGCGTTTAATGGAAGCGCAGCG
 CGTTACAGCTGGTTATATTCATTTGTGGTTTGATACGTATGTAAATCGC
 TAA (SEQ ID NO:1)

5 Las mutaciones de restos individuales se hicieron usando los métodos de mutagénesis por saturación de sitio genético (GSSM) descritos anteriormente y se analizaron para determinar la actividad de la fosfolipasa. Para fines de cribado, el vector de expresión fue pASK en el hospedante E. coli Top10. Los aciertos de GSSM se seleccionaron de un cribado primario para el cual se usó una emulsión de PA/PI como sustrato y las muestras se analizaron por LCMS. Estos aciertos primarios se confirmaron en aceite de soja y se analizaron por RMN de ³¹P y HPLC.

El ensayo de aceite de soja y el procedimiento para preparar las muestras para el análisis por RMN es el siguiente:

10 El detergente de RMN se preparó disolviendo 25 g de ácido desoxicólico, 5,84 g de EDTA, 5,45 g de base Tris en 900 ml de agua, después se ajustó el pH a 10,5 usando gránulos de KOH. La referencia interna de RMN era TIP 50 mM y TBP 12,5 mM en isopropanol de calidad para HPLC. El óxido de deuterio de paramagnetismo bajo (D, 99,9%) era de Cambridge Isotope Laboratories Inc. (DLM - 11 - 100). El control de RMN era lecitina de Avanti (International Lecithin & Phospholipids Society International Lecithin & Phospholipids Society mixed soy phospholipids reference Standard oil), Avanti Polar Lipids Inc, n° 95309.

Las referencias y las muestras se prepararon como sigue:

15 Se mezcla bien un lote de aceite de soya bruto

Se dispensa 1 ml de aceite en un tubo de 2 ml. Se añaden 60 µl de enzima purificada (para controles, 18 Unidades) o lisado celular puro (para cribar mutantes); se mezcla durante 15 segundos. Las unidades se definen como la hidrólisis de 1 µmol de PC por minuto a 37°C a pH 7,3.

20 Se incuba a 60°C durante 48 horas en un termomezclador que agita a 14000 rpm, agitando con vórtice de forma intermitente.

Después de la incubación, se mezclan bien las muestras usando agitación con vórtice

Se pesan 250 mg (+/- 0,2 mg) de cada muestra en un tubo de 2 ml y se pesa un control de RMN de 10 mg (+/- 0,1 mg) de lecitina de Avanti.

Se añaden 900 µl de detergente RMN y después se añaden 100 µl de D2O a cada muestra.

25 Se mezclan las muestras a fondo agitando con vórtice y agitando en el termomezclador Thermomixer, a 30-37°C y 14000 rpm durante 30 minutos

Se centrifuga a 13.000 RPM durante 10 minutos

Se retira cuidadosamente la capa oleosa superior

Se añaden 750 µl de hexano a cada muestra y se agita suavemente con vórtice*

Se centrifuga a 13.000 RPM durante 10 minutos

- 5 Se retiran con cuidado 600 µl de la capa acuosa inferior y se transfieren a un tubo nuevo

Se añaden 25 µl de referencia interna, se mezcla bien

Se transfieren 500 µl a un tubo de RMN de 5 mm.

La liberación de DAG se midió por HPLC cuantitativa de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 10 La solución de muestra eran muestras de aceite de aproximadamente 50 µl y 950 µl de hexano/isopropanol (9:1) para hacer 1 ml. Las soluciones de referencia eran, p. ej., aceite ENOVA™ (Kao Corporation, Itasca, IL) 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml y 4 mg/ml. El aceite Enova es un aceite de alto contenido de DAG que tiene una distribución de ácidos grasos similar al aceite vegetal común (1,3-DAG y 1,2-DAG).

Configuración de HPLC:

- 15 Columna: Chromegasphere™ SI-60, 15cmx4,6mm
Temperatura: 40°C
Caudal: 2 ml/min
Volumen de inyección: 20 µl
Fase móvil A: Hexano
Fase móvil B: Hexano/Isopropanol/Acetato de etilo/Ácido fórmico = 800:100:100:1
20 Gradiente de elución:

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

- 25 Ajustes del detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD): Un ajuste de ejemplo era temperatura 40°C, ganancia 5 y gas nitrógeno 3,5 bares. El pico de DAG se identificó por comparación del tiempo de retención con el de la referencia. La cuantificación se basó en la relación entre la respuesta del detector (área del pico) y la concentración del analito.

La Tabla 8 describe secuencias que se pueden usar para poner en práctica los métodos descritos, p. ej., en combinación con polipéptidos descritos en la presente memoria (véanse, p. ej., las tablas 12 a 15), p. ej., como mezclas o combinaciones de enzimas.

- 30 Basándose en: datos de RMN y HPLC, se seleccionaron las mutaciones que se muestran en la tabla 8 más adelante. La tabla 8, más adelante, indica el aminoácido inicial, el número de posición del cambio de aminoácido y el aminoácido cambiado (para la SEQ ID NO: 4). La tabla 8 también indica que el codón original, el codón de sustitución y otros codones para el mismo cambio a aminoácido. Por ejemplo, la segunda fila, "E41A", indica que el aminoácido en la posición 41 era originalmente "E" (ácido glutámico), pero se cambió a "A" (alanina). El codón original para el cambio E41A era "GAG", pero se cambió a "GCA". Sin embargo, también se podrían haber usado los codones "GCG", "GCC" o "GCT". Las variantes de codones como se expone en la tabla 8 que producían variantes (de SEQ ID NO: 4) con la mejor variación o "mejora" frente al "tipo natural" (SEQ ID NO: 4) para la hidrólisis de PA. Se proporcionan en la presente memoria polipéptidos y ácidos nucleicos que los codifican, que comprenden una, varias o todas las variaciones o los equivalentes de todas las variaciones, expuestas en la tabla 8.

- 40 En figura 10, se da la fracción en peso de las especies de fosfolípidos individuales (PL) en relación con los PL totales que quedan después de la reacción, lo que refleja la especificidad de los mutantes para especies particulares. Aquí, las especies eran ácido fosfatídico (PA), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilcolina (PC). "TIP" se refiere a la referencia interna de RMN. El "DAG liberado" se midió por HPLC y refleja valores relativos entre muestras y controles de 1,3-DAG y 1,2-DAG total. El control positivo era una muestra purificada de un mutante E41A previamente descrito en Tan et al., *Biochemistry* 37: 4275-4279 (1998). Los resultados indican que los mutantes liberan DAG bien y tienen buena actividad en diversas especies, incluyendo fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE), comparable o mejor que el molde (SEC ID NO: 4). Por ejemplo, D100L y D100M muestran una actividad particular en PA. Q265R muestra actividad particular en PI. Estas mutaciones se pueden combinar para proporcionar enzimas que tienen actividades deseadas en diversos sustratos.

Tabla 8: Aciertos de GSSM

Aciertos GSSM PLC	Codón Original	Cambiado a	Otros codones que codifican el mismo "cambiado a" AA	AA Original	AA Cambiado a	Situación de la mutación del codón
E41A	GAG	GCA	GCG, GCC, GCT	E	A	41
E41W	GAG	TGG	-	E	W	41
E41F	GAG	TTC	TTT	E	F	41
E41Y	GAG	TAC	TAT	E	Y	41
E41R	GAG	CGT	CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	E	R	41
E94R	GAG	CGG	CGC, CGA, CGT, AGA, AGG	E	R	94
D100L	GAT	TTG	CTC, TTA, CTT, CTA CTG	D	L	100
D100M	GAT	ATG	-	D	M	100
D100Y	GAT	TAT	TAC	D	Y	100
D100F	GAT	TTT	TTC	D	F	100
D100W	GAT	TGG	-	D	W	100
A104L	GCT	CTT	CTC, TTA, TTG, CTA CTG	A	L	104
D111R	GAT	AGG	CGC, CGA, CGT, AGA, CGG	D	R	111
T112R	ACT	CGG	CGC, CGA, CGT, AGA, AGG	T	R	112
Y116W	TAT	TGG	-	Y	W	116
I117W	ATT	TGG	-	I	W	117
P118W	CCT	TGG	-	P	W	118
E125K	GAA	AAG	AAA	E	K	125
S168N	TCT	AAC	AAT	N	S	168
D171V	GAT	GTG	GTT, GTC, GTA	D	V	171
D171E	GAT	GAG	GAA	D	E	171
M176W	ATG	TGG	-	M	W	176
D230H	GAT	CAT	CAC	D	H	230
D230R	GAT	CGT	CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	D	R	230
D234W	GAT	TGG	-	D	W	234
D234V	GAT	GTG	GTT, GTC, GTA	D	V	234
D234G	GAT	GGT	GGC, GGA, GGG	D	G	234
D234R	GAT	CGG	CGC, CGA, CGT, AGA, AGG	D	R	234
D234K	GAT	AAG	AAA	D	K	234
Q265R	CAG	CGT	CGC, CGA, CGG, AGA, AGG	Q	R	265

Se describen en la presente memoria combinaciones (mezclas) de enzimas PLC, o los ácidos nucleicos que las codifican, que comprenden la secuencia de ácido nucleico SEC ID NO: 3 (que codifica el polipéptido SEC ID NO: 4) y/o la secuencia de ácido nucleico SEC ID NO: 1 (que codifica el polipéptido SEQ ID NO: 2); o combinaciones (mezclas) de enzimas PLC que comprenden la SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 4.

Se describen en la presente memoria combinaciones (mezclas) de enzimas PLC, o los ácidos nucleicos que las codifican, que comprenden la secuencia de ácido nucleico SEC ID NO: 3 (que codifica el polipéptido SEC ID NO: 4) y/o la secuencia de ácido nucleico SEC ID NO: 1 (que codifica el polipéptido SEQ ID NO: 2) que tiene uno, dos o más o todos los ácidos nucleicos (mutaciones) que codifican las mutaciones de aminoácidos enumeradas anteriormente en la tabla 8, que incluyen, p. ej., los cambios de codón descritos en la presente memoria.

Se describen en la presente memoria combinaciones (mezclas) de enzimas PLC codificadas por estos ácidos nucleicos, p. ej., combinaciones (mezclas) de enzimas PLC codificadas por una, varias o todas las variaciones de secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 3 y/o SEQ ID NO: 1, como se describe en la tabla 8.

Después de cribar los aciertos de GSSM y seleccionar los aciertos principales (véase la tabla 8 anterior), se realizaron ensayos de caracterización adicionales en placas de yema de huevo con el fin reducir el número de mutantes GSSM individuales que se llevan adelante para la combinación usando la tecnología GeneReassembly. La tabla 10 muestra los datos del ensayo con yema de huevo (p. ej., el ensayo de yema de huevo descrito a continuación), junto con los resultados de los ensayos de aceite y determinación de la actividad residual de

tolerancia térmica. La figura 11 ilustra los mutantes GSSM individuales que se seleccionaron para su inclusión en el procedimiento GeneReassembly. GeneReassembly se llevó a cabo como se describe en la presente memoria.

La tabla 9, a continuación, cita 288 secuencias polipeptídicas que se pueden usar para poner en práctica los métodos descritos en la presente memoria, p. ej., en combinación con polipéptidos descritos en la presente memoria (véanse, p. ej., las tablas 12 a 15), p. ej., como mezclas o combinaciones de enzimas. Las secuencias de la tabla 9 se crearon mediante la combinación GeneReassembly de los mutantes superiores GSSM individuales seleccionados. Todas son variantes de la secuencia de aminoácidos de inicio de la SEQ ID NO: 4 (la secuencia de "tipo natural" o "WT").

Para ayudar a la lectura de la tabla 9, por ejemplo, para la fosfolipasa caracterizada como fosfolipasa 1 "evolucionada" (segunda fila de la tabla):

- el resto de aminoácido de tipo natural "E", o ácido glutámico (glu) en la posición de resto 41 (de SEQ ID NO: 4) se modifica a un resto "Y" o tirosina (tyr);
- el resto de aminoácido de tipo natural "N", o asparagina (asp) en la posición de resto 100 (de SEQ ID NO: 4) se modifica a un resto "M", o metionina (met);
- el resto de aminoácido de tipo natural "N", o asparagina (asp) en la posición de resto 168 (de SEQ ID NO: 4) se modifica a un resto de "S" o serina (ser);
- el resto de aminoácido de tipo natural "N", o asparagina (asp) en la posición de resto 171 (de SEQ ID NO: 4) permanece como una "N"; y,
- el resto de aminoácido de tipo natural "M", o metionina (met) en la posición de resto 176 (de SEQ ID NO: 4) sigue siendo una "M".

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

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
1	Y	M	S	N	M
2	F	W	S	E	M
3	A	M	N	E	W
4	Y	F	S	E	M
5	Y	Y	S	N	M
6	R	F	N	E	M
7	E	Y	N	E	M
8	E	F	N	N	W
9	A	W	S	E	M
10	Y	Y	S	N	W
11	E	L	S	N	W
12	A	F	N	N	M
13	W	M	N	N	M
14	W	Y	S	E	M
15	R	L	N	E	W
16	W	W	S	E	W
17	W	N	S	N	M
18	W	L	N	E	M
19	R	N	N	E	M
20	F	N	N	N	W
21	Y	N	S	E	M
22	R	N	S	N	W
23	F	Y	S	N	W
24	F	L	N	E	W
25	A	N	N	E	M
26	A	W	N	N	M
27	W	M	N	E	W
28	F	L	S	E	W
29	Y	F	S	N	M
30	F	F	N	N	M
31	E	W	N	E	M
32	E	W	N	N	W
33	E	W	S	E	M
34	E	Y	S	N	M
35	E	N	S	N	M
36	E	L	N	E	W
37	Y	M	N	E	M

ES 2 674 900 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
38	F	N	S	N	W
39	W	N	N	E	W
40	E	M	S	N	M
41	Y	N	S	N	M
42	Y	Y	N	E	M
43	Y	L	N	E	M
44	F	M	N	N	W
45	F	N	S	E	M
46	F	M	S	N	W
47	E	F	S	N	W
48	W	Y	N	E	W
49	F	F	N	E	M
50	R	M	S	N	W
51	A	N	N	E	W
52	R	W	S	N	M
53	R	L	S	N	M
54	R	W	N	E	M
55	F	W	N	N	M
56	E	L	N	N	W
57	E	L	S	E	M
58	A	Y	S	N	W
59	E	Y	S	N	W
60	W	N	N	E	M
61	W	N	N	N	W
62	A	F	S	N	M
63	Y	M	S	E	W
64	R	F	S	N	M
65	A	M	N	N	M
66	F	N	N	E	M
67	E	M	N	E	M
68	E	Y	S	E	M
69	E	F	S	E	M
70	E	W	S	N	M
71	F	W	S	N	W
72	E	W	N	E	W
73	Y	L	N	N	W
74	Y	N	S	N	W
75	A	Y	S	E	W
76	E	F	S	N	M
77	W	L	S	N	M
78	Y	N	N	E	M
79	E	F	N	E	M
80	W	N	S	E	M
81	E	M	S	E	M
82	W	N	S	N	W
83	E	W	S	N	W
84	Y	M	N	E	W
85	E	Y	N	N	W
86	F	M	N	E	W
87	R	L	S	E	W
88	W	F	S	N	M
89	E	L	S	N	M
90	E	L	N	E	M
91	Y	F	N	N	W
92	Y	L	S	E	M
93	A	N	S	N	W
94	E	N	N	N	W
95	E	M	S	N	W
96	R	N	N	E	W
97	E	M	N	E	W
98	F	W	S	E	W
99	W	W	N	N	M

ES 2 674 900 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
100	W	N	N	N	M
101	E	N	S	E	W
102	R	W	S	E	W
103	A	W	S	E	W
104	A	Y	S	E	M
105	F	Y	S	E	W
106	A	Y	N	N	W
107	R	N	S	N	M
108	F	F	N	N	W
109	Y	N	N	E	W
110	E	W	S	E	W
111	R	N	S	E	M
112	E	L	N	N	M
113	E	N	S	N	W
114	R	W	S	N	W
115	F	W	N	E	M
116	Y	Y	N	E	W
117	F	Y	N	N	W
118	W	Y	S	N	W
119	A	N	S	N	M
120	A	L	S	N	W
121	E	Y	N	E	W
122	E	Y	S	E	W
123	W	N	S	E	W
124	E	M	N	N	M
125	E	N	N	E	M
126	Y	W	N	E	W
127	A	W	N	N	W
128	Y	Y	S	E	M
129	W	Y	N	N	W
130	F	Y	N	E	M
131	A	N	S	E	M
132	A	L	S	E	W
133	E	F	N	E	W
134	R	N	S	E	W
135	F	N	S	E	W
136	E	W	N	N	M
137	E	N	N	E	W
138	W	W	N	E	W
139	Y	W	S	N	W
140	W	Y	N	E	M
141	R	Y	S	N	W
142	F	Y	S	N	M
143	Y	F	S	N	W
144	R	L	N	E	M
145	F	N	N	E	W
146	Y	N	S	E	W
147	R	N	N	N	M
148	E	Y	N	N	M
149	R	W	S	E	M
150	Y	W	N	N	W
151	A	W	S	N	W
152	R	Y	S	E	M
153	R	Y	N	E	M
154	W	Y	S	E	W
155	A	Y	N	E	W
156	Y	M	N	N	W
157	Y	F	N	N	M
158	A	N	S	E	W
159	Y	N	N	N	M
160	E	F	N	N	M
161	Y	W	S	E	M

ES 2 674 900 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
162	Y	W	N	E	M
163	W	W	N	N	W
164	F	Y	N	E	W
165	W	Y	S	N	M
166	A	Y	N	E	M
167	F	F	S	E	W
168	W	L	S	E	M
169	Y	Y	S	E	W
170	E	L	S	E	W
171	F	N	N	N	M
172	E	N	N	N	M
173	W	W	S	E	M
174	A	W	N	E	M
175	R	Y	N	N	W
176	A	Y	S	N	M
177	R	Y	S	N	M
178	R	Y	S	E	W
179	R	M	N	E	W
180	W	F	N	E	M
181	E	F	S	E	W
182	E	M	S	E	W
183	A	N	N	N	M
184	E	N	S	E	M
185	F	W	N	N	W
186	F	W	S	N	M
187	R	Y	N	E	W
188	Y	Y	N	N	W
189	F	Y	S	E	M
190	F	N	S	N	M
191	R	F	S	E	W
192	F	L	S	N	W
193	W	Y	N	N	M
194	A	L	N	N	M
195	F	L	N	N	M
196	A	F	S	E	W
197	W	F	S	E	W
198	A	F	N	E	W
199	R	L	S	N	W
200	W	L	N	E	W
201	Y	L	S	N	W
202	R	M	N	E	M
203	A	M	S	E	W
204	Y	W	S	N	M
205	R	Y	N	N	M
206	Y	M	N	N	M
207	W	M	N	N	W
208	F	F	S	E	M
209	Y	F	S	E	W
210	W	F	S	E	M
211	W	L	S	N	W
212	R	L	N	N	W
213	W	L	N	N	W
214	W	M	S	N	W
215	W	M	S	E	W
216	R	W	N	E	W
217	R	L	N	N	M
218	R	F	N	N	M
219	A	N	N	N	W
220	Y	F	N	E	M
221	W	F	N	N	W
222	R	F	S	E	M
223	F	L	S	N	M

ES 2 674 900 T3

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
224	F	L	S	E	M
225	A	M	S	E	M
226	A	M	S	N	M
227	R	M	S	E	M
228	R	W	N	N	W
229	A	Y	N	N	M
230	Y	W	N	N	M
231	E	M	N	N	W
232	A	F	S	E	M
233	W	F	N	E	W
234	W	F	S	N	W
235	A	L	S	E	M
236	Y	L	N	E	W
237	F	M	S	E	M
238	W	M	S	E	M
239	F	M	S	E	W
240	Y	W	S	E	W
241	W	F	N	N	M
242	W	L	N	N	M
243	R	M	N	N	W
244	R	F	N	N	W
245	A	F	N	N	W
246	F	F	N	E	W
247	A	L	N	E	W
248	Y	L	S	N	M
249	F	M	S	N	M
250	Y	M	S	E	M
251	F	M	N	E	M
252	F	W	N	E	W
253	Y	L	N	N	M
254	R	W	N	N	M
255	Y	N	N	N	W
256	R	F	S	N	W
257	A	F	S	N	W
258	A	F	N	E	M
259	A	L	N	N	W
260	A	L	N	E	M
261	R	M	S	E	W
262	W	M	S	N	M
263	R	M	S	N	M
264	A	W	S	N	M
265	R	M	N	N	M
266	F	Y	N	N	M
267	A	M	N	N	W
268	F	F	S	N	M
269	Y	F	N	E	W
270	F	L	N	E	M
271	Y	L	S	E	W
272	F	L	N	N	W
273	Y	M	S	N	W
274	A	M	N	E	M
275	A	W	N	E	W
276	W	W	S	N	W
277	F	M	N	N	M
278	Y	Y	N	N	M
279	R	N	N	N	W
280	F	F	S	N	W
281	R	F	N	E	W
282	A	L	S	N	M
283	W	L	S	E	W
284	R	L	S	E	M
285	W	M	N	E	M

Fosfolipasa "evolucionada"	E41	N100	N168	N171	M176
286	A	M	S	N	W
287	W	W	N	E	M
288	W	W	S	N	M

La tabla 10 resume los resultados de ensayos que analizan diversas actividades enzimáticas y comportamiento del sistema de expresión de enzimas de ejemplo de la descripción (y en el caso del sistema de expresión de *Pichia Pastoris* - la actividad de expresión de los ácidos nucleicos que los codifican), siendo todos los polipéptidos variantes de secuencia de la secuencia de fosfolipasa de inicio de SEQ ID NO: 4 (codificada, p. ej., por la secuencia de ácido nucleico SEQ ID NO: 3).

Tabla 10: Análisis de actividad y resumen

			Ensayo de aceite	Expresión en <i>Pichia Pastoris</i>	Porcentaje de actividad residual de tolerancia térmica	
Mutantes superiores de GSSM PLC	Mutantes superiores de GSSM Resto de aminoácido n°	GSSM Cambio de aminoácido	% hidrólisis de PA a las 24 h	Actividad en placas de yema de huevo	Proteína expresada en <i>E. coli</i>	Proteína expresada en <i>Pichia pastoris</i>
Aceite bruto			0			
E41E	41	Tipo natural	20	Activo	81%	100%
E41A	41	A	29	Activo	83%	99%
E41W	41	W	31	Activo	94%	N/E
E41F	41	F	68	Inactivo	80%	N/E
E41Y	41	Y	69	Inactivo	89%	N/E
E41R	41	R	66	Activo	78%	104%
E94R	94	R	23	Activo	N/E	N/E
D100L	100	L	45	Activo	N/E	87%
D100M	100	M	48	Activo	N/E	104%
D100Y	100	Y	57	Activo	N/E	105%
D100F	100	F	59	Activo	43%	92%
D100W	100	W	61	Activo	N/E	91%
A104L	104	L	26	Activo	115%	86%
D111R	111	R	27	Activo	N/E	99%
T112R	112	R	23	Activo	107%	92%
Y116W	116	W	23	Activo	118%	102%
I117W	117	W	15	Activo	109%	102%
P118W	118	W	17	Activo	N/E	N/E
E125K	125	K	15	Activo	99%	86%
D171V	171	V	29	Activo	N/E	106%
D171E	171	E	44	Activo	N/E	110%
M176W	176	W	42	Activo	101%	101%
D230H	230	H	21	Activo	N/E	97%
D230R	230	R	14	Activo	107%	104%
D234W	234	W	10	Activo	101%	98%
D234V	234	V	0	Activo	109%	102%
D234G	234	G	3	Activo	109%	114%
D234R	234	R	27	Activo	114%	90%
D234K	234	K	23	Activo	N/E	101%
Q265R	265	R	0	Inactivo	N/E	N/E
E41A NNN	41, 100, 168, 171	A, N, N, N	72		63%	
E41A NKN	41, 100, 168, 171	A, N, K, N	75		65%	
E41A NRN	41, 100, 168, 171	A, N, R, N	79		75%	
E41A NSN	41, 100, 168, 171	A, N, S, N	72		85%	

Ensayo de la yema de huevo

- 10 El ensayo de yema de huevo se lleva a cabo como sigue:

Las placas de agar con yema de huevo se preparan añadiendo fosfatidilcolina de yema de huevo al 0,5% (en peso) al medio antes del tratamiento en autoclave. Las placas son más uniformes si la fosfatidilcolina se dispersa con una mezcladora de alta cizalladura antes de tratamiento en autoclave del medio.

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

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

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

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

- 10 PC de yema de huevo seca, tipo XE, aprox. 60% PC por TLC.

Se describen en la presente memoria combinaciones o mezclas de enzimas de la invención y enzimas como se describe en el Ejemplo 2, que incluyen, p. ej., todas las variantes de enzimas descritas en la tabla 8 y la tabla 9, y en el documento WO 2008/036863.

- 15 Ejemplo 3: Preparación de enzimas de fosfolipasa C específicas de fosfatidilinositol (PI-PLC) de ejemplo de la invención

Este ejemplo describe enzimas de fosfolipasa C específicas de fosfatidilinositol (PI-PLC) de ejemplo de la invención, que incluyen el polipéptido que tiene la secuencia expuesta en la SEQ ID NO: 8, y los polipéptidos que tienen una actividad de PLC-PI como se describe en las tablas 12 a 15; y ejemplos de métodos para prepararlas y usarlas, y ensayos para determinar su actividad de fosfolipasa.

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

En estos casos, el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (codificado, p. ej., por SEQ ID NO: 5) se seleccionó como la secuencia "parental" o "de tipo natural" para una modificación adicional (o "evolución"); en particular, la subsecuencia subrayada (véase a continuación) de SEQ ID NO: 6 (o SEQ ID NO: 5) se usó con la adición de una metionina inicial (p. ej., **MASSINV** ...), como la secuencia "parental" o de inicio para "evolución" o cambios de secuencia para hacer variantes de enzimas. Tenga en cuenta que la secuencia "parental" o de inicio para la "evolución" carece de los primeros 30 aminoácidos, que incluye la *secuencia de señal (cursiva)*, o

MNNKKFILKLFICSMVLSAFVF, codificados, p. ej., por:

*ATGAACAATAAGAAGTTTATTTTGAAGTTATTCATATGTAGTATGGTACTTAGCGCCT
TTGTATTT*

- 30 La secuencia "parental" o de inicio para la "evolución" también carece de un sitio de escisión previsto (negrita y cursiva) **GCTTTC** (ácido nucleico) o **AF** (restos de aminoácidos).

La "evolución" (cambio de secuencia, o "mutación") se realizó usando "Mutagénesis de saturación de sitio genético" (GSSM) y GeneReassembly (véase más arriba la descripción de GSSM y GeneReassembly) en la SEQ ID NO: 5 usando las secuencias subrayadas, a continuación, con la adición de ácido nucleico que codifica una "M" o metionina inicial (p. ej., para la secuencia de aminoácidos codificada, **MASSINV** ...), como secuencia parental o inicial para la "evolución":

SEQ ID NO:5:

ATGAACAATAAGAAGTTTATTTTGAAGTTATTCATATGTAGTATGGTACTTAGCGCCTTT
GTATTTGCTTTCAAATGATAAGAAAACCGTTGCAGCTAGCTCTATTAATGTGCTTGAA
AATTGGTCTAGATGGATGAAACCTATAAATGATGACATACCGTTAGCACGAATTTC
ATTCCAGGAACACATGATAGTGGAACGTTCAAGTTGCAAAATCCGATAAAGCAAGT
GTGGGGAATGACGCAAGAATATGATTTTCGTTATCAAATGGATCATGGAGCTAGAA
TTTTTGATATAAGAGGGCGTTTAAACAGATGATAATACGATAGTTCTTCATCATGGGC
CATTATATCTTTATGTAACACTGCACGAATTTATAAACGAAGCGAAACAATTTTAA
AAGATAATCCAAGTGAAACGATTATTATGTCTTTAAAAAAGAGTATGAGGATATG

AAAGGGGCGGAAAGCTCATTTAGTAGTACGTTTGAGAAAAATTATTTTCGTGATCCA
ATCTTTTAAACAGAAAGGAATATAAAGCTTGGAGATGCTCGTGGGAAAATTGT
ATTACTAAAAAGATATAGTGGTAGTAATGAATCTGGGGGATATAATAATTCTATTG
GCCAGACAATGAGACGTTTACCTCAACTATAAATCAAAATGTAAATGTAACAGTAC
AAGATAAATATAAAGTGAGTTATGATGAGAAAAATAAACGCTATTAAAGATACATTA
AATGAAACGATTAAACAATAGTGAAGATGTTAATCATCTATATATTAATTTTACAAGC
TTGTCTTCTGGTGGTACAGCATGGAATAGTCCATATTATTATGCGTCCTACATAAATC
CTGAAATTGCAAATTATATGAAGCAAAAGAATCCTACGAGAGTGGGCTGGATAATA
CAAGATTATATAAATGAAAAATGGTCACCATTACTTTATCAAGAAGTTATAAGAGC
GAATAAGTCACTTGTAAAATAG

SEQ ID NO:6:

MNNKKFILKLFICSMVLSAFVFAFNDKKTVAASSINVLENWSRWMKPINDDIPLARISIPG
THDSGTFKLQNPQVWGMTQOEYDFRYQMDHGARIFDIRGRLTDDNTIVLHHGPLYLY
VTLHEFINEAKQFLKDNPSETIIMSLKKEYEDMKGAESSFSSTFEKNYFRDPFLKTEGNI
KLGDARGKIVLLKRYSGSNESGGYNNFYWPDNETFTSTINQNVNVTVDKYKVSYDEK
INAKDTLNETINNSEDEVNHLINFTSLSSGGTAWNSPYYYASYINPEIANYMKQKNPTR
VGWIIQDYINEKWSPLLYQEVIRANKSLVK

Por lo tanto, la secuencia inicial para la GSSM era un ácido nucleico que codifica:

MASSINVLENWSRWMKPINDDIPLARISIPGTHDSGTFKLQNPQVWGMTQOEYDFRYQ
MDHGARIFDIRGRLTDDNTIVLHHGPLYLYVTLHEFINEAKQFLKDNPSETIIMSLKKEYE
DMKGAESSFSSTFEKNYFRDPFLKTEGNIKLGDARGKIVLLKRYSGSNESGGYNNFYWP
DNETFTSTINQNVNVTVDKYKVSYDEKINAKDTLNETINNSEDEVNHLINFTSLSSGG
TAWNSPYYYASYINPEIANYMKQKNPTRVGWIIQDYINEKWSPLLYQEVIRANKSLVK

- 5 Las variantes de ácido nucleico "evolucionadas" (las nuevas secuencias de ácido nucleico preparadas sometiendo la SEQ ID NO: 5 a GSSM) se subclonaron para la expresión en *E. coli* (para la fase de GSSM) o en *P. fluorescens* (para la fase de GeneReassembly).
- 10 La GSSM se realizó como se describe en, p. ej., las patentes de EE.UU. Nº 6.171.820; 6.238.884 (véase también la explicación en la presente memoria). Véase también el documento WO 2008/036863.

Las nuevas secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos "variantes" o "evolucionadas" nuevas resultantes se ensayaron usando un ensayo de alta productividad como sigue:

SOP para ensayo de estabilidad térmica de alta productividad

- 15 Los cribados de GSSM usaban el hospedante *E. coli*, XL1Blue (Stratagene, San Diego, CA), con el vector pASK (IBA GmbH, Göttingen, Alemania). Los cribados de GeneReassembly usaban el hospedante *Pseudomonas fluorescens* (Dow Global Technologies Inc., solicitud de publicación de patente de EE.UU. Nº 20050130160, solicitud de publicación de patente de EE.UU. Nº 20050186666 y la solicitud de publicación de patente de EE.UU. Nº 20060110747) con el vector pDOW1169 (Dow Global Technologies Inc., solicitud de publicación de patente de EE.UU. Nº 20080058262) y se seleccionaron por crecimiento en medio mínimo M9 (Dow Global Technologies Inc., solicitud de publicación de patente de EE.UU. Nº 20050186666).
- 20

Placas primarias

1. Las placas primarias se crearon recogiendo colonias de variantes de GSSM o GeneReassembly en una placa de 384 pocillos que contenía 50 µl de medio por pocillo.

- 25 a. El medio usado para cultivar las variantes de GSSM era LB y las variantes de GeneReassembly usaron M9 (-uracil).

2. Las placas primarias se cultivaron durante la noche a 30°C en una incubadora humidificada. Seguido de la adición de 20% de glicerol antes de almacenar las placas a -80°C.

Placas de expresión

- 30 1. Las placas primarias se descongelaron a temperatura ambiente o 30°C antes de la replicación.

2. Las placas primarias se replicaron usando un dispositivo de agujas para 384 pocillos para la inoculación de las placas de expresión que contenían 60 µl de medio. Se usó el mismo medio para las placas de expresión que para las placas primarias.

5 3. Las placas de expresión se cultivaron durante la noche (aproximadamente 16 horas) a 30°C en una incubadora humidificada.

4. Las placas de expresión para el cribado de GSSM se indujeron con 200 ng/ml de tetraciclina anhidra (AHT) y las placas de GeneReassembly se indujeron con una concentración final de IPTG 0,3 mM.

5. Las placas de expresión se cultivaron durante la noche a 30°C en una incubadora humidificada.

10 6. Las placas de expresión después se almacenaron a -20°C hasta que se congelaron, generalmente durante la noche, para lisar las células hospedantes.

7. Antes de analizar las placas de expresión, se descongelaron a temperatura ambiente o a 30°C.

Cribado robótico de tolerancia térmica

1. El robot se programó para transferir 10 µl de las placas de expresión a una placa de ensayo TA y una placa de ensayo de calentamiento.

15 2. La placa de ensayo TA permaneció a temperatura ambiente mientras que la placa de ensayo de calentamiento se incubó a temperatura elevada durante 1 hora. Durante el tratamiento térmico, las placas de ensayo de calentamiento se cubrieron con una cubierta de espuma. Las temperaturas para el tratamiento térmico se dan en la siguiente tabla 11:

Tabla 11. Temperaturas para cribados robóticos primarios y secundarios.

Cribado	Temperatura de tratamiento de las variantes de GSSM	Temperatura de tratamiento de las variantes de GeneReassembly
Primario	50°C, 55°C	65°C
Secundario	57°C, 60°C	70°C

20 3. Después del tratamiento térmico, se añadieron 40 µl del sustrato, fosfato de metilumbeliferilo y mio-inositol (MUP), usando un dispositivo Titertek. El sustrato se preparó a una concentración 3 mM de modo que la concentración final en las placas de ensayo es 2,5 mM.

25 4. Las placas de ensayo se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Después se midió la fluorescencia como unidades relativas de fluorescencia (RFU) en un lector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 360 nm y una emisión de 465 nm.

Cálculo del% de actividad residual

1. Cada placa de ensayo contenía 12 controles positivos y 12 negativos. Los controles positivos contenían la enzima de tipo natural y los controles negativos contenían solo el vector dentro del organismo hospedante.

30 2. La fluorescencia de los controles negativos se promedió para cada placa de 384 pocillos y se restó de la fluorescencia de las variantes de GSSM o GeneReassembly para las placas de ensayo de TA y de ensayo de calentamiento.

3. Después, cada pocillo de la placa de ensayo de calentamiento se dividió entre el pocillo correspondiente de la placa de ensayo de TA para obtener un porcentaje de actividad residual (% RA) para cada variante.

35 4. El % de RA se usó para clasificar las variantes más tolerantes a la temperatura del cribado robótico de alta productividad. Estos resultados se confirmaron en ensayos adicionales

Cribado secundario

40 1. Se confirmó una tolerancia térmica mejorada utilizando cribados secundarios en aciertos seleccionados. Los aciertos se llevaron de las placas primarias del cribado principal a nuevas placas primarias y se ensayaron a temperaturas elevadas dadas en la tabla 11. El protocolo de ensayo era el mismo que el protocolo detallado anteriormente para el cribado principal.

Tabla 12: Resume las secuencias y el porcentaje (%) de actividad residual de las variantes superiores de GSSM tolerantes a la temperatura seleccionadas para la construcción de la biblioteca GeneReassembly.

Sitio de AA	AA original	AA nuevo	% de actividad residual		
			55°C	57°C	60°C
105	D	G	81,0%	58,8%	3,5%
175	N	P	119,9%	75,7%	2,1%
176	N	F	136,7%	103,8%	10,1%
176	N	L	102,2%	97,2%	9,8%
176	N	W	131,9%	61,7%	3,2%
176	N	Y	180,0%	106,0%	4,1%
191	Q	G	124,6%	77,6%	2,3%
205	Y	L	174,3%	114,2%	0,0%
244	N	T	174,6%	95,7%	5,0%
252	Y	L	148,4%	62,0%	22,2%
252	Y	R	149,3%	187,2%	15,4%
276	Y	F	161,6%	112,1%	1,1%
282	S	C	161,6%	116,4%	8,9%
282	S	H	256,8%	142,0%	0,7%
282	S	L	143,6%	97,8%	0,1%
282	S	P	147,6%	96,8%	1,0%
282	S	R	101,6%	72,5%	4,9%
284	L	F	85,9%	72%	0%
291	R	N	86,4%	75,5%	5,6%

Los mutantes puntuales y los datos asociados para la tabla 12 se muestran inmediatamente debajo como la tabla 13. Nota, en la tabla 13, la numeración de las posiciones de aminoácidos empieza con la metionina inicial añadida (p. ej., el aminoácido "M" es la posición 1, el aminoácido "A" es la posición 2, el aminoácido "S" es la posición 3, el aminoácido "S" es la posición 4, el aminoácido "I" es la posición 5, el aminoácido "N" es la posición 6, y así sucesivamente). Esto es importante para aclarar: para las variantes de SEQ ID NO: 6, la numeración de los cambios de aminoácidos empieza con el aminoácido 31 de la SEQ ID NO: 6, donde el aminoácido 31 ("A") se reemplaza por metionina ("M").

Tabla 13

Posición de aminoácido	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	Placa TA (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFU)
5	I	R	109,5%	-72,4%	-27,7%	-83,3%	119213
10	N	P	142,6%	-97,8%	-167,1%	-149,5%	47737
12	S	C	98,6%	37,8%	19,6%	-1,6%	3926817
17	P	R	105,9%	70,7%	50,6%	0,6%	2834413
20	D	R	168,8%	56,2%	9,5%	-37,7%	243024
22	I	R	164,2%	-56,3%	-8,8%	-67,9%	501992
30	P	Q	69,1%	134,8%	119,4%	56,4%	-98428
31	G	L	59,7%	321,6%	52,3%	66,5%	-89982
32	T	R	112,1%	234,3%	158,3%	141,4%	-32840
32	T	P	-12,9%	-39,0%	5,5%	56,1%	506296
32	T	N	-41,5%	25,5%	-6,8%	15,2%	215696
34	D	G	111,4%	105,7%	112,3%	17,0%	292094
34	D	V	98,0%	-39,1%	19,5%	-8,2%	623943
34	D	S	108,0%	118,4%	67,9%	-18,3%	400778
48	W	C		0,7%	-88%	48%	279831
52	Q	G	-19,0%	-31,2%	45,1%	-11,0%	440078
52	Q	L	-24,5%	-18,9%	-17,5%	-15,0%	243731
52	Q	R	-13,8%	-103,8%	-45,8%	-357,5%	64939
56	F	P	-19,0%	-41,0%	-17,8%	-14,6%	528700
57	R	P		36,5%	-5%	6%	673072
57	R	H	196,2%	54,8%	11,4%	-2,7%	1766819
57	R	W		94,5%	32%	-4%	888544
58	Y	G		87,4%	8%	0%	2203075
59	Q	P		125,1%	-1003%	211%	30707
64	A	P		-17,1%	-38%	21%	298218
67	F	A		-84,1%	-167%	-46%	132639
68	D	G		859,6%	2454%	113%	-5565
69	I	R	550,5%	219,2%	283,9%	123,1%	-39813
69	I	S		-26,7%	4%	-2%	837975
79	I	R	111,4%	216,0%	308,4%	539,6%	-47241
79	I	C		-9,4%	18%	-19%	901719
79	I	S		242,7%	-642%	-145%	-33068
103	L	E		391,0%	-504%	492%	26863
103	L	G	312,7%	333,5%	394,9%	317,6%	-14442
103	L	R		135,6%	279%	238%	-42440
103	L	A		13,2%	-7%	38%	520801
103	L	S	105,0%	48,7%	-162,4%	-90,0%	53552
103	L	N		-331,1%	-381%	-229%	51581
104	K	P		-1319,4%	1845%	4021%	-7815

Posición de aminoácido	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	Placa TA (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFU)
105	D	G	106,9%	81,0%	58,8%	3,5%	1739646
107	P	H		30,7%	7%	-3%	2397754
107	P	R		21,4%	4%	-3%	3155286
107	P	L	65,8%	55,2%	34,4%	-4,7%	447512
108	S	G	95,5%	65,1%	49,6%	-4,3%	307147
110	T	F		-10,5%	-7%	2%	875451
110	T	K	126,1%	52,7%	18,9%	-49,3%	134884
112	I	A		-23,7%	-20%	-4%	453446
112	I	K	55,2%	95,2%	15,4%	-46,1%	59053
115	L	E		-102,6%	-89%	103%	48860
115	L	N		-12,4%	-15%	-10%	1025328
115	L	S	-5,3%	-8,9%	-10,3%	-10,1%	556124
115	L	G	-21,1%	-36,4%	-10,3%	-41,2 %	644336
115	L	R		106,0%	-28%	-215%	-55337
116	K	T		18,1%	7%	18%	230855
116	K	V	45,1%	-4,6%	-19,7%	-14,4%	235560
116	K	L	78,8%	-0,9%	-37,9%	-19,2%	343119
116	K	P	97,5%	16,1%	-20,9%	-32,3%	182525
116	K	C		-26,1	-64%	-81%	226865
116	K	F		-560,3%	-780%	-126%	49518
116	K	Y		-245,0%	-488%	-141%	39189
117	K	G		10,2%	-26%	-21%	387561
117	K	S		-31,6%	-25%	-23%	548036
118	E	K		167,4%	409%	163%	-44595
118	E	Y		106,8%	-57%	40%	132171
118	E	G	45,4%	-7,5%	-11,7%	-10,8%	408480
118	E	P	100,9%	-77,5%	-82,4%	-11,7%	227778
118	E	W		-140,1%	-30%	-49%	115308
118	E	A		-61,4%	-217%	-58%	106520
118	E	V		-112,9%	57%	-89%	54418
118	E	S	-111,6%	-294,0%	-83,6%	-172,0%	84511
118	E	L	-615,3%	-772,3%	-540,2%	-764,3%	6410
127	S	G		167,2%	24%	-2%	2332741
129	F	S	-103,1%	-140,8%	-135,6%	-138,6%	38893
129	F	K		166,2%	46%	-224%	-32568
130	S	A		209,1%	13%	-3%	2817649
133	F	S		-96,6%	245%	124%	68055
134	E	G		-11,5%	-6%	-6%	1437969
134	E	P	-50,2%	-179,6%	-112,4%	-71,5%	107620
136	N	P		-7,0%	-9%	-7%	967546
139	R	S		95,2%	9%	7%	3316801

Posición de aminoácido	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	Placa TA (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFU)
139	R	M		65,5%	3%	-2%	3452962
139	R	P		176,0%	53%	-3%	2170436
140	D	T		7,5%	-4%	0%	3067537
141	P	L		12,2%	-3%	-1%	3026938
142	I	P	105,3%	42,2%	15,3%	-4,4%	1571795
142	I	R		-9,6%	-5%	-5%	2239061
142	I	G		-2,2%	-7%	-7%	1821775
143	F	G		84,3%	-10%	14%	547682
143	F	V	7,9%	-5,3%	-3,4%	-3,4%	2475003
143	F	S	27,1%	-10,3%	-12,1%	-11,6%	492372
143	F	T		7,0%	-22%	-15%	1395343
144	L	R		-3,1%	-8%	3%	3104379
144	L	P		7,8%	-2%	0%	1673141
151	K	T		112,2%	6%	0%	3537421
153	G	M		103,8%	1%	-7%	2086156
153	G	V		97,6%	-8%	-13%	1534593
154	D	R		-4,6%	-3%	-3%	1464648
155	A	R	101,5%	149,6%	225,5%	159,3%	-37404
155	A	P		505,6%	86%	111%	-84103
159	I	T	80,3%	9,4%	-3,2%	-4,9%	1414669
160	V	R		-72,5%	-8%	-88%	360024
162	L	S	77,9%	-1,3%	-0,7%	9,5%	653562
162	L	F		126,7%	11%	5%	2305681
162	L	G	84,3%	14,3%	-14,4%	-24,4%	822742
162	L	E	-8,9%	-25,7%	-27,5%	-99,2%	255160
162	L	D		-252,6%	-180%	-107%	41739
162	L	R	8,6%	10,3%	-856,1%	-184,2%	-45546
163	K	E		-6,9%	-10%	10%	1257238
163	K	W		-6,8%	-25%	-11%	935455
164	R	L		684,4%	2692%	890%	-11232
164	R	T		-267,9%	-259%	-276%	35611
165	Y	E	4,2%	-3,1%	-3,5%	-3,1%	1330418
165	Y	S	-0,6%	-4,5%	-5,0%	-4,5%	1204269
165	Y	D		-9,9%	-26%	-8%	849532
165	Y	G		-21,0%	-9%	-12%	703657
174	Y	R	-27,9%	-10,0%	-12,8%	-11,4%	478910
175	N	P	186,8%	119,9%	75,7%	2,1%	3423684
176	N	F	151,7%	136,7%	103,8%	10,1%	3166873
176	N	L	159,0%	102,2%	97,2%	9,8%	1973048
176	N	Y	215,1%	180,0%	106,0%	4,1%	2686812
176	N	W	153,3%	131,9%	61,7%	3,2%	3375824

Posición de aminoácido	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	Placa TA (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFU)
179	W	V		654,7%	-2109%	736%	21624
179	W	L		211,2%	-87%	-107%	66095
187	S	V		81,7%	20%	9%	3668103
191	Q	G	141,5%	124,6%	77,6%	2,3%	4030462
193	V	L	229,3%	177,3%	85,1%	-0,3%	2339956
196	T	P	253,8%	195,0%	122,7%	363,7%	-81049
197	V	R	84,1%	159,2%	43,9%	67,0%	-67056
201	Y	R		97,6%	244%	571%	-94821
201	Y	A		105,4%	168%	262%	-79800
201	Y	L	114,7%	108,5%	94,5%	111,0%	-69345
201	Y	P		99,5%	87%	109%	-77061
201	Y	Q	103,9%	100,2%	114,2%	100,9%	-78259
201	Y	E	98,4%	196,7%	94,8%	22,0%	-75564
201	Y	S	93,7%	276,0%	-294,6%	-67,2%	-89008
201	Y	H		-469,7%	-450%	-233%	38056
205	Y	L	176,2%	174,3%	114,2%	-0,4%	6193145
206	D	C		68,6%	7%	2%	2578407
208	K	S		-95,6%	-56%	-50%	101991
215	T	L	241,1%	100,4%	42,5%	-2,6%	2276174
216	L	A		2,1%	-22%	9%	739181
222	N	P		-1,8%	-27%	16%	605972
238	S	G	188,7%	120,1%	64,7%	-8,5%	1960910
244	N	T	147,2%	174,6%	95,7%	5,0%	3312364
244	N	S	144,6%	234,0%	148,4%	1,1%	2624829
252	Y	L	131,0%	148,4%	62,0%	22,2%	6033264
252	Y	R	220,0%	149,3%	187,2%	15,4%	3753916
252	Y	I		96,9%	41,4%	3,9%	10341043
261	M	I	129,8%	117,8%	90,7%	-1,0%	3413811
268	R	S		-22,2%	-19%	-23%	353376
268	R	L		-513,9%	-333%	-149%	49591
272	I	S	163,2%	519,8%	300,9%	1188,1%	-42385
272	I	R	4,9%	485,2%	277,9%	404,0%	-76173
272	I	G		20,2%	161%	102%	-85289
272	I	E	199,6%	142,4%	163,1%	97,2%	-65592
272	I	N		-91,2%	-208%	-77%	99735
272	I	P	92,7%	-130,0%	-142,8%	-113,3%	73365
276	Y	F	193,7%	161,6%	112,1%	1,1%	2536481
282	S	C	153,5%	161,6%	116,4%	8,9%	1804086
282	S	R	108,4%	101,6%	72,5%	4,9%	3108844
282	S	P	158,8%	147,6%	96,8%	1,0%	3082327
282	S	H	193,9%	256,8%	142,0%	0,7%	1966076

Posición de aminoácido	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	50°C	55°C	57°C	60°C	Placa TA (datos en unidades relativas de fluorescencia, RFU)
282	S	L	164,4%	143,6%	97,8%	0,1%	2208563
282	S	E	159,0%	199,7%	77,4%	-1,0%	2499129
282	S	W		116,8%	6%	-3%	2625324
282	S	K	180,0%	181,2%	93,1%	-5,0%	1412699
282	S	F	144,9%	113,1%	28,7%	-5,1%	1668567
284	L	F		85,9%	72%	-1%	3744515
287	Q	L	106,5%	68,1%	34,0%	-7,2%	2032181
291	R	N	143,8%	86,4%	75,5%	5,6%	3463258
296	L	E		-169,4%	20%	31%	188612
	Control negativo			103,5%	130%	182%	-60543
	Control negativo		161,4%	136,6%	156,0%	157,1%	-47900
	Control negativo			450,3%	69%	156%	-63840
	Control negativo			125,1%	267%	137%	-67530
	Control negativo		483,8%	140,8%	138,9%	135,3%	-33533
	Control negativo		508,5%	123,0%	138,5%	116,6%	-44840
	Control negativo			104,3%	119%	114%	-58308
	Control negativo		150,3%	96,9%	96,4%	89,8%	-57605
	Control positivo			106,8%	12%	6%	3745053
	Control positivo			122,1%	3%	6%	2931573
	Control positivo			106,6%	8%	6%	3418796
	Control positivo		92,3%	70,7%	55,1%	3,9%	5793014
	Control positivo			55,1%	7%	2%	3312736
	Control positivo		153,4%	89,3%	51,6%	1,3%	4765881
	Control positivo		132,9%	70,0%	34,0%	0,4%	5520616
	Control positivo		154,3%	80,7%	17,6%	-0,7%	4018936

5 El GeneReassembly se realizó en ácidos nucleicos como se describe en la presente memoria usando los mutantes termoestables superiores de la fase de GSSM; y condiciones de ensayo para las variantes de GeneReassembly descritas anteriormente en la sección titulada "SOP para ensayo de estabilidad térmica de alta productividad", de este ejemplo, anterior. (Para reiterar: los ácidos nucleicos que codifican los treinta y un (31) aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (codificados, p. ej., por SEQ ID NO: 5) se eliminaron y se añadieron nucleótidos que codifican una metionina inicial para el ácido nucleico que "evolució" en el GSSM y GeneReassembly).

10 La mejor combinación de variantes de enzimas después de GeneReassembly (en los mutantes termoestables de la fase GSSM) se exponen en la tabla 14, a continuación. Se proporcionan en la presente memoria enzimas y los ácidos nucleicos que los codifican, que comprenden uno cualquiera, varios o todos los cambios de aminoácidos descritos en la tabla 14. Por ejemplo, de la primera fila de la tabla 14, una enzima de ejemplo es una enzima que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 6, pero con cambios de aminoácidos como sigue: N176F, Q191G, Y205L, N244T, Y252R, Y276F, S282H, L284F y/o R291N.

Los datos de actividad para estas enzimas de ejemplo se muestran en la tabla 15, a continuación.

Tabla 14- Mejor combinación de variantes de enzimas después de GeneReassembly

Cambio de aminoácido													
ID	N175	N176		Q191	Y205	N244	Y252		Y276	S282	L284	R291	
A1		F		G	L	T	R		F	H	F	N	
B1	P	Y	Y178H	G	L	T	R		F	H		N	
3	P	Y		G	L	T	R		F	H	F	N	
4	P	L		G	L	T	R		F	L	F	N	
5		F		G		T	R		F	H		N	
6	P	Y		G	L		R	M261I	F	R		N	
8	P	Y		G	L	T	R		F	R		N	
B2	P	F		G	L	T	L		F	H		N	
11		F		G		T	R		F	H		N	
12		Y		G	L	T			F	H	F	N	
14	P	F		G	L	T	R		F	L	F	N	
G2		F		G	L	T	R	M261I	F	H		N	
17	P	Y		G	L	T	R		F	L	F	N	
18		F		G		T	R		F	H	F		
20		F		G	L	T	R		F	H	F	N	
21		L		G	L	T	L		F	H	F		
22	P	Y		G	L	T			F	H		N	
23		F		G		T	R		F	R	F		
24	P	Y		G	L	T	L		F	R	F		
A4		F		G	L	T	L		F	R	F		
26		F		G	L	T	L		F	R			
27		Y		G	L	T	R		F	H	F	N	
28	P			G	L		R		F	H	F	N	
29	P	F		G	L	T	L		F	H	F	N	
30	P	L			L	T	R		F	P	F		
32	P	W		G	L	T	R		F	R	F		
33	P	Y			L	T	R		F	H	F	N	
34	P	Y		G		T	L		F	R	F	N	
35		F		G	L	T	R		F	R	F	N	
36	P	W		G	L	T	L		F	R		N	
37		F		G	L	T	L		F	P			
39		F		G		T	L		F	H	F	N	
40	P	Y		G		T	R		F	R	F	N	
41		F		G	L	T			F	R	F	N	
42	P	Y		G		T	R		F	R	F	N	
43	P	Y		G	L		L			H	F	N	
44	P	W		G	L	T	R		F	R	F		
45	P	Y		G		T	R				F	N	
46	P	W		G	L	T	L		F	R			

ID	Cambio de aminoácido													
47	P	Y		G	L				L		F	R	F	N
48	P	Y		G	L				L			H	F	
49	P			G				T	R		F	H		N
50		L		G	L			T	L		F	H		
51	P	F		G	L				R			H	F	N
52	P	Y		G				T	L		F	L	F	
53		Y	N210N	G	L				R		F	H	F	N
54		F		G	L				R			H		N
55	P	W		G	L				R		F	P	F	
57	P	Y		G	L			T	R			R	F	
58	P	F		G	L			T	L		F	H		
59	P	F			L			T	R		F	H		N
60	P	W		G	L			T	L		F	R	F	
61	P			G	L			T	L			H	F	N

Los datos generales para las variantes de GeneReassembly son:

Tabla 15

Nombre	Actividad residual 65C	Actividad residual 70C	N175	N176	Q191	Y205	N244	Y252	Y276	S282	L284	R291	Mutación adicional
A1	106,24	37,14		F	G	L	T	R	F	H	F	N	
B1	111,5	23,4	P	Y	G	L	T	R	F	H		N	Y178H
3	106,77	25,48	P	Y	G	L	T	R	F	H	F	N	
4	105,4	15,89	P	L	G	L	T	R	F	L	F	N	
5	88,84	16,39		F	G		T	R	F	H		N	
6	100,71	20,78	P	Y	G	L		R	F	R		N	M261I
8	105,64	16,94	P	Y	G	L	T	R	F	R		N	
B2	101,44	22,03	P	F	G	L	T	L	F	H		N	
11	93,96	22,8		F	G		T	R	F	H		N	
12	95,32	18,59		Y	G	L	T		F	H	F	N	
14	83,24	22,83	P	F	G	L	T	R	F	L	F	N	
G2	97,66	83,7		F	G	L	T	R	F	H		N	M261I
17	95,46	40,92	P	Y	G	L	T	R	F	L	F	N	
18	95,98	16,72		F	G		T	R	F	H	F		
20	93,48	28,26		F	G	L	T	R	F	H	F	N	
21	93,52	15,54		L	G	L	T	L	F	H	F		
22	82,46	17,4	P	Y	G	L	T		F	H		N	
23	86,13	17,28		F	G		T	R	F	R	F		
24	121,7	44	P	Y	G	L	T	L	F	R	F		
A4	148,28	35,27		F	G	L	T	L	F	R	F		
26	108,03	18,92		F	G	L	T	L	F	R	F		

Nombre	Actividad residual 65C	Actividad residual 70C	N175	N176	Q191	Y205	N244	Y252	Y276	S282	L284	R291	Mutación adicional
27	85,02	16,09		Y	G	L	T	R	F	H	F	N	
28	86,9	16,52	P		G	L		R	F	H	F	N	
29	157,32	22,71	P	F	G	L	T	L	F	H	F	N	
30	86,49	15,47	P	L		L	T	R	F	P	F		
32	112,42	18,88	P	W	G	L	T	R	F	R	F		
33	121,27	15,74	P	Y		L	T	R	F	H	F	N	
34	88,4	30,67	P	Y	G		T	L	F	R	F	N	
35	109,4	58,72		F	G	L	T	R	F	R	F	N	
36	90,24	18,57	P	W	G	L	T	L	F	R		N	
37	92,94	16		F	G	L	T	L	F	P			
39	104,51	19,07		F	G		T	L	F	H	F	N	
40	102,54	57,09	P	Y	G		T	R	F	R	F	N	
41	94,23	27,83		F	G	L	T		F	R	F	N	
42	112,91	16,34	P	Y	G		T	R	F	R	F	N	
43	168,76	15,56	P	Y	G	L		L		H	F	N	
44	254,08	28,87	P	W	G	L	T	R	F	R	F		
45	141,67	15,51	P	Y	G		T	R			F	N	
46	175,31	23,58	P	W	G	L	T	L	F	R			
47	172,6	35,64	P	Y	G	L		L	F	R	F	N	
48	109,25	15,12	P	Y	G	L		L		H	F		
49	95,01	15,33	P		G		T	R	F	H		N	
50	81,01	16,01		L	G	L	T	L	F	H			
51	109,05	15,06	P	F	G	L		R		H	F	N	
52	84,83	15,32	P	Y	G		T	L	F	L	F		
53	97,17	16,81		Y	G	L		R	F	H	F	N	N210N
54	127,34	15,05		F	G	L		R		H		N	
55	97,32	15,11	P	W	G	L		R	F	P	F		
57	149,08	19,49	P	Y	G	L	T	R		R	F		
58	106,56	17,47	P	F	G	L	T	L	F	H			
59	89,33	15,06	P	F		L	T	R	F	H		N	
60	89,94	17,85	P	W	G	L	T	L	F	R	F		
61	108,91	17,96	P		G	L	T	L		H	F	N	

Acierito de GeneReassembly candidato = "G2", o SEQ ID NO: 8 codificada por SEQ ID NO: 7:
SEQ ID NO:7:

ATGGCTAGCTCTATTAATGTGCTTGAAAATTGGTCTAGATGGATGAAACC
TATAAATGATGACATACCGTTAGCACGAATTTCAATTCCAGGAACACATG
ATAGTGGAACGTTCAAGTTGCAAAATCCGATAAAGCAAGTGTGGGGAATG
ACGCAAGAATATGATTTTCGTTATCAAATGGATCATGGAGCTAGAATTTT
TGATATAAGAGGGCGTTTAAACAGATGATAATACGATAGTTCTTCATCATG
GGCCATTATATCTTTATGTAACACTGCACGAATTTATAAACGAAGCGAAA
CAATTTTTTAAAGATAATCCAAGTGAAACGATTATTATGTCTTTAAAAAA
AGAGTATGAGGATATGAAAGGGGCGGAAAGCTCATTTAGTAGTACGTTTG
AGAAAAATTATTTTCGTGATCCAATCTTTTTAAAAACAGAAGGAAATATA
AAGCTTGAGATGCTCGTGGGAAAATTGTATTACTAAAAAGATATAGTGG
TAGTAATGAATCTGGGGGATATAATTTTTTCTATTGGCCAGACAATGAGA
CGTTTACCTCAACTATAAATGGTAATGTAAATGTAACAGTACAAGATAAA
TATAAAGTGAGTTTGGATGAGAAAATAAACGCTATTAAAGATACATTAAA
TGAAACGATTAACAATAGTGAAGATGTTAATCATCTATATATTAATTTTA
CAAGCTTGTCTTCTGGTGGTACAGCATGGACGAGTCCATATTATTATGCG
TCCAGGATAAATCCTGAAATTGCAAATTATATTAAGCAAAAAGAATCCTAC
GAGAGTGGGCTGGATAATACAAGATTTTATAAATGAAAAATGGCATCCAT
TACTTTATCAAGAAGTTATAAATGCGAATAAGTCACTTGTAATGA

SEQ ID NO:8:

MASSINVLENWSRWMKPINDDIPLARISIPGTHDSGTFKLQNPIKQVWGMT
QEYDFRYQMDHGARIFDIRGRLTDDNTIVLHHGPLYLYVTLHEFINEAKQFLKDN
PSETIIMSLKKEYEDMKGAESSFSSTFEKNYFRDPIFLKTEGNIKLGDARGKIVLLK
RYSGSNESGGYNFFYWPNETFTSTINGNVNVTQDKYKVSLEKINAIDTLNE
TINSEDEVNHLIYINFTSLSSGGTAWTSPYYYASRINPEIANIYIKQKNPTRVGWIIQD
FINEKWHPLLYQEVINANKSLVK

- 5 Datos de cribado de aceite: el cribado a pequeña escala en cuanto al contenido de fosfolípidos para los acieritos de GeneReassembly se resume en la tabla a continuación. Los aceites se trataron (o no se trataron, en el caso del control) con enzima como se describe en el protocolo titulado "Procedimiento de aceite a pequeña escala", a continuación. Después, las muestras se analizaron para determinar el contenido de fosfolípidos usando RMN usando el siguiente protocolo:

Procedimiento de aceite a pequeña escala

- 10 Objetivo: examinar la actividad de ePLC y PI-PLC en aceite de soja bruto en tiempos de medición durante la reacción enzimática.

Aceite:

Aceite de soja bruto

FFA: 0,24%

- 15 pH: 6,97

DAG: 0,27% de 1,2 + 0,24% de 1,3 = 0,51% DAG totales

PL: 0,21% de PA, 0,43% de PE, 0,25% de PI, 0,44% de PC (1,34% de PL totales); Sin LPA, 0,01% de LPE, sin LPI, 0,02% de LPC, sin 1-LPL; 0,01% de A, Sin E, I o C; 661 ppm de fósforo total de los cuales 628,6 ppm provienen de PL

CP: 742 ppm de P, 73,8 ppm de Ca, 69,8 ppm de Mg, 0,0 ppm de Fe

5 Enzimas:

Fosfolipasa evolucionada 8 (Ejemplo 2, Tabla 9) - 11,5 Unidades/mg

Se desean 5,5 unidades x 15 muestras = 82,5 unidades en total/11,5 Unidades/mg ~ 7 mg

Pesado 12,1 mg x 11,5 U/mg = 139,15 Unidades resuspendidas en 120 ul de Hepes 20 mM a pH 7,4, ZnSO₄ 1mM = 1,16 unidades/ul

10 Se desean 5,5 unidades en 10 ul

5,5 unidades/(1,16 unidades/ul) = 4,7 ul + 5,3 ul = 10 ul

Se prepara solución madre 94 ul de 1,16 Unidades/ul y 106 ul de Hepes 20 mM a pH 7,4, ZnSO₄ 1 mM.

Se añaden 10 ul a la reacción

SEQ ID NO: 8 - 4,2 Unidades/mg

15 Se desean 0,02 unidades x 15 muestras = 0,3 unidades en total/4,2 Unidades/mg ~ 1 mg

Se pesan 4,2 mg x 4,2 U/mg = 17,64 Unidades resuspendidas en 120 ul de Hepes 20 mM a pH 7,4, ZnSO₄ 1 mM = 0,147 unidades/ul

Se desean 0,02 unidades en 10 ul

0,02 unidades/(0,147 unidades/ul) = 0,14 ul + 9,86 ul = 10 ul

20 Se prepara solución madre de 3 ul de 0,147 Unidades/ul y 197 ul de Hepes 20 mM a pH 7,4, ZnSO₄ 1 mM.

Se añaden 10 ul a la reacción

Condiciones de reacción

Se pusieron partes alícuotas de 1 ml de aceite en tubos de 2 ml usando un dispositivo Distriman de Glison.

25 El aceite se precalentó a 60°C agitando a 1400 rpm en termomezclador durante ~ 30 minutos antes de la adición de la enzima.

Se añadió enzima a cada muestra, después se trató en un Polytron durante 30 segundos y se incubó a 60°C con agitación continua.

Se sacaron muestras en los tiempos de medición.

30 Inmediatamente después de sacar muestras en los tiempos de medición, las muestras se prepararon para el análisis de RMN. La adición de detergente de RMN a pH 10,5 que debería detener la reacción enzimática.

Preparación de reactivos, referencias y muestras para la determinación por RMN de ³¹P de fosfolípidos y productos:

35 Se usaron dos referencias internas de ³¹P de TMP (2,2,6,6-tetrametilpiperidina)/fosfato de tributilo (TBP) o TMP/trimetilpsoraleno (TIP) a pH 10,5. El TIP es más inmune a la superposición espectral, pero tiene un tiempo de relajación más largo (2,76 segundos) en comparación con 1,02 segundos para el TBP. El TBP coincide con los valores T₁ de PC, PE y PI, mientras que TIP coincide más con PA. Los factores de saturación se han calculado a partir de los datos obtenidos con el retardo de repetición cíclica normal de 1,74 segundos frente a una repetición cíclica de 21,6 segundos usando un ángulo de cabeza de 58 grados para una relación óptima de S/N por unidad de tiempo usando TIP. Este es probablemente el método preferido. El TBP aunque más eficaz debido al T₁ más corto, tiene un desplazamiento químico intermedio entre el PI y PC y es muy dependiente de la temperatura y sufre solapamiento.

40

Esto proporciona las siguientes ventajas:

(i) A pH 10,5 separa limpiamente LPI de PE (están superpuestos a pH 8,6, y 9,5),

(ii) Las referencias internas de TBP y TIP permiten retrasos de RMN de repetición de ciclo más rápidos con aproximadamente 2,8 de mejora en S/N por unidad de tiempo,

(iii) Proporciona una verificación interna tanto de las referencias TBMP/TIP 2 mM como TMP 2 mM,

(iv) Permite seleccionar diferentes condiciones de RMN según las necesidades (PL o productos, por ejemplo).

5 Preparación de reactivos

1. Ácido desoxicólico al 5% (DOC): se disuelven 5,0 g de sal de Na del ácido desoxicólico en 100 ml de agua de calidad HPLC.

2. EDTA 50 mM/TRIS 112,5 mM: se añaden 1,46 g de ácido EDTA y 1,3624 g de base TRIS a 100 ml de agua de calidad HPLC.

10 3. Detergente DOC/(EDTA/TRIS) 5:4, pH 10,5: se mezclan 50 ml de DOC Na y 40 ml de EDTA/TRIS. Se añade KOH en pelets hasta que el pH es de 10,5 (unos pocos pelets). Este detergente contiene TRIS 50 mM para el tamponado del pH.

4. En resumen, para hacer 900 ml de detergente: 25 g de DOC, 5,84 g de EDTA, 5,45 g de base Tris, 900 ml de H₂O, se ajusta el pH a 10,5 usando pelets de KOH.

15 5. Referencia interna TMP 50 mM y TBP 50 mM en isopropanol (IPA) de calidad HPLC: primero se prepara TMP 100 mM (PM 140,08) y TBP 100 mM (PM 266,32) en IPA respectivamente, y después se mezclan en la proporción de 1:1. Se prepara solución madre nueva cada semana de análisis y se almacena a 4°C para mantener la estabilidad.

Preparación de referencias y muestras

20 6. Solución de calibración de PL: se pesan con precisión (+/- 0,1 mg) aproximadamente 10 mg de lecitina Avanti (PA 5,9%, PE 10,4%, PI 8,3%, PC 14,0%, LPC 0,5%) en un vial de 2ml. Se añaden 40 µl de referencia interna TMP 50 mM/TBP 50 mM, 100 µl de D₂O, y 860 µl de detergente y se mezcla completamente mediante agitación con vórtice durante media hora, y se toman 500 µl de solución acuosa transparente en un tubo de RMN estándar de 5 mm después de centrifugado un momento*. La concentración de TMP y TBP es 2000 µM y 2000 µM, respectivamente; los pesos moleculares de PA, PE, PI, PC y PLC son aproximadamente 697, 716, 857, 758 y 496 respectivamente, por lo que para la lecitina Avanti 10,0 mg/ml, PA es 0,846 mM, PE es 1,453 mM, PI es 0,968 mM, PC es 1,847 mM, y LPC 0,101 mM.

30 7. Solución de muestra de aceite de soja bruto: se agita con vórtice el aceite y se pesan con precisión (+/- 0,2 mg) aproximadamente 100 mg de aceite en un vial de 2 ml. Se añaden 100 µl de D₂O y 900 µl de detergente y se mezcla completamente agitando con vórtice durante media hora. Después de centrifugar durante un tiempo, se toman 600 µl de solución acuosa transparente en un vial* y se añaden 24 µl de referencia interna TMP 50 mM/TBP 50 mM y se mezcla bien, después se toman 500 µl de solución acuosa transparente en un tubo estándar de RMN de 5 mm.

35 8. Solución de muestra de aceite desgomado: se agita con vórtice el aceite y se pesan con precisión (+/- 0,2 mg) aproximadamente 250 mg de aceite en un vial de 2 ml. Se añaden 100 µl de D₂O y 900 µl de detergente y se mezcla completamente agitando con vórtice durante media hora. Después de centrifugar un momento, se toman 600 µl de solución acuosa transparente en un vial* y se añaden 24 µl de referencia interna TMP 50 mM/TBP 50 mM y se mezcla bien, después se toman 500 µl de solución acuosa transparente en un tubo estándar de RMN de 5 mm.

40 9. Solución de muestra de goma: se pesan aproximadamente 10 mg de goma (+/- 0,1 mg) (no más de 11 mg) en un vial de 2 ml. Se añaden 40 µl de referencia interna TMP 50 mM/TBP 12,5 mM, 100 µl de D₂O, y 860 µl de detergente y se mezcla completamente por mezcla con vórtice durante media hora, y se toman 500 µl de solución acuosa transparente en un tubo estándar de RMN de 5 mm después de centrifugar durante un momento*.

*La solución de muestra se convierte en dos capas después del centrifugado. Se usa una jeringa con aguja para transferir la capa inferior de la solución acuosa transparente al tubo de RMN. Tenga cuidado de no alterar la capa superior.

45 10. Solución de muestra de aceite de canola bruto: se agita con vórtice el aceite y se pesan con precisión (+/- 0,2 mg) aproximadamente 250 mg de aceite en un vial de 2 ml. Se añaden 100 µl de D₂O y 900 µl de detergente y se mezcla completamente agitando con vórtice durante media hora. Después de centrifugar durante un momento, se toman 600 µl de solución acuosa transparente en un vial* y se añaden 24 µl de referencia interna TMP 50 mM/TBP 50 mM y se mezcla completamente, después se toman 500 µl de solución acuosa transparente en un tubo estándar de RMN de 5 mm.

50 11. Solución de muestra de residuos en agua: se hace una estimación del % en volumen del aceite en los residuos en agua. Se agita con vórtice los residuos en agua y se toman 0,5 ml en un vial de 2 ml y se pesa con precisión (aproximadamente 500 mg). Se añaden 100 µl de D₂O y aproximadamente 400 µl de detergente para hacer una

solución de 1 ml (excluyendo el aceite arrastrado en los residuos en agua) y se mezcla bien agitando con vórtice. Después de centrifugar durante un momento, se toman 600 µl de solución acuosa transparente en un vial* y se añaden 24 µl de referencia interna TMP 50 mM/TBP 50 mM y se mezcla completamente, después se toman 500 µl de solución acuosa transparente en un tubo estándar de RMN de 5 mm.

- 5 *La solución de muestra se convierte en dos capas después del centrifugado. Se usa una jeringa con aguja para transferir la capa inferior de la solución acuosa transparente al tubo de RMN. Tenga cuidado de no alterar la capa superior.

Recogida de datos para la determinación por RMN de ^{31}P de fosfolípidos y productos

- 10 Los conjuntos de parámetros de datos se han configurado para la operación automatizada ICONNMR™ (Bruker BioSpin Corporation, Fremont, CA) con un ángulo de la punta de 58 grados codificado para la alta potencia por defecto. Se inserta la muestra en la sonda con los comandos "ej"/"ij". Se comprueba edte = 300,0. En TopSpin se usa primero la operación "rpar" y se lee en el conjunto de parámetros P31_TBP_TMP_std. Se va a la ventana de adquisición con "acqu" y se ajusta la sonda QNP para 31P y 1H usando el comando "wobb". "ej" la muestra y después se procede con la automatización IconNMR usando la misma tabla de parámetros. En la automatización, las muestras se ponen en cola y se ejecutan por turnos con compensación de antemano. Los parámetros editables son NS y D1. Para el tiempo asignado NS = 512-2048, se proporciona una S/N adecuada. Los factores de escala para dar cuenta de los diferentes tiempos de relajación se han acumulado y deben comprobarse en un experimento con muestra de lecitina de Avanti sin ninguna muestra.
- 15

Tabla 16

Datos de cribado de aceite (pequeña escala, contenido de fosfolípidos) para aciertos de GeneReassembly:

Aceite	Tratamiento enzimático	Aceite: mezcla	Peso del aceite (mg)	PA (%)	PE (%)	PI (%)	PC (%)	PL total (%)	LPA (%)
Aceite de soja bruto	PI-PLC A1	200 mg	210,8	0,24	0,42	0,07	0,40	1,13	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC A1	200 mg	214,7	0,23	0,42	0,06	0,39	1,09	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC B1	200 mg	211,4	0,24	0,47	0,05	0,44	1,20	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC B1	200 mg	214,5	0,24	0,44	0,18	0,43	1,28	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC B2	200 mg	210,9	0,26	0,48	0,07	0,47	1,28	0,00
Aceite de soja bruto	PI-PLC B2	200 mg	211,4	0,26	0,48	0,06	0,47	1,26	0,00
Aceite bruto	PI-PLC G2	200 mg	211,6	0,25	0,47	0,05	0,45	1,22	0,00
Aceite bruto	PI-PLC G2	200 mg	210	0,24	0,45	0,05	0,43	1,18	0,00
Aceite bruto	PI-PLC A4	200 mg	209,9	0,24	0,43	0,15	0,41	1,23	0,01
Aceite de soja bruto	PI-PLC A4	200 mg	208,5	0,25	0,46	0,10	0,43	1,24	0,00
Aceite bruto	PI-PLC WT (SEQ ID NO: 6)	200 mg	212	0,22	0,41	0,20	0,41	1,24	0,00
Aceite bruto	PI-PLC WT (SEQ ID NO: 6)	200 mg	209,4	0,24	0,46	0,16	0,43	1,29	0,02
Aceite bruto	Sin enzima	200 mg	211,3	0,21	0,39	0,22	0,38	1,20	0,00
Aceite de soja bruto	Sin enzima	200 mg	209,9	0,26	0,44	0,26	0,41	1,37	0,00
Aceite de canola bruto	Sin enzima	200 mg	194,7	0,17	0,13	0,20	0,34	0,85	0,00
Aceite de canola bruto	Sin enzima	200 mg	194,9	0,17	0,14	0,21	0,34	0,85	0,00
Aceite de canola bruto	Sin enzima	200 mg	196,1	0,18	0,14	0,22	0,35	0,89	0,00

Tabla 17

Aceite	LPE (%)	LPI (%)	LPC (%)	1-LPA (%)	1-LPE (%)	1-LPI (%)	1-LPC (%)	A (%)	E (%)	I (%)	C (%)	P total (ppm)	P total de PL (ppm)
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	644	478
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	646	462
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	725	510
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	640	535
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	729	540
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	755	534
Aceite de soja bruto	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	729	516
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,03	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	733	498
Aceite de soja bruto	0,02	0,01	0,03	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	701	515
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	700	522
Aceite de soja bruto	0,01	0,01	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	657	518
Aceite de soja bruto	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	737	540
Aceite de soja bruto	0,01	0,02	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	608	499
Aceite de soja bruto	0,01	0,01	0,02	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,01	0,00	0,02	759	569
Aceite de canola bruto	0,02	0,02	0,04	0,00	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	480	348
Aceite de canola bruto	0,01	0,01	0,04	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	474	349
Aceite de canola bruto	0,01	0,01	0,04	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	484	365

Tabla 18 - Datos promediados

Aceite	Tratamiento enzimático	PA (%)	PE (%)	PI (%)	PC (%)	PL total (%)	LPA (%)	LPE (%)	LPI (%)	LPC (%)
Aceite de soja bruto	PI-PLC A1	0,24	0,42	0,06	0,39	1,11	0,00	0,01	0,00	0,02
Aceite de soja bruto	PI-PLC B1	0,24	0,45	0,12	0,43	1,24	0,00	0,01	0,00	0,02
Aceite de soja bruto	PI-PLC B2	0,26	0,48	0,06	0,47	1,27	0,00	0,01	0,00	0,02
Aceite de soja bruto	PI-PLC G2	0,24	0,46	0,05	0,44	1,20	0,00	0,01	0,00	0,03
Aceite de soja bruto	PI-PLC A4	0,24	0,45	0,13	0,42	1,24	0,01	0,01	0,00	0,02
Aceite de soja bruto	PI-PLC WT (SEQ ID NO: 6)	0,23	0,44	0,18	0,42	1,27	0,01	0,01	0,01	0,02
Aceite de soja bruto	Sin enzima	0,23	0,42	0,24	0,40	1,29	0,00	0,01	0,01	0,02
Aceite de canola bruto	Sin enzima	0,17	0,14	0,21	0,34	0,87	0,00	0,01	0,01	0,04

Tabla 19 - Datos promediados

Aceite	1-LPA (%)	1-LPE (%)	1-LPI (%)	1-LPC (%)	A (%)	E (%)	I (%)	C (%)	P total (ppm)	P total de PL (ppm)
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	645,40	470,17
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	682,44	522,47
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	741,94	536,72
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,03	0,00	730,76	506,92
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	700,48	518,82
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	697,17	528,75
Aceite de soja bruto	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,01	683,32	533,87
Aceite de canola bruto	0,00	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00	0,00	0,00	479,51	354,10

Desgomado a gran escala con con PI-PLC y ePLC o PI-PLC con PLC (SEQ ID NO: 2), con los resultados resumidos en las tablas 20, 21 y 22, a continuación. Los aceites se trataron (o no se trataron, en el caso del control) con enzimas usando este "Procedimiento de aceite a gran escala":

Procedimiento de aceite a gran escala

- 5 Objetivo: Comparar la actividad de PLC, PI-PLC, PLC "evolucionados" (o "ePLC") del ejemplo 2, anterior, en 2 kg de aceite de soja bruto.

Aceite:

Aceite de soja bruto

FFA: 0,24%

10 pH: 6,97

DAG: 0,27% de 1,2 + 0,24% de 1,3 = 0,51% DAG totales

PL: 0,21% de PA, 0,43% de PE, 0,25% de PI, 0,44% de PC (1,34% de PL totales); Sin LPA, 0,01% de LPE, sin LPI, 0,02% de LPC, sin 1-LPL; 0,01% de A, Sin E, I o C; 661 ppm de fósforo total de los cuales 628,6 ppm provienen de PL

15 CP: 742 ppm P, 73,8 ppm Ca, 69,8 ppm Mg, 0,0 ppm Fe

Enzimas: PLC (SEQ ID NO: 2)

Se desean 5,5 unidades = 200 ppm = 0,4 g/2000 g de aceite

Se precalient el aceite a 60°C con mezcla continua a 200 rpm.

Se lleva el aceite precalentado a la mezcladora de alta cizalladura.

20 Se empieza a mezclar a baja velocidad.

Se añaden 0,4 g de PLC (SEQ ID NO: 2) + 60 g de agua a temperatura ambiente al aceite precalentado mientras se mezcla.

Se ajusta el mezclador de alta cizalladura a 6 (velocidad más alta) durante 1 minuto.

Se lleva la muestra de vuelta al mezclador de paletas y agita continuamente a 200 rpm a 60°C durante 2 horas.

25 Se ajusta la temperatura a 80°C. Se recoge la muestra de aceite no centrifugado y se almacena a T.a. para su análisis.

Una vez que la temperatura del aceite alcanza 80°C, se centrifuga con la centrifuga de prueba Gyro.

Fosfolipasa evolucionada 8 (Ejemplo 2, Tabla 9) - 11,5 U/mg

Se desean 5,5 unidades/g de aceite, reacción de 2 kg o 2000 g = 11.000 unidades en total

30 Se desean 11.000 unidades/11,5 U/mg = 957 mg

Aceite bruto: Se pesan 958,6 mg x 11,5 U/mg = 11.024 unidades. Las muestras se vuelven a suspender en 60 g de agua inmediatamente antes de la adición al aceite bruto.

Fosfolipasa evolucionada 156 (Ejemplo 2, Tabla 9) - 17,2 U/mg

Se desean 5,5 unidades/g de aceite, reacción 2 kg o 2000 g = 11.000 unidades en total

35 Se desean 11.000 unidades/17,2 U/mg = 640 mg

Aceite bruto: se pesan 642,49 mg x 17,2 U/mg = 11,049 Unidades. Las muestras se vuelven a suspender en 60 g de agua inmediatamente antes de la adición al aceite bruto.

SEQ ID NO: 8 - 4,2 U/mg

Se desean 0,02 unidades/g de aceite, reacciona 2 kg o 2000 g = 40 unidades en total

40 Se desean 40 unidades/4,2 U/mg = 9,5 mg

Aceite bruto: Se pesan 9,6 mg x 4,2 U/mg = 40,32 unidades. Las muestras se vuelven a suspender en 60 g de agua inmediatamente antes de la adición al aceite bruto.

Fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8 - 2 h: Se pesan 959,2 mg de fosfolipasa evolucionada 8 PH045 x 11,5 U/mg = 11.031 Unidades. Se pesan 9,8 mg de SEQ ID NO: 8 x 4,2 U/mg = 41,16 Unidades

- 5 Fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8 - 4 horas: Se pesan 959,1 mg de fosfolipasa evolucionada 8 PH045 x 11,5 U/mg = 11.030 Unidades. Se pesan 9,8 mg de SEQ ID NO: 8 x 4,2 U/mg = 41,16 Unidades

Las muestras se vuelven a suspender en 60 g de agua inmediatamente antes de la adición al aceite bruto y la fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8 al mismo tiempo.

Condiciones de reacción

- 10 Se pesaron 2000 g de aceite en un vaso de precipitados de 4 litros. El aceite se precalentó a 60°C en placa calefactora con control de temperatura de retroalimentación (Barnstead/ThermoLyne mirak).

El aceite se precalentó a 60°C con agitación continua a ~ 200 rpm antes de la adición de la enzima.

- 15 Las muestras se llevaron a un mezclador de alta velocidad, enzima + 60 g de agua a temperatura ambiente al aceite precalentado mientras se mezclaba a baja velocidad y después se mezcló inmediatamente con alta cizalladura (velocidad máxima) durante 1 minuto.

Se lleva la muestra de vuelta al mezclador de paletas y se agita continuamente a 200 rpm a 60°C durante 2 horas. Se ajusta la temperatura a 80°C. Se recoge la muestra de aceite no centrifugado y se almacena a -20°C para su análisis.

Una vez que la temperatura del aceite alcanza 80°C, se centrifuga usando una centrífuga de alta velocidad.

Tabla 20		Descripción del ensayo de aceite					
		% medio 1,2-DAG	% medio 1,3-DAG	Suma 1,3 y 1,2 DAG	DAG neto	% Teórico de DAG máx. obtenido	Ácido graso libre (valoración)
Aceite de soja bruto							
Aceite precentrifugado tratado con SEQ ID NO: 2 *		0,36	0,32	0,68	0,00		0,47
Aceite centrifugado tratado con SEQ ID NO: 2 *		1,11	0,33	1,44	0,76	80	0,47
Aceite precentrifugado tratado con fosfolipasa evolucionada 8 *		0,98	0,33	1,32	0,64	68	0,24
Aceite centrifugado tratado con fosfolipasa evolucionada 8 *		1,56	0,33	1,88	1,20	128	0,48
Aceite precentrifugado tratado con fosfolipasa evolucionada 8 *		1,78	0,39	2,16	1,48	158	0,24
Aceite centrifugado tratado con fosfolipasa evolucionada 156 *		1,44	0,32	1,76	1,08	114	0,49
Aceite precentrifugado tratado con SEQ ID NO: 8 **		1,48	0,34	1,82	1,14	121	0,25
Aceite centrifugado tratado con SEQ ID NO: 8 **		0,66	0,32	0,98	0,30	157	0,48
Aceite precentrifugado tratado con SEQ ID NO: 8 **		0,55	0,34	0,90	0,22	112	0,21
Aceite centrifugado tratado 2 horas con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8 ***		1,71	0,33	2,04	1,36	119	0,71
Aceite precentrifugado tratado 2 horas con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8 ***		1,87	0,37	2,23	1,55	136	0,24
Aceite centrifugado tratado 4 horas con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8 ***		1,99	0,38	2,37	1,69	148	0,72
Aceite precentrifugado tratado 4 h con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8 ***		1,92	0,38	2,30	1,62	142	0,21

DAG neto = Suma 1,3 y 1,2 DAG generado - DAG endógeno

% teórico máximo de DAG obtenido = (DAG neto/DAG máximo teórico) * 100

aceite de soja bruto 06 17 08: PC = 0,47, PE = 0,46, PA = 0,22, PI = 0,27

* DAG teórico máx. a partir de valores por RMN de PL PC, PE y PA = (% PC*0,78) + (% PE*0,83) + (% PA*0,89) = 0,94

** DAG teórico máx. a partir de valores por RMN de PL PI = (% PI*0,72) = 0,194

*** DAG teórico máx. a partir de valores por RMN de PL PC, PE, PA y PI = (% PC*0,78) + (% PE*0,83) + (% PA*0,89) + (% PI*0,72) = 1,14

Tabla 21

Descripción de ensayos de aceite	PA (%)	PI (%)	PE (%)	PC (%)	PA (%) DE	PI (%) DE	PE (%) DE	PC (%) DE	% Eliminación de PA
Aceite de soja bruto	0,21	0,26	0,43	0,45	0,01	0,01	0,01	0,02	0
Aceite precentrifugado tratado con SEQ ID NO: 2	0,20	0,25	0,18	0,06	0,00	0,00	0,00	0,01	7
Aceite centrifugado tratado con SEQ ID NO: 2	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	77
Aceite precentrifugado tratado con fosfolipasa evolucionada 8	0,04	0,22	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	80
Aceite centrifugado tratado con fosfolipasa evolucionada 8	0,03	0,02	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	85
Aceite precentrifugado tratado con fosfolipasa evolucionada 156	0,05	0,08	0,01	0,00	0,01	0,01	0,01	0,00	75
Aceite centrifugado tratado con fosfolipasa evolucionada 156	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	83
Aceite precentrifugado tratado con SEQ ID NO: 8	0,20	0,00	0,42	0,41	0,01	0,00	0,01	0,00	0
Aceite centrifugado tratado con SEQ ID NO: 8	0,07	0,00	0,05	0,02	0,01	0,00	0,01	0,00	65
Aceite precentrifugado tratado 2 horas con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8	0,07	0,00	0,03	0,00	0,01	0,00	0,01	0,00	67
Aceite centrifugado tratado 2 horas con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8	0,04	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	82
Aceite precentrifugado tratado 4 horas con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8	0,05	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	74
Aceite centrifugado tratado 4 h con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	86

Tabla 22

Descripción de ensayos de aceite	PA (%)	PI (%)	PE (%)	PC (%)	PA (%) DE	PI (%) DE	PE (%) DE	PC (%) DE	A (%)	I (%)	E (%)	C (%)
Gomas tratadas con SEQ ID NO: 2	3,60	5,21	5,19	2,96	0,10	0,26	0,28	0,14	0,14	0,00	1,17	2,54
Gomas tratadas con fosfolipasa 8 evolucionada	0,49	6,28	0,04	0,00	0,06	0,40	0,07	0,00	1,22	0,00	3,25	4,41
Gomas tratadas con fosfolipasa evolucionada 156	1,32	6,67	0,56	0,00	0,06	0,24	0,06	0,00	0,84	0,00	2,85	4,02
Gomas tratadas con SEQ ID NO: 8	2,65	0,63	7,20	7,15	0,10	0,04	0,34	0,24	0,09	0,86	0,03	0,12
Gomas tratadas 2 h con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8	1,35	0,90	0,85	0,28	0,06	0,13	0,05	0,26	1,23	2,98	3,50	4,90
Gomas tratadas 4 h con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8	0,95	0,31	0,39	0,08	0,11	0,06	0,03	0,13	1,34	4,50	3,57	4,83

Tabla 23

Descripción de ensayos de aceite	LPA (%)	LPE (%)	LPI (%)	LPC (%)	1-LPA (%)	1-LPE (%)	1-LPI (%)	1-LPC (%)	X (uM) 12,9 ppm
Aceite de soja bruto	0,00	0,01	0,01	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0
Gomas tratadas con SEQ ID NO: 2	0,23	0,40	0,58	0,46	0,05	0,00	0,10	0,00	0
Gomas tratadas con fosfolipasa 8 evolucionada	0,33	0,00	0,29	0,28	0,55	0,00	0,00	0,00	60,9
Gomas tratadas con fosfolipasa evolucionada 156	0,00	0,03	0,36	0,55	0,46	0,00	0,00	0,00	0
Gomas tratadas con SEQ ID NO: 8	0,00	0,28	0,00	0,54	0,00	0,00	0,00	0,00	439,5
Gomas tratadas 2 h con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8	0,26	0,20	0,00	0,62	0,60	0,00	0,00	0,00	526,9
Gomas tratadas 4 h con fosfolipasa evolucionada 8 + SEQ ID NO: 8	0,16	0,07	0,00	0,34	0,63	0,00	0,00	0,00	265,5

Después, se analizó en las muestras el contenido de fosfolípidos (datos de PL) usando RMN, como se ha descrito anteriormente. También se analizó en las muestras el contenido de DAG (DAG FFA) usando los siguientes protocolos de HPLC:

- 5 Determinación de diacilglicerol en aceite vegetal por cromatografía líquida de alto rendimiento con detector evaporativo de dispersión de luz

Este método se basa en el método AOCS Cd 11d-96, como se describe en Determinación de mono y diglicéridos por HPLC-ELSD (Método oficial AOCS Cd 11d-96), con algunas modificaciones. Un cambio significativo es la adopción del aceite ENOVA™ como la referencia para propósitos de cuantificación. El método AOCS usa dipalmitina (C16:0) como referencia. Sin embargo, en el aceite vegetal, C16:0 solo representa ~ 10%, mientras que C18:0, C18:1 y C18:2 representan casi el 90%. En el cromatograma de HPLC, no solo la forma del pico de la dipalmitina es diferente de la de los diacilglicéridos reales (DAG) en el aceite vegetal, sino que la respuesta del detector a la dipalmitina también es diferente del DAG C18. Ambos factores afectan al resultado de cuantificación porque el detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) es un detector no lineal. El aceite ENOVA™ es un aceite con alto contenido de DAG producido mediante un procedimiento patentado por ADM que usa aceite de soja y aceite de canola como materia prima, que tiene una distribución de ácidos grasos similar al aceite vegetal común y por lo tanto una mejor referencia para la cuantificación del DAG en aceite vegetal. La cantidad de DAG en el aceite ENOVA™ se puede determinar usando el Método Oficial AOCS Cd 11b-91 (2) y método de RMN de ³¹P (3, 4).

Preparación de muestras y soluciones de referencia:

- 20 1. Solución de muestra: se pesan con precisión aproximadamente 50 µl de muestras de aceite y se añaden 950 µl de hexano/isopropanol = 9:1 para hacer una solución de 1 ml.

2. Soluciones de referencia: el intervalo de 1,2-DAG y 1,3-DAG en soluciones de referencia deberá cubrir la concentración real de DAG en la solución de muestra. Un ejemplo es 5 soluciones de aceite ENOVA™ con una concentración de 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml y 4 mg/ml, respectivamente.

Configuración de HPLC:

- 25 Columna: Chromegasfera SI-60, 15 cm × 4,6 mm

Temperatura: 40°C

Caudal: 2 ml/min

Volumen de inyección: 20 µl

Fase móvil A: Hexano

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

Elución con gradiente:

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

Configuración ELSD:

- 35 Los parámetros de ELSD de Sedex 75 se optimizarán para maximizar la sensibilidad. Estos incluyen la temperatura, ganancia, presión del gas nebulizador y posición de la celda de vidrio. Un ejemplo típico es temperatura de 40°C, ganancia de 5, y el gas nitrógeno a 3,5 bares.

Identificación de picos y cuantificación

- 40 El pico de DAG se identifica por comparación con el tiempo de retención de la referencia. La cuantificación se basa en la relación entre la respuesta del detector I (área del pico) y la concentración del analito C: $I = K \cdot C^M$, aquí K y M son constantes relacionadas con condiciones experimentales.

Referencias:

1. Mono- and Diglycerides Determination by HPLC-ELSD (Método oficial AOCS Cd 11d-96).
2. Determination of Mono- and Diglycerides by Capillary Gas Chromatography (Método oficial AOCS Cd 11b-91).
- 45 3. Spyros, A.; Dais, P. Application of ³¹P NMR Spectroscopy in Food Analysis. 1. Quantitative Determination of the Mono- and Diglyceride Composition of Olive Oils, *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 802-805.

4. Vigli, G.; Philippids, A.; Spyros, A.; Dais, P. Classification of Edible Oils by Employing ^{31}P and ^1H NMR Spectroscopy in Combination with Multivariate Statistical Analysis. A Proposal for the Detection of Seed Oil Adulteration in Virgin Olive Oils, *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 5715-5722.

Se optimizaron los codones del acierto de GR candidato "G2":

- 5 La optimización de codones se intentó de dos maneras diferentes en el ORF subclonado (codón opt V1 de G2 y codón opt V2 de G2) y proporcionando el segundo método una variante mucho más altamente expresable. Para el codón opt V1 de G2, los codones originales cuyo uso en el ORF subclonado disminuyó por debajo de 15-25% para *P. fluorescens* se cambiaron a codones en *P. fluorescens* con un uso > 30%. Adicionalmente, se usaron dos codones de parada TGA en el extremo 3' del ORF.

- 10 Codón opt V1 de G2 (SEQ ID NO: 9):

```
ATGGCCAGCAGCATCAACGTCTCTCGAAACTGGTCGCGCTGGATGAAGCCG
ATCAACGACGACATCCCGCTGGCCCGCATCAGCATCCCGGGCACCCACGAC
AGCGGCACCTTCAAGCTGCAGAACCCGATCAAGCAGGTCTGGGGCATGACC
CAGGAATACGACTTCCGCTACCAGATGGACCACGGCGCCCGCATCTTCGAC
ATCCGCGGCCGCGCTGACCGACGACAACACCATCGTGCTGCACCACGGCCCG
CTGTACCTGTACGTGACCCTGCACGAATTCATCAACGAAGCCAAGCAGTTCC
TGAAGGACAACCCGAGCGAAACCATCATCATGAGCCTGAAGAAAGAATACG
AAGACATGAAGGGCGCCGAAAGCAGCTTCAGCAGCACCTTCGAAAAGAACT
ACTTCCGCGACCCGATCTTCTCTGAAGACCGAAGGCAACATCAAGCTGGGCG
ACGCCCCGCGGCAAGATCGTCCTCCTGAAGCGCTACAGCGGCAGCAACGAAA
GCGGCGGCTACAACTTCTTCTACTGGCCGGACAACGAAACCTTCACCAGCA
CCATCAACGGCAACGTGAACGTGACCGTGACAGGACAAGTACAAGGTGAGCC
TGGACGAAAAGATCAACGCCATCAAGGACACCCTGAACGAAACCATCAACA
ACAGCGAAGACGTGAACCACCTGTACATCAACTTCACCAGCCTGAGCAGCG
GCGGCACCGCCTGGACCAGCCCGTACTACTACGCCAGCCGCATCAACCCGG
AAATCGCCAACTACATCAAGCAGAAGAACCCGACCCGCGTGGGCTGGATCA
TCCAGGACTTCATCAACGAAAAGTGGCACCCGCTGCTGTACCAGGAAGTGA
TCAACGCGAACAAGAGCCTGGTCAAGTGATGA
```

- 15 Para el codón opt V2 de G2, los codones de *P. fluorescens* se eligieron de modo que su uso (%) coincidía más estrechamente con el uso (%) de cada codón como se encuentra en el ORF original. Este es un procedimiento que llamamos transferencia de uso de codones. Además, la estructura secundaria del ARNm prevista del transcrito se minimizó para evitar bucles del tallo y horquillas en el inicio de la traducción (una ventana de nucleótidos en el ARNm de -65 a +65, donde la traducción empieza en +1 con el nucleótido "A" de "ATG" que codifica la primera metionina de la proteína). En esta minimización, se usaron codones sinónimos con un uso similar (%) para reducir los emparejamientos de nucleótido- nucleótido no deseados. Como antes, se usaron dos codones de terminación
- 20 TGA en el extremo 3' del ORF.

Codón opt V2 de G2 (SEQ ID NO: 10):

ATGGCGAGCAGCATCAACGTCTTGGAGAACTGGTCCCGGTGGATGAAGCCCAT
 CAACGACGATATCCCACTGGCCCGTATCTCGATCCCGGGCACCCACGACAGCGGCAC
 CTTTAAACTCCAGAACCCAATCAAACAGGTCTGGGGCATGACCCAGGAGTACGACTTC
 CGCTACCAGATGGACCACGGCGCCCGGATCTTCGACATCCGGGGGCGCCTGACCGAC
 GACAACACCATCGTGCTGCACCACGGGGCGCTGTACCTGTACGTGACCTTGCATGAGT
 TCATCAATGAGGCGAAGCAGTTCCTGAAGGACAACCCGAGCGAAACCATCATCATGTC
 CCTGAAGAAAGAATACGAAGACATGAAGGGGGCGGAGAGTTCGTTCAGCAGCACCTT
 CGAAAAGAACTACTTCCGCGACCCGATTTTCTCTGAAGACCGAGGGCAACATCAAACCTG
 GGCGACGCCCCGCGCAAGATCGTGCTGTTGAAGCGGTACAGCGGCAGCAACGAGTC
 CGGGGGCTACAACCTTCTTTTACTGGCCGGATAACGAAACCTTCACTTCGACGATCAAC
 GGCAACGTGAACGTGACCGTGCAGGACAAGTACAAGGTCAGCCTCGACGAAAAGATC
 AATGCCATCAAGGACACCCTGAACGAGACCATCAATAACAGCGAGGACGTGAACCACT
 TGTACATCAACTTCACCACTCTCTCTCCGGCGGCACCGCTGGACCAGCCCGTACTA
 CTACGCGAGTCGTATCAACCCCGAGATCGCCAACTACATCAAACAGAAAAACCCACC
 CGGGTCGGTTGGATCATCCAGGACTTCATCAACGAGAAGTGGCACCCGCTGCTGTAC
 CAGGAGGTGATCAACGCGAACAATCGCTGGTGAAGTGATGA

Los datos que comparan fermentaciones de 30 litros de G2 (SEQ ID NO: 8) y sus versiones de codones optimizado (SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10) se resumen en la tabla 24. Las fermentaciones se realizaron en el sistema de *P. fluorescencia* descrito anteriormente. Los datos que comparan la termotolerancia entre el codón optimizado de SEQ ID NO: 10 frente a SEQ ID NO: 8 se resumen en la tabla 25. La termotolerancia se midió como se describió anteriormente.

Tabla 24

Tiempo	SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10
24		1,90 + 06	
28		3,31E + 06	
29	8,98E + 05		
32		3,82E + 06	
33	1,62E + 06		
36		4,94E + 06	
37	2,47E + 06		
40		4,81 + 06	
41	3,82E + 06		
44		5,46E + 06	
45	5,28E + 06		
46			4,38E + 06
48		5,26E + 06	
49	6,04E + 06		
50			9,02E + 06
52		5,64E + 06	
53	5,27E + 06		
54			1,14E + 07
56		1,19 + 07	
58			2,02E + 07
60		6,22E + 06	
62			1,93E + 07
66			1,88E + 07
70			1,53E + 07
75			1,22E + 07

Tabla 25

SEQ ID NO: 8

SEQ ID NO: 10

ES 2 674 900 T3

Temperatura ambiente °C	100,00%	100,00%
55°C	99,12%	134,05%
60°C	116,64%	108,53%
65°C	107,96%	108,16%
70°C	49,12%	56,78%

Los datos que comparan la actividad de G2 (SEQ ID NO: 8) y su versión de codón optimizado (SEQ ID NO: 10) se resumen en la tabla 26. Los ensayos se realizaron usando el procedimiento de aceite a pequeña escala como se ha descrito anteriormente.

Tabla 26

Datos promediados											
Muestra nº	Experimento	PA (%)	PE (%)	PI (%)	PC (%)	PL total (%)	LPA (%)	LPE (%)	LPI (%)	LPC (%)	1-LPA (%)
1	SEQ ID NO:8 - 0,4 U/g	0,18	0,48	0,02	0,47	1,14	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00
2	SEQ ID NO:8 - 0,2 U/g	0,16	0,43	0,00	0,43	1,01	0,00	0,01	0,00	0,02	0,00
3	SEQ ID NO:8 - 0,1 U/g	0,18	0,46	0,05	0,50	1,19	0,01	0,01	0,00	0,03	0,00
4	SEQ ID NO:8 - 0,05 U/g	0,16	0,43	0,05	0,44	1,08	0,01	0,02	0,00	0,03	0,00
5	SEQ ID NO:10 - 0,4 U/g	0,19	0,51	0,00	0,53	1,23	0,01	0,02	0,00	0,03	0,00
6	SEQ ID NO:10 - 0,2 U/g	0,15	0,41	0,00	0,44	1,00	0,01	0,02	0,00	0,03	0,00
7	SEQ ID NO:10 - 0,1 U/g	0,15	0,41	0,07	0,41	1,05	0,00	0,02	0,00	0,02	0,00
8	SEQ ID NO:10 - 0,05 U/g	0,16	0,45	0,07	0,45	1,13	0,00	0,02	0,00	0,03	0,00
9	Sin enzima (Control)	0,17	0,46	0,23	0,47	1,33	0,00	0,02	0,02	0,03	0,00

Datos promediados										
Muestra nº	Experimento	1-LPE (%)	1-LPLI (%)	1-LIPC (%)	A (%)	E (%)	I (%)	C (%)	P total (ppm)	P total de PL (ppm)
1	SEQ ID NO:8 - 0,4 U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,16	0,00	804,49	485,05
2	SEQ ID NO:8 - 0,2 U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,16	0,00	743,13	429,86
3	SEQ ID NO:8 - 0,1 U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,10	0,00	794,03	500,55
4	SEQ ID NO:8 - 0,05 U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,08	0,00	710,86	453,40
5	SEQ ID NO:10 - 0,4 U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,24	0,00	943,30	523,00
6	SEQ ID NO:10 - 0,2 U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,16	0,00	731,12	423,97
7	SEQ ID NO:10- 0,1 U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,04	0,00	632,84	440,85
8	SEQ ID NO:10 - 0,05 U/g	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,05	0,00	681,24	476,04
9	Sin emzima (Control)	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	711,84	551,23

Dosificación

La dosificación de la enzima se puede definir por el número de "unidades" de enzima a añadir por gramo de aceite a tratar, donde una unidad (U) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 umol de 4-metilumbeliferona del 4-metilumbeliferil-mio-inositol-1-fosfato, sal de N-metilmorfolina, 4,5 mM en un minuto a pH 7,5 y 30°C. En un caso, la dosificación de PLC (p. ej., usando la SEQ ID NO: 2) o ePLC está en el intervalo de 1 a 50 U/g de aceite, mientras que la dosificación de PI-PLC está en el intervalo de 0,05 a 20 U/g de aceite. En otro caso, se usan dosificaciones en el intervalo de 1 - 20 U/g de aceite de PLC o ePLC y 0,05 - 2 U/g de aceite de PI-PLC. En otro caso, se usan dosificaciones en el intervalo de 2 - 10 U/g de aceite de PLC o ePLC y 0,1 - 1 U/g de aceite de PI-PLC. En un caso alternativo, la dosificación de PLC (p. ej., usando SEQ ID NO: 2) o ePLC es de 5,5 U/g de aceite y para PI-PLC es de 0,2 U/g de aceite.

Alternativamente, la dosificación se puede determinar usando la actividad específica de la enzima para convertir el número de unidades de enzima requeridas por gramo de aceite al peso de la enzima (ug) requerido por gramo de aceite. Específicamente, el número de unidades requerido se divide entre la actividad específica (U/mg) de la enzima para llegar a los ug necesarios de enzima. Por ejemplo, una dosis de 0,2 U enzima/gramo de aceite dividida entre una actividad específica de 90,1 U/mg, da como resultado una dosis de 2,22 ug de enzima/g de aceite. Por lo tanto, en una realización, la dosis de PI-PLC está en el intervalo de 0,55 a 222 µg de enzima/g de aceite. En otra realización, se usan dosificaciones en el intervalo de 0,55 - 22,2 µg de enzima/g de aceite de PI-PLC. En otra realización, se usan dosificaciones en el intervalo de 1,11 - 11,1 µg de enzima/g de aceite de PI-PLC. En una realización alternativa, la dosificación de PI-PLC es 2,22 ug de enzima/g de aceite.

En realizaciones alternativas, la invención también proporciona combinaciones o mezclas de enzimas que comprenden una PI-PLC de la invención y al menos otra enzima, p. ej., una enzima fosfolipasa, p. ej., una descrita en la tabla 8, o tabla 9, o en el documento WO 2008/036863. Por ejemplo, en realizaciones alternativas, la invención también proporciona combinaciones o mezclas de enzimas que comprenden una PI-PLC de la invención y la SEQ ID NO: 2, que no tienen una secuencia señal, codificada, p. ej., por la SEQ ID NO: 1; o SEQ ID NO: 4, que tiene una secuencia señal (equivalente a la SEQ ID NO: 2 con una secuencia señal), codificada, p. ej., por la SEQ ID NO: 3; o incluyendo cualquiera de las enzimas ePLC descritas en el Ejemplo 2 (p. ej., véanse las tablas 8 y 9), y en el documento WO 2008/036863, que describen variantes de SEQ ID NO: 4 (codificadas, p. ej., por la SEQ ID NO: 3). En realizaciones alternativas, la invención también proporciona combinaciones o mezclas de enzimas que comprenden una PI-PLC de la invención, p. ej., variantes de SEQ ID NO: 6 (codificadas por ejemplo por SEQ ID NO: 5) como se describe en la presente memoria, o variantes de SEQ ID NO: 8 (codificadas, p. ej., por SEQ ID NO: 7, y SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10 de codones optimizados).

Los ejemplos 4-9 son ejemplos de control. Los ejemplos 10-16 describen métodos de ejemplo proporcionados en la presente memoria.

En cada uno de los ejemplos a continuación, el mezclador de hélice era RW 20 digital de IKA con una paleta de pala plana; operado a 200 rpm para la agitación normal y 350 rpm para una agitación vigorosa. La centrífuga era un Gyro - Tester De Laval instalada con "The Bowl Unit" para la separación continua. La cubeta de la centrífuga se cerró con los tapones roscados instalados. La mezcla de cizalladura se realizó con el homogeneizador Ultra-Turrax T-50 básico de IKA con un elemento de dispersión S 50 N - G 45 G a 10.000 rpm. La enzima PLA1 era Lecitase® Ultra (número de lote LYN05015A que contiene 11,7 Unidades/mg) vendida por Novozymes A/S de Dinamarca. La enzima PLC era Purifine® PLC (número de lote 90BU006A1 o 190DU001A1 que contenía 26,0 o 28,6 Unidades/mg respectivamente) y la PI-PLC (SEC ID NO: 8) que contenía 4 Unidades/mg era proporcionada por Verenium Corporation de San Diego, California. La reacción tenía lugar en un vaso de precipitados de 4 litros y se cubrió con una envoltura de plástico para reducir o eliminar cualquier pérdida de agua. La cantidad de fosfolípidos que quedaban en el aceite tratado se midió como ppm de P de acuerdo con el método del método oficial de la Sociedad Americana de Químicos del Aceite Ca 20-99, "Análisis de fósforo en aceite por espectroscopía de emisión óptica con plasma de acoplamiento inductivo". El ácido graso libre (FFA) se midió usando el método oficial de la Sociedad Americana de Químicos del Aceite Ca 5a-40. La humedad se midió usando el método oficial de la Sociedad Americana de Químicos del Aceite Ca 2c-25. El aceite neutro se midió usando el método establecido en el apéndice a continuación. La materia insoluble en la acetona, que incluye los fosfolípidos, se midió usando el método oficial de la Sociedad Americana de Químicos del Aceite Ja 4-46. El valor de ácido se midió usando el método oficial de la Sociedad Americana de Químicos del Aceite Ja 6-55. Los procedimientos de RMN de P-31 y las mediciones de diacilglicerol (DAG) por cromatografía líquida de alto rendimiento con detector evaporativo de dispersión de luz (HPLC-ELSD) se realizaron por los procedimientos descritos por Verenium Corporation (entonces conocida como Diversa Corporation) "Analytical Profiling of Small Scale Reactions of phospholipase-C mediated Vegetable Oil Degumming" en la reunión de la Sociedad Americana de Químicos del Aceite 2007.

Ejemplo 4: Control - Desgomado con agua a pH neutro

Se calentaron 2001,2 gramos de aceite de soja bruto que contenía 696,3 ppm de fósforo a 70 - 74°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Se añadieron al aceite caliente, 60,0 gramos de agua desionizada. La mezcla de aceite/agua se agitó a 450 rpm durante 1 minuto. El agitador se ralentizó a 100 rpm durante 30 minutos para flocular e hidratar las gomas. Después el aceite tratado con agua se centrifugó; y se recogieron el aceite

separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite desgomado era 80,0 ppm, FFA era 0,22% y el DAG era 0,34%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 108,5 gramos.

Ejemplo 5: Control - Desgomado con PLC a pH neutro

5 Se calentaron 2003,8 gramos de aceite de soja bruto que contenía 696,3 ppm de fósforo a 60°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron 0,50 gramos de lipasa PLC Purifine® de Verenium (número de lote 90BU006A1) seguido de 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló con cizalladura durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60°C. Después el aceite tratado con enzima se centrifugó; y se recogieron el
10 aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLC a pH neutro produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 47,0 ppm. El FFA era 0,20% y el DAG era 0,61%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 85,5 gramos.

Ejemplo 6: Control - Desgomado con PI-PLC (SEQ ID NO: 8) a pH neutro

15 Se calentaron 2001,8 gramos de aceite de soja bruto que contenía 696,3 ppm de fósforo a 60°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron 0,0110 gramos de una PI-PLC (SEQ ID NO: 8) proporcionada por Verenium a un vaso de precipitados de 10 ml y se disolvió en 1 ml de agua desionizada. Una vez que la proteína se había disuelto en el agua, la solución de enzima se añadió al aceite. El vaso de precipitados se aclaró tres veces con aproximadamente 1 ml de agua para asegurar que se añadía toda la enzima. Se añadió el resto del agua hasta una cantidad total de agua añadida de 60 gramos. La mezcla de agua y
20 enzima de aceite se mezcló con cizalladura durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60°C. Después el aceite tratado con enzima se centrifugó; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en la reacción tratada con PI-PLC a pH neutro que produjo un aceite desgomado, era de 50,3 ppm. Se encontró que el FFA era 0,18% y el DAG era 0,49%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 102,5 gramos.

Ejemplo 7: Control - Desgomado con PLC más PI-PLC (SEQ ID NO: 8) a pH neutro

25 Se calentaron 2000,2 gramos de aceite de soja bruto que contenía 696,3 ppm de fósforo a 60°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron 0,50 gramos de la lipasa PLC Purifine® de Verenium (número de lote 90BU006A1) al aceite seguido de 0,0104 gramos de una PI-PLC (SEC ID NO: 8) proporcionada por Verenium, a un vaso de precipitados de 10 ml y se disolvieron en 1 ml de agua desionizada. Una vez que la proteína se había disuelto, la solución de enzima se añadió al aceite. El vaso de
30 precipitados se aclaró tres veces con aproximadamente 1 ml de agua para asegurar que se añadía toda la enzima al aceite. El resto del agua se añadió para un volumen total de agua añadida de 60 gramos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 45°C. Después el aceite tratado con enzima se centrifugó; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el producto de reacción tratado con PLA1 - PI-PLC a pH neutro produjo aceite desgomado con un fósforo residual de 50,0 ppm. El FFA era 0,24% y DAG era 0,85%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 84,2 gramos.

Ejemplo 8: Control - Desgomado con PLA₁ a pH neutro

40 Se calentaron 2000,6 gramos de aceite de soja bruto que contenía 694,1 ppm de fósforo a 45°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Con la temperatura mantenida a 45°C, se añadieron 0,10 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1 número de lote LYN05015) seguido de 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalladura durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 240 minutos a una temperatura de 45°C. Después el aceite tratado con enzima se centrifugó; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en la reacción tratada con PLA1 a pH neutro produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 27,2 ppm. El FFA era 0,60% y DAG era 0,33%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 90,0 gramos.

45 Ejemplo 9: Control - Desgomado con PLA₁ a pH 4,5

Se calentaron 2001,2 gramos de aceite de soja bruto que contenía 641,6 ppm de fósforo a 70°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Se añadieron 2,0 gramos de solución de ácido cítrico al 50% en p/p y se agitó con cizalladura durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador de hélice. El aceite se dejó enfriar con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite era 45°C,
50 después se añadieron al aceite 1,8 mililitros de solución de hidróxido de sodio 4 molar y se mezclaron. Se añadieron 0,10 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1 número de lote LYN05015) seguido de un total de 60 gramos de agua desionizada y la mezcla entera se mezcló con cizalladura durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 240 minutos a una temperatura de 45°C. Después el aceite tratado con enzima se centrifugó; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLA1 a un pH de 4,5 produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 0,5 ppm. El FFA era 0,54% y DAG era 0,33%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 91,4 gramos.

Los procedimientos de desgomado descritos en los ejemplos 4-10 no eliminaron y/o no reaccionaron todos los fosfolípidos presentes en el aceite bruto como es evidente por el fósforo residual, excepto para el experimento 6. El experimento 6 representa el desgomado en condiciones de reacción normales para la enzima Lecitase® Ultra. En la tabla 27, se dan los perfiles de fosfolípidos de las gomas húmedas recogidas.

5 Tabla 27. Resultados analíticos de los ejemplos de control neutral.

Experimento	Adición de enzima	pH	Agua (g)	Temp. (C)	Tiempo de reacción (minutos)	Fos. (ppm)	FFA (%)	DAG (%)	Gomas húmedas (g)
	Material de partida	Neutro	-	-	-	668,0	0,53	0,32	-
1	Ninguna	Neutro	60	70	30	80,0	0,22	0,34	108,5
2	PLV	Neutro	60	60	120	47,0	0,20	0,61	85,5
3	PI-PLC	Neutro	60	60	120	50,3	0,18	0,49	102,5
4	PLC + PI-PLC	Neutro	60	60	120	50,0	0,24	0,85	84,2
5	PLA1	Neutro	60	45	240	27,2	0,60	0,33	90,0
6	PLA1	4,5	60	45	240	0,5	0,54	0,33	91,4

10 Como se ve en la tabla 29, el desgomado con agua demuestra la capacidad de emulsificación de los fosfolípidos hidratables que permite la eliminación de todas las especies de fosfolípidos, incluso algunas de las especies no hidratables. Sin embargo, una gran parte de los NHP permanecían en el aceite, como es evidente por el fósforo residual, calcio, magnesio y hierro en el aceite desgomado (véase la tabla 29). El desgomado usando una fosfolipasa C, era capaz de reaccionar esencialmente con la fosfatidilcolina y una cantidad significativa de fosfatidiletanolamina. El fosfatidilinositol y el ácido fosfatídico no reaccionaban. La cantidad de gomas recogidas era significativamente menor que el ejemplo de desgomado con agua (85,5 gramos frente a 108,5 gramos), pero permanecía una gran cantidad de NHP en el aceite como es evidente por el fósforo residual de cerca de 50 ppm y el Ca, Mg y Fe restantes que quedan en el aceite. Como se ve en la tabla 29, el desgomado con una fosfolipasa específica de fosfatidilinositol produjo una goma húmeda con la mayor cantidad de PC y PE de todos los ejemplos de control. La composición de fosfolípidos de las gomas húmedas recuperadas en los ejemplos 4-10 también se proporciona en la figura 13.

15 Tabla 28. Composición de fosfolípidos de las gomas recuperadas.

Experimento	PC (%)	PE (%)	PI (%)	PA (%)	liso-PC (%)	liso-PE (%)	liso-PI (%)	liso-PA (%)	C (%)	E (%)	I (%)	A (%)
1	9,62	7,35	4,02	2,04	0,58	0,35	0,33	ILD	ILD	ILD	ILD	0,07
2	0,19	2,05	5,29	2,88	0,44	0,09	0,39	0,28	3,92	2,42	ILD	0,19
3	11,0 1	7,78	0,00	2,33	0,59	0,36	ILD	ILD	0,05	0,02	4,29	0,12
4	2,39	3,09	1,68	2,77	0,44	0,17	ILD	0,35	3,25	1,97	1,26	0,18
5	0,24	0,41	0,67	0,26	8,05	7,33	4,32	3,52	ILD	ILD	ILD	0,19
6	0,62	0,74	0,90	0,13	7,98	7,40	4,30	4,28	ILD	ILD	ILD	0,25

20 ILD= inferior al límite de detección

Todo el PI reaccionó con la fosfolipasa C produciendo fosfoinositol. Como en los ejemplos 4 y 5, permanecían grandes cantidades de NHP en el aceite, como es evidente por el análisis de metales en trazas presentado en la tabla 29.

Tabla 29. Resultados de elementos de los ejemplos de control neutro.

Experimento	Adición de enzima	pH	Fósforo (ppm)	Calcio (ppm)	Magnesio (ppm)	Hierro (ppm)
Promedio de bruto	Material de partida	Neutro	668,0	61,67	69,92	0,95
1	Ninguna	Neutro	80,0	34,97	18,79	0,44
2	PLC	Neutro	47,0	21,25	10,14	0,19
3	PI-PLC	Neutro	50,3	25,33	12,33	0,20
4	PLC + PI-PLC	Neutro	50,0	22,49	9,62	0,20
5	PLA1	Neutro	27,2	15,14	7,73	0,13
6	PLA1	4,5	0,5	0,19	0,12	ILD

25 La humedad y el aceite neutro presentes en el aceite de gomas recuperadas se da en la tabla 29a.

Tabla 29a: Humedad y aceite neutro presentes en las gomas recuperadas

Experimento	Humedad (%)	Aceite "como está" (%)	Aceite "seco" (%)	Aceite perdido (g)
1	43,31	20,40	36,05	22,13
2	49,62	17,04	33,82	14,57
3	40,70	23,97	40,42	24,57
4	46,80	20,44	38,42	17,21
5	44,33	11,63	20,89	10,47
6	45,00	14,52	26,40	13,27

En el Ejemplo 7, el desgomado tanto con PLC como con PI-PLC demostró una hidrólisis enzimática significativa de PC, PE y PI (tabla 27 y figura 13), pero no tan bueno como la enzima individual añadida sola en el ejemplo 5 o 6. Además, el fósforo residual en el aceite permanecía en aproximadamente 50 ppm debido a la incapacidad del procedimiento para hidrolizar las sales de ácido fosfatídico y fosfatidiletanolamina. En el ejemplo 8, el desgomado con PLA1 hidrolizó casi todos los fosfolípidos presentes en las gomas húmedas en sus liso-formas como se ve en la figura 13 y como es evidente por la cantidad significativa de lisofosfolípidos presentes (tabla 28). Sin embargo, incluso después de 4 horas, permanecían cantidades significativas de PA en el aceite porque los NHP no eran accesibles para la enzima.

En el experimento de control 6, el aceite tratado con PLA1 a pH 4,5 demuestra la capacidad de la fosfolipasa A1 para reaccionar con todas las especies de fosfolípidos produciendo un aceite desgomado con menos de 1 ppm de fósforo residual y esencialmente todas las gomas se han convertido en lisoespecies solubles en agua como es evidente en la figura 13 y las tablas 30 y 31. Los cationes de calcio, magnesio y hierro ya no están unidos a los NHP, sino ahora están en la fase acuosa. Los cationes de calcio, magnesio y hierro se disocian de las sales de ácido fosfatídico y fosfatidiletanolamina. Como consecuencia, los elementos divalentes ahora pueden reaccionar con el ácido cítrico presente en la fase acuosa formando un citrato de calcio, magnesio o hierro que son insolubles en la fase acuosa al pH de reacción de la fase acuosa. Estas sales insolubles precipitan de la solución formando un recubrimiento de "agua dura" en todas las tuberías, intercambiadores de calor e incluso la centrifuga hasta que la fase pesada que comprende la mezcla de gomas, agua y sales que han reaccionado se elimina mediante el procedimiento de centrifugación. Dayton et al. en el documento de EE.UU. 2007/0134777 describen un procedimiento de desgomado enzimático mejorado en el que el pH de la reacción enzimática débilmente tamponada se reduce de 4,5 a, p. ej., un intervalo de 3,5 a 4,2 después de completarse la reacción enzimática, disociando las sales de citrato, eliminando así las incrustaciones de los equipos, en particular los intercambiadores de calor y la centrifuga de separación, que habrían resultado de la precipitación de sales de calcio y magnesio al pH óptimo requerido para la actividad de la enzima.

Como se demuestra en los siguientes ejemplos, los procedimientos proporcionados en la presente memoria comprenden tratar un aceite con un ácido para reducir el pH a menos de tres, permitiendo que las sales de ácido fosfatídico y fosfatidiletanolamina (los NHP) se disocien, después ajustar el pH de la fase acuosa de nuevo a un pH neutro de 7, antes de hidratar los fosfolípidos en el desgomado con agua o hacer reaccionar los fosfolípidos con una fosfolipasa permitiendo a los NHP migrar a la interfase de agua y aceite, lo que permite una mejor hidratación y una mejor disponibilidad de sustrato (NHP) para las fosfolipasas. La tabla 30 a continuación proporciona un resumen de ejemplos de los procedimientos realizados como se describe a continuación.

Tabla 30. Resultados analíticos de los ejemplos a pH ajustado.

Experimento	Adición de enzima	PH ajustado	Agua (g)	Temp. (C)	Tiempo de reacción (minutos)	Fos. (ppm)	FFA (%)	DAG (%)	Gomas húmedas (g)
7	Ninguna	7,0	60	70	30	26,9	0,24	0,39	112,0
8	PLC	7,0	60	60	120	14,4	0,21	1,11	80,0
9	PI-PLC	7,0	60	60	120	13,5	0,22	0,61	100,8
10	PLC + PI-PLC	7,0	60	60	120	18,7	0,21	1,04	84,4
11	PLA1	5,5	60	45	240	1,6	0,54	0,33	91,7
12	PLA1	6,5	60	45	240	3,4	0,51	0,33	88,7
13	PLA1	7,0	60	45	240	3,4	0,52	0,39	93,1

Ejemplo de referencia 10: Desgomado de agua a un pH ajustado de 7,0

Se calentaron 2002,2 gramos de aceite de soja bruto que contenía 640,1 ppm de fósforo a 70°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Se añadieron 2,0 gramos de solución de ácido cítrico al 50% en p/p y se agitaron con cizalladura durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador de hélice. Se añadieron 3,65 mililitros de solución de hidróxido de sodio 4 molar al aceite y se mezclaron. Se añadieron al aceite caliente 56,0 gramos de agua desionizada (un total de 60 gramos de agua, incluyendo el ácido

cítrico y el hidróxido de sodio). La mezcla de aceite/agua se agitó a 450 rpm durante 1 minuto. El agitador se ralentizó a 100 rpm durante 30 minutos para flocular e hidratar las gomas. Después el aceite tratado con agua se centrifugó; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite desgomado era 26,9 ppm, los FFA eran 0,24% y el DAG era 0,39%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 112,0 gramos.

- 5 El fósforo residual en el ejemplo 10 donde el pH se ajustó a 7 (26,9 ppm de P) en comparación con el pH original neutro (80,0 ppm de P) demostró que había más fosfolípidos disponibles para la hidratación o el atrapamiento mecánico. Además, las concentraciones tanto de ácido fosfatídico como de fosfatidiletanolamina (NHP) aumentaron en las gomas recuperadas como se ve en la tabla 31.

Tabla 31. Composición de fosfolípidos de las gomas recuperadas de los ejemplos 10-16.

Experimento	PC (%)	PE (%)	PI (%)	PA (%)	liso-PC (%)	liso-PE (%)	Liso-PI (%)	liso-PA (%)	C (%)	E (%)	I (%)	A (%)
7	7,62	7,78	4,19	2,81	0,59	0,48	0,34	0,26	ILD	ILD	ILD	0,18
8	0,30	0,88	6,15	3,84	0,67	0,22	0,51	0,67	3,91	2,79	0,06	0,31
9	8,29	8,31	ILD	3,11	0,71	0,56	ILD	0,48	0,42	0,20	4,63	0,23
10	1,12	1,74	0,74	3,34	0,36	0,09	ILD	0,59	3,87	2,62	1,85	0,30
11	0,40	0,51	0,42	0,18	7,78	7,06	4,40	3,83	ILD	ILD	ILD	0,24
12	0,30	0,50	0,50	0,09	8,47	7,72	4,66	4,10	ILD	ILD	ILD	0,24
13	0,14	0,43	0,07	bd	7,65	7,31	3,97	3,26	0,06	ILD	0,10	0,24

ILD= inferior al límite de detección

La humedad y el aceite neutro presentes en las gomas recuperadas de los ejemplos 10 - 16 se da en la tabla 31a.

Tabla 31a. Humedad y aceite neutro presentes en las gomas recuperadas.

Experimento	Humedad (%)	Aceite "como está" (%)	Aceite "seco" (%)	Aceite perdido (g)
7	45,53	17,44	32,02	19,53
8	51,58	13,23	27,32	10,53
9	43,19	18,29	32,20	18,44
10	50,33	17,64	35,51	14,89
11	44,71	12,43	22,48	11,40
12	44,44	11,07	19,92	9,82
13	43,25	10,37	18,27	9,65

Ejemplo 11: Desgomado con PLC a un pH ajustado de 7,0

- 5 Se calentaron 2002,0 gramos de aceite de soja bruto que contenía 640,1 ppm de fósforo a 70°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Se añadieron 2,0 gramos de solución de ácido cítrico al 50% en p/p y se agitaron con cizalladura durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador de hélice. El aceite se dejó enfriar a 60°C en donde se añadieron 3,65 mililitros de solución de hidróxido de sodio 4 molar al aceite y se mezclaron. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron 0,50 gramos de lipasa PLC Purifine® de Verenium (número de lote 190DU001A1) seguido del resto de los 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló con cizalladura durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60°C. Después el aceite tratado con enzima se centrifugó; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLC ajustado a pH ácido/base 7,0 produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 14,4 ppm. Los FFA eran 0,21% y DAG era 1,11%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 80,0 gramos.

Los resultados de este experimento demuestran tanto la eliminación de los fosfolípidos del aceite como la capacidad de la fosfolipasa para convertir los fosfolípidos en diacilglicerol o aceite. Los diacilglicerol aumentaron desde el aceite de partida (0,31%) o 0,34% en el experimento de desgomado con agua de control hasta 1 a 1,11% en el experimento de desgomado con enzimas a un pH ajustado de 7,0. El fósforo residual en el aceite se redujo de 47,0 ppm en el experimento de control a 14,4 ppm en el experimento de pH ajustado. Los otros metales en trazas también se redujeron significativamente como se demuestra en la Tabla 32.

Tabla 32. Resultados elementales de los ejemplos 10-16

Experimento	Adición de enzimas	PH ajustado	Fósforo (ppm)	Calcio (ppm)	Magnesio (ppm)	Hierro (ppm)
7	Ninguna	7,0	26,9	7,80	2,71	0,35
8	PLC	7,0	14,4	4,70	0,96	0,34
9	PI-PLC	7,0	13,5	5,30	1,99	ILD
10	PLC + PI-PLC	7,0	18,7	4,60	2,14	ILD
11	PLA1	5,5	1,6	0,82	0,34	0,01
12	PLA1	6,5	3,4	2,56	0,95	ILD
13	PLA1	7,0	3,4	2,75	1,03	ILD

- Es importante reconocer que las gomas recogidas se redujeron al nivel más bajo en todos los experimentos de la aplicación (80,0 gramos). La composición de fosfolípidos muestra que casi la totalidad de la PC y PE se convirtieron en *fosfo*-colina y *fosfo*-etanolamina (Tabla 31) que forman los diacilglicerol que se encuentran en el aceite recuperado. La cantidad de ácido fosfatídico también aumentó en las gomas recogidas, lo que demuestra adicionalmente la mayor disponibilidad del sustrato para ser hidratado/"atrapado" mecánicamente o estar disponible para reaccionar enzimáticamente.

Ejemplo 12: Desgomado con PI-PLC a un pH ajustado de 7,0

- Se calentaron 2000,0 gramos de aceite de soja bruto que contenía 694,1 ppm de fósforo a 70°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Se añadieron 2,0 gramos de solución de ácido cítrico al 50% en p/p y se agitaron con cizalladura durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador de hélice. El aceite se dejó enfriar a 60°C y se le añadieron 3,65 mililitros de solución de hidróxido de sodio 4 molar al aceite y se mezclaron. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron 0,0108 gramos de una PI-PLC (SEQ ID NO: 8) proporcionada por Verenium a un vaso de precipitados de 10 ml y se disolvió en 1 ml de agua desionizada. Una vez que la proteína se había disuelto en el agua, la solución de enzima se añadió al aceite. El vaso de precipitados se aclaró tres veces con aproximadamente 1 ml de agua para asegurar que había añadido toda la enzima. Se añadió el resto del agua hasta una cantidad total de agua añadida de 60 gramos. La mezcla completa se mezcló con cizalladura durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60°C. Después el aceite tratado con enzima se centrifugó; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PI-PLC a pH ácido/base ajustado 7,0 produjo un

aceite desgomado con un fósforo residual de 13,5 ppm. Los FFA eran 0,22% y DAG era 0,61%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 100,8 gramos.

Como en los dos ejemplos anteriores, la cantidad de PA presente en las gomas recogidas aumentó en los experimentos de pH ajustado frente a los experimentos de control. Además, la mayor cantidad de PC y PE estaba presente en las gomas recogidas, por lo tanto, en los 100,8 gramos de gomas húmedas. Puesto que la fosfolipasa específica de fosfatidilinositol predominantemente sólo reacciona con PI, el aumento de DAG era menos que la reacción de la fosfolipasa en el experimento 8 y la *fosfo*-inositol era el *fosfo*-compuesto predominante presente en las gomas recogidas (tabla 31).

Ejemplo 13: Desgomado con PLC más PI-PLC a un pH ajustado de 7,0

Se calentaron 2003,8 gramos de aceite de soja bruto que contenía 641,6 ppm de fósforo a 70°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Se añadieron 2,0 gramos de solución de ácido cítrico al 50% en p/p y se agitaron con cizalladura durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador de hélice. El aceite se dejó enfriar a 60°C y se le añadieron 3,65 mililitros de solución de hidróxido de sodio 4 molar al aceite y se mezclaron. Con la temperatura mantenida a 60°C, se añadieron 0,50 gramos de la lipasa PLC Purifine® de Verenium (número de lote 190DU001A1) al aceite seguido de 0,0094 gramos de una PI-PLC (SEC ID NO: 8) proporcionado por Verenium en un vaso de precipitados de 10 ml y se disolvieron en 1 ml de agua desionizada. Una vez que la proteína se había disuelto, la solución de enzima se añadió al aceite. El vaso de precipitados se aclaró tres veces con aproximadamente 1 ml de agua para asegurar que se añadía toda la enzima al aceite. Se añadió el resto del agua hasta un volumen total de agua añadida de 60 gramos. La mezcla completa se mezcló luego con cizalladura durante 1 minuto. La mezcla de aceite después se agitó a velocidad normal durante 120 minutos a una temperatura de 60°C. Después el aceite tratado con enzima se centrifugó; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLC - PI-PLC a un pH ajustado de 7,0 produjo aceite desgomado con un fósforo residual de 18,7 ppm. Los FFA eran 0,21% y DAG era 1,04%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 84,4 gramos.

Las cantidades limitadas de PC, PE y PI recogidas en las gomas (tabla 31); la gran cantidad de *fosfo*-colina, *fosfo*-etanolamina y *fosfo*-inositol en las gomas (tabla 31); y el alto nivel de diacilglicerol presente en el aceite recuperado demuestran claramente la reacción enzimática tanto de la PLC como de la PI-PLC en el aceite bruto. El PA recuperado en las gomas también era mayor que la combinación de control de las enzimas encontradas en el Ejemplo 7.

Ejemplo de referencia 14: Desgomado de PLA 1 a un pH ajustado de 5,5

Se calentaron 2001,2 gramos de aceite de soja bruto que contenía 641,6 ppm de fósforo a 70°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Se añadieron 2,0 gramos de solución de ácido cítrico al 50% en p/p y se agitaron con cizalladura durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador de hélice. El aceite se dejó enfriar con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite era 45°C, después se añadieron al aceite 2,55 mililitros de solución de hidróxido de sodio 4 molar y se mezclaron. Se añadieron 0,10 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1 número de lote LYN05015) seguido de un total de 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalladura durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 240 minutos a una temperatura de 45°C. Después el aceite tratado con enzima se centrifugó; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLA1 a un pH de 5,5 produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 1,6 ppm. Los FFA eran 0,54% y DAG era 0,33%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 91,7 gramos.

Ejemplo de referencia 15: Desgomado con PLA₁ a un pH ajustado de 6,5

Se calentaron 2001,6 gramos de aceite de soja bruto que contenía 641,6 ppm de fósforo a 70°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Se añadieron 2,0 gramos de solución de ácido cítrico al 50% p/p y se agitaron con cizalladura durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador de hélice. El aceite se dejó enfriar con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite era 45°C, después se añadieron 3,31 mililitros de solución de hidróxido de sodio 4 molar al aceite y se mezclaron. Se añadieron 0,10 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1 número de lote LYN05015) seguido de un total de 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló por cizalladura durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 240 minutos a una temperatura de 45°C. Después el aceite tratado con enzima se centrifugó; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLA1 a un pH de 6,5 produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 3,4 ppm. Los FFA eran 0,51% y DAG era 0,33%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 88,7 gramos.

Ejemplo de referencia 16: Desgomado con PLA₁ a un pH ajustado de 7,0

Se calentaron 2001,6 gramos de aceite de soja bruto que contenía 641,6 ppm de fósforo a 70°C con agitación normal usando un mezclador de hélice. Se añadieron 2,0 gramos de solución de ácido cítrico al 50% p/p y se agitaron con cizalladura durante 1 minuto. El aceite se sometió a agitación normal durante 1 hora con un mezclador

de hélice. El aceite se dejó enfriar con agitación a velocidad normal hasta que la temperatura del aceite era 45°C, después se añadieron 3,31 mililitros de solución de hidróxido de sodio 4 molar al aceite y se mezclaron. Se añadieron 0,10 gramos de Lecitase® Ultra de Novozymes (lipasa PLA1 número de lote LYN05015) seguido de un total de 60 gramos de agua desionizada y la mezcla completa se mezcló con cizalladura durante 60 segundos. La mezcla de aceite se agitó a velocidad normal durante 240 minutos a una temperatura de 45°C. Después el aceite tratado con enzima se centrifugó; y se recogieron el aceite separado y las gomas húmedas. El fósforo residual en el aceite tratado con PLA1 a un pH de 7,0 produjo un aceite desgomado con un fósforo residual de 3,4 ppm. Los FFA eran 0,52% y DAG era 0,39%. Las gomas húmedas recogidas pesaban 93,1 gramos.

Los ejemplos 14, 15 y 16 demuestran el efecto de aumentar el pH desde las condiciones óptimas para la enzima de 4,5 a un pH ajustado de 5,5, 6,5 y 7,0 respectivamente para la enzima fosfolipasa A. La capacidad de realizar la reacción a un pH neutro de 7,0, en lugar de 4,5, aumentaría la viabilidad económica del procedimiento industrial debido a los materiales de construcción y el coste de reducir el pH a 3,5 a 4,2 con el fin de evitar la contaminación del equipo industrial. En resumen, el experimento 13 muestra claramente que se puede obtener un fósforo residual bajo en el aceite, al mismo tiempo que pueden reaccionar todos los fosfolípidos presentes en las gomas a sus liso-formas, maximizando así el rendimiento de aceite para este tipo de reacción enzimática.

La figura 14 compara lado a lado las composiciones de fosfolípidos de las reacciones a pH neutro de control frente a las reacciones ajustadas de pH a un pH de 7,0. Se puede ver claramente que en todas las reacciones donde un tratamiento ácido es seguido de un tratamiento cáustico diluido para llevar la fase acuosa a un pH neutro, aumenta el nivel de NHP en las gomas recogidas y/o permite que estos NHP se conviertan ya sea en liso-formas o fosfo-formas, por lo tanto, aumenta el rendimiento total y se minimiza cualquier producto residual generado del procedimiento.

La figura 15 compara lado a lado el aceite neutro perdido con la fase de goma en las reacciones de pH neutro de control frente a las reacciones de pH ajustado a un pH de 7,0. Se puede ver claramente que en todas las reacciones donde un tratamiento con ácido era seguido por un tratamiento cáustico diluido con el fin de llevar la fase acuosa a un pH neutro, disminuía la cantidad de aceite neutro perdido en la fase de goma.

La figura 16 compara el aceite neutro perdido con la fase de goma de varias condiciones de pH donde se usa una fosfolipasa A1. Todas las reacciones tienen un pH ajustado excepto la reacción "neutra". Se demuestra que la cantidad de aceite neutro es más baja cuando el pH se ha ajustado a 7,0 incluso frente a la reacción neutra no ajustada sin añadir ningún ácido o base para ayudar a la disponibilidad de NHP para el procedimiento de desgomado.

Ejemplo 17: Estudios de distribución de tamaño de partículas

En este ejemplo, se estudiaron la distribución media del tamaño de gotas y el tamaño de gotas prevalente del tratamiento de cizalladura aplicado en los métodos proporcionados en la presente memoria y los métodos disponibles en la técnica (p. ej., patentes de EE. UU. 4.698.185 y 6.103.505).

El tamaño de partículas en este estudio se analizó usando el analizador de tamaño de partículas (gotad) Malvern Mastersizer modelo 2000, con distribución de partículas y volumen calculada mediante el software que acompaña al equipo.

Ejemplo 17A: se calentaron 300 g de aceite de soja desgomado a 90°C en un vaso de precipitados de 600 ml con agitación normal usando un agitador magnético. A este se añadieron 1,8 g de agua desionizada, seguido de 0,565 g de ácido fosfórico al 85%. La mezcla se sometió después a cizalladura durante 30 segundos usando un homogeneizador Ultra-Turrax T-50 basic con un elemento de dispersión S 50 N-G 45 G a 10.000 (este homogeneizador es considerado por el proveedor como equivalente al Ultra Turrax T-45 usando en la patente de EE. UU. 4.698.185).

Después, se analizó una muestra de la emulsión formada en el Malvern 2000. El tamaño medio de gotas para la fase acuosa era de 3,963 μm y el 90% de la fase acuosa aparecía en gotas con un diámetro inferior a 6,675 μm (tabla 33). La distribución de gotas se muestra en la figura 17.

Tabla 33

Tamaño de gotas (μm)	Distribución de volumen (%)				Distribución de volumen acumulado (%)			
	Ejemplo 17A	Ejemplo 17B	Ejemplo 17D	Ejemplo 17C	Ejemplo 17A	Ejemplo 17B	Ejemplo 17D	Ejemplo 17C
1,259	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,445	0,13	0,00	0,01	0,00	0,13	0,00	0,01	0,00
1,660	2,38	0,91	0,09	0,01	2,51	0,91	0,10	0,01
1,905	5,25	4,62	0,10	0,10	7,76	5,53	0,20	0,11
2,188	7,63	7,51	0,09	0,23	15,39	13,04	0,29	0,34
2,512	9,37	9,76	0,08	0,35	24,76	22,80	0,37	0,69
2,884	10,44	11,18	0,15	0,49	35,20	33,98	0,52	1,18
3,311	10,84	11,71	0,37	0,67	46,04	45,69	0,89	1,85
3,802	10,62	11,45	0,87	0,90	56,66	57,14	1,76	2,75
4,365	9,95	10,60	1,73	1,20	66,61	67,74	3,49	3,95
5,012	8,95	9,35	2,98	1,60	75,56	77,09	6,47	5,55
5,754	7,72	7,89	4,62	2,12	83,28	84,98	11,09	7,67
6,607	6,30	6,27	6,50	2,77	89,58	91,25	17,59	10,44
7,586	4,78	4,58	8,49	3,56	94,36	95,83	26,08	14,00
8,710	3,21	2,92	10,26	4,46	97,57	98,75	36,34	18,46
10,000	1,80	1,23	11,51	5,46	99,37	99,98	47,85	23,92
11,482	0,62	0,00	11,94	6,45	99,99	100,00	59,79	30,37
13,183	0,01	0,00	11,41	7,30	100,00	100,00	71,20	37,67
15,136	0,00	0,00	9,99	7,97	100,00	100,00	81,19	45,64
17,378	0,00	0,00	7,90	8,27	100,00	100,00	89,09	53,91
19,953	0,00	0,00	5,57	8,23	100,00	100,00	94,66	62,14
22,909	0,00	0,00	3,34	7,81	100,00	100,00	98,00	69,95
26,303	0,00	0,00	1,61	7,06	100,00	100,00	99,61	77,01
30,200	0,00	0,00	0,39	6,08	100,00	100,00	100,00	83,09
34,674	0,00	0,00	0,00	4,97	100,00	100,00	100,00	88,06
39,811	0,00	0,00	0,00	3,85	100,00	100,00	100,00	91,91
45,709	0,00	0,00	0,00	2,82	100,00	100,00	100,00	94,73
52,481	0,00	0,00	0,00	1,96	100,00	100,00	100,00	96,69
60,256	0,00	0,00	0,00	1,28	100,00	100,00	100,00	97,97
69,183	0,00	0,00	0,00	0,79	100,00	100,00	100,00	98,76
79,433	0,00	0,00	0,00	0,47	100,00	100,00	100,00	99,23
91,201	0,00	0,00	0,00	0,27	100,00	100,00	100,00	99,50
104,713	0,00	0,00	0,00	0,17	100,00	100,00	100,00	99,67
120,226	0,00	0,00	0,00	0,11	100,00	100,00	100,00	99,78

Ejemplo 17B: Se calentaron 2000 g de aceite de soja desgomado a 90°C en un vaso de precipitados de 4000 ml con agitación normal usando un agitador magnético. Se añadieron 12 g de agua desionizada al aceite, seguido de 3,767 g de ácido fosfórico al 85%. Después, la mezcla se sometió a cizalladura durante 30 segundos usando un homogeneizador Ultra-Turrax T-50 basic con un elemento de dispersión S 50 N-G 45 G a 10.000.

Después, se analizó una muestra de la emulsión formada en el Malvern 2000. El tamaño medio de gotas para la fase acuosa era de 3,905 μm y el 90% de la fase acuosa aparecía en gotas con un diámetro inferior a 6,405 μm (tabla 33). La distribución de gotas se muestra en la figura 18.

Ejemplo 17C: se calentaron 2000,3 g de aceite de soja bruto a 60°C en un vaso de precipitados de 4000 ml con agitación normal usando un agitador magnético. Se añadieron 2,0 gramos de solución de ácido cítrico al 50% en p/p y se agitaron con cizalladura durante 1 minuto. Se añadieron 3,650 mililitros de solución de hidróxido de sodio 4 molar al aceite y se mezclaron. Se añadieron 0,50 gramos de enzima PLC Purifine seguido de un total de 60 gramos de agua desionizada y toda la mezcla se mezcló con cizalladura durante 30 segundos usando un homogeneizador Ultra-Turrax T-50 basic con un elemento de dispersión S 50 N-G 45 G a 10.000 rpm.

Después, se analizó una muestra de la emulsión formada en el Malvern 2000. El tamaño medio de gotas para la fase acuosa era de 19,957 μm y el 90% de la fase acuosa aparecía en gotas con un diámetro inferior a 36,998 μm (tabla 33). La distribución de gotas se muestra en la figura 19.

Ejemplo 17D: Se calentaron 0,6 litros (aproximadamente 560 g) de aceite de soja desgomado a 40°C en un vaso de precipitados de 600 ml con recirculación por el mezclador Silverson. El mezclador se enfrió en un baño de agua, para evitar el aumento de temperatura durante el experimento. Se añadieron 0,6 g de una solución de ácido cítrico al

50% en p/p, seguido de 1,095 mililitros de solución de hidróxido de sodio 4 molar. Se añadieron 0,028 g (50 ppm) de enzima PLA Lecitase Ultra seguido de un total de 16,8 g de agua desionizada.

- 5 Después, se recogió una muestra de la emulsión formada después de 15 minutos, con el fin de permitir el equilibrio del sistema. Después la muestra se analizó en el Malvern 2000. El tamaño medio de gotas para la fase acuosa era de 12,691 μm y el 90% de la fase acuosa aparecía en gotas con un diámetro inferior a 20,333 μm (tabla 33). La distribución de gotas se muestra en la figura 20. Siendo un mezclador en línea, el Silverson continuó reduciendo el tamaño de gotas, logrando finalmente un tamaño medio de partículas de 9 μm .

La figura 21 representa la superposición de la distribución de tamaños de gotas (partículas) resultante de los ejemplos 17A, 17B, 17C y 17D.

- 10 La tabla 34 proporciona datos para el tamaño de partículas comparativo para los ejemplos 17A, 17B, 17C y 17D. Tabla 34

	Ejemplo 17A	Ejemplo 17B	Ejemplo 17D	Ejemplo 17C
Tamaño medio de partículas (μm)	3,963	3,905	12,691	19,975
Tamaño de partícula para volumen de agua acumulado del 90% (μm)	6,675	6,405	20,333	36,998
fase acuosa en gotas $\leq 10 \mu\text{m}$ (%)	99,37	99,98	47,85	23,92
fase acuosa en gotas $> 10 \mu\text{m}$ (%)	0,63	0,02	52,15	76,08

- 15 Como se ve a partir de los datos, el ejemplo 17C produjo un perfil de distribución de gotas muy distintivo, con un tamaño medio de partículas más alto. Se encontró que el tamaño medio de partículas del ejemplo 17C era aproximadamente 5 veces mayor que el del ejemplo 17A y 17B, y 1,6 veces mayor que el del ejemplo 17D.

Como se ve a partir de los datos, para el ejemplo 17C, más del 76% de la fase acuosa se encuentra en gotas con un diámetro mayor que 10 μm , mientras que en el ejemplo 17A el 52% de la fase acuosa se encuentra en gotas con un diámetro mayor que 10 μm , y menos del 0,65% de la fase acuosa se encuentra en gotas con un diámetro mayor que 10 μm en el ejemplo 17D.

- 20 Ejemplo 18: Estudio comparativo de gomas obtenidas por diferentes métodos

En este ejemplo, se proporcionan datos comparativos para el aceite tratado de acuerdo con los procedimientos descritos en la patente de EE. UU. 4.698.185 y el procedimiento descrito en los ejemplos 4-16 anteriores.

Varios aceites (citados en la tabla 35) se tratan de acuerdo con el siguiente protocolo como se describe en la patente de EE. UU. 4.698.185:

- 25 - se calienta el aceite a más de 75°C
- se añade para elevar la concentración al 0,6% en peso
- se añade ácido fosfórico aproximadamente al 20 - 60% en peso al aceite desgomado con agua
- se dispersa el ácido durante 30 segundos
- la mezcla se continua durante tres minutos
- 30 - se añade solución cáustica aproximadamente al 2% en volumen
- la mezcla se centrifuga durante 30 minutos a 5.000 rpm
- la fase oleosa se separa y se lava con agua desmineralizada al 2% en peso
- el agua de lavado se elimina por centrifugación durante 30 minutos a 5.000 rpm
- se analizan las gomas en el aceite

- 35 La tabla 35 a continuación proporciona datos para la composición de gomas separadas de las muestras de aceite tratadas:

Tipo de aceite	Soja	Girasol	Germen de maíz	Colza	Cacahuete
Fosfolípidos					
PA	55	49	37	72	53
LPA	6	20	-	6	-
PC	4	8	26	<1	15
LPC	<1	-	-		
PE	17	9	13	13	7
LPE	<1	5		2	
Cardiolipina N-acilfosfatidil-etanolamina	13	9	19	7	24
PI	4	-	5	-	
No identificado	-	-		-	

La tabla 36 a continuación proporciona datos para los fosfolípidos en muestras de aceite tratado de acuerdo con los ejemplos 10, 11, 12, 13 y 16 anteriores.

Tabla 36:

	Ejemplo 10	Ejemplo 11	Ejemplo 12	Ejemplo 13	Ejemplo 16
Fosfolípidos					
PA	11,6	18,9	11,6	20,1	0,0
LPA	1,1	3,3	1,8	3,6	14,1
"A"	0,7	1,5	0,9	1,8	1,0
PC	31,4	1,5	31,0	6,7	0,6
LPC	2,4	3,3	2,7	2,2	32,9
"C"	ILD	19,3	1,6	23,3	0,3
PE	32,1	4,3	30,4	10,5	1,9
LPE	2,0	1,1	1,0	0,5	31,5
"E"	ILD	13,7	11,2	15,8	ILD
PI	17,3	30,3	9,6	4,4	0,3
LPI	1,4	2,5	ILD	ILD	17,1
"I"	ILD	0,3	17,3	11,2	0,4

5

La Tabla 37 a continuación proporciona un resumen de las enzimas usadas, el pH de la reacción y los datos para fosfolípidos en muestras de aceite tratadas de acuerdo con los ejemplos 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 y 16 anteriores.

Tabla 37:

	PC	PE	PI	PA	LPC	LPE	LPI	LPA	C	E	I	A	Enzima	pH
1	39,5	30,2	16,5	8,4	2,4	1,4	1,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,3	Ninguna	Neutro
7	31,4	32,1	17,3	11,6	2,4	2,0	1,4	1,1	0,0	0,0	0,0	0,7	Ninguna	7,0
2	1,1	11,3	29,1	15,9	2,4	0,5	2,2	1,6	21,6	13,3	0,0	1,1	PLC	Neutro
8	1,5	4,3	30,3	18,9	3,3	1,1	2,5	3,3	19,3	13,7	0,3	1,5	PLC	7,0
3	41,5	29,3	0,0	8,8	2,2	1,3	0,0	0,0	0,2	0,1	16,2	0,5	PI-PLC	Neutro
9	31,0	30,4	0,0	11,6	2,7	2,1	0,0	1,8	1,6	0,7	17,3	0,9	PI-PLC	7,0
4	13,6	17,6	9,6	15,8	2,5	1,0	0,0	2,0	18,5	11,2	7,2	1,0	PLC + PI-PLC	Neutro
10	6,7	10,5	4,4	20,1	2,2	0,5	0,0	3,6	23,3	15,8	11,2	1,8	PLC + PI-PLC	7,0
5	0,9	1,6	2,7	1,1	32,2	29,3	17,3	14,1	0,0	0,0	0,0	0,7	PLA1	Neutro
13	0,6	1,9	0,3	0,0	32,9	31,5	17,1	14,1	0,3	0,0	0,4	1,0	PLA1	7,0

Como se ve a partir de los datos, los fosfolípidos obtenidos mediante los procedimientos descritos en la presente memoria tienen una composición única.

LISTA DE SECUENCIAS

5 <110> BUNGE OILS, INC.
 DAYTON, Christopher L. G.
 GALHARDO, Flavio da Silva
 BARTON, Nelson
 HITCHMAN, Timothy
 LYON, Jonathan
 O'DONOGHUE, Eileen
 WALL, Mark

10 <120> MÉTODOS DE DESGOMADO DE ACEITE

<130> 011631-051-228

15 <140> Todavía no asignada
 <140> Junto a esta

<160> 10

20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
 <211> 738
 <212> ADN
 25 <213> Artificial

<220>
 <223> Generada sintéticamente

30 <400> 1

tggtcagctg	aggataagca	taatgagggg	attaactctc	atttgtggat	tgtaaatcgt	60
gcaattgaca	tcattgtctcg	taatacaacg	attgtgaatc	cgaatgaaac	tgcatattatta	120
aatgagtggc	gtgctgattt	agaaaatggg	atttattctg	ctgattacga	gaatccttat	180
tatgatgata	gtacatatgc	ttctcacttt	tatgatccgg	atactggaac	aacatatatt	240
ccttttgcca	aacatgcaaa	agaaacaggg	gcaaaatatt	ttaaccttgc	tggtcaagca	300
taccaaaatc	aagatatgca	gcaagcattc	ttctacttag	gattatcgct	tcattatttta	360
ggagatgtga	atcagccaat	gcatgcagca	tcttttacgg	atctttctta	tccaatgggt	420
ttccattcta	aatacgaaaa	ttttgttgat	acaataaaaa	ataactatat	tgtttcagat	480
agcaatggat	attggaattg	gaaaggagca	aaccacagaag	attggattga	aggagcagcg	540
gtagcagcta	aacaagatta	tcctggcggt	gtgaacgata	cgacaaaaga	ttggtttgta	600
aaagcagccg	tatctcaaga	atatgcagat	aaatggcggtg	cggaagtaac	accggtgaca	660
ggaaagcggt	taatggaagc	gcagcgcggt	acagctgggt	atattcattt	gtggtttgat	720
acgtatgtaa	atcgctaa					738

<210> 2
 <211> 245
 35 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Generada sintéticamente

40 <400> 2

Trp	Ser	Ala	Glu	Asp	Lys	His	Asn	Glu	Gly	Ile	Asn	Ser	His	Leu	Trp
1			5					10					15		
Ile	Val	Asn	Arg	Ala	Ile	Asp	Ile	Met	Ser	Arg	Asn	Thr	Thr	Ile	Val
		20					25				30				
Asn	Pro	Asn	Glu	Thr	Ala	Leu	Leu	Asn	Glu	Trp	Arg	Ala	Asp	Leu	Glu


```

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

```

<210> 3
 <211> 849
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 10 <223> Generada sintéticamente

```

<400> 3
atgaaaaaga aagtattagc actagcagct atggttgctt tagctgcgcc agttcaaagt      60
gtagtatttg cacaaacaaa taatagtga agtcctgcac cgattttaag atggtcagct      120
gaggataagc ataatgaggg gattaactct cattttgtgga ttgtaaactg tgcaattgac      180
atcatgtctc gtaatacaac gattgtgaat ccgaatgaaa ctgcattatt aaatgagtgg      240
cgtgctgatt tagaaaatgg tattttattct gctgattacg agaatcctta ttatgatgat      300
agtacatatg cttctcactt ttatgatccg gatactggaa caacatatat tccttttgcg      360
aaacatgcaa aagaaacagg cgcaaaatat tttaaccttg ctggtcaagc atacaaaaat      420
caagatatgc agcaagcatt cttctactta ggattatcgc ttcattattt aggagatgtg      480
aatcagccaa tgcatgcagc atcttttacg gatctttctt atccaatggg ttccattct      540
aaatcggaaa attttgttga tacaataaaa aataactata ttgtttcaga tagcaatgga      600
tattggaatt ggaaaggagc aaaccagaa gattggattg aaggagcagc ggtagcagct      660
aaacaagatt atcctggcgt tgtgaacgat acgacaaaag attggtttgt aaaagcagcc      720
gtatctcaag aatatgcaga taaatggcgt gcggaagtaa caccggtgac aggaaagcgt      780
ttaatggaag cgcagcgcgt tacagctggt tatattcatt tgtggtttga tacgtatgta      840
aatcgctaa
      849

```

<210> 4
 15 <211> 282
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 20 <223> Generada sintéticamente

<220>
 <221> SEÑAL
 <222> (1)...(37)

<400> 4

Met Lys Lys Lys Val Leu Ala Leu Ala Ala Met Val Ala Leu Ala Ala
 1 5 10 15
 Pro Val Gln Ser Val Val Phe Ala Gln Thr Asn Asn Ser Glu Ser Pro
 20 25 30
 Ala Pro Ile Leu Arg Trp Ser Ala Glu Asp Lys His Asn Glu Gly Ile
 35 40 45
 Asn Ser His Leu Trp Ile Val Asn Arg Ala Ile Asp Ile Met Ser Arg
 50 55 60
 Asn Thr Thr Ile Val Asn Pro Asn Glu Thr Ala Leu Leu Asn Glu Trp
 65 70 75 80
 Arg Ala Asp Leu Glu Asn Gly Ile Tyr Ser Ala Asp Tyr Glu Asn Pro
 85 90 95
 Tyr Tyr Asp Asp Ser Thr Tyr Ala Ser His Phe Tyr Asp Pro Asp Thr
 100 105 110
 Gly Thr Thr Tyr Ile Pro Phe Ala Lys His Ala Lys Glu Thr Gly Ala
 115 120 125
 Lys Tyr Phe Asn Leu Ala Gly Gln Ala Tyr Gln Asn Gln Asp Met Gln
 130 135 140
 Gln Ala Phe Phe Tyr Leu Gly Leu Ser Leu His Tyr Leu Gly Asp Val
 145 150 155 160
 Asn Gln Pro Met His Ala Ala Ser Phe Thr Asp Leu Ser Tyr Pro Met
 165 170 175
 Gly Phe His Ser Lys Tyr Glu Asn Phe Val Asp Thr Ile Lys Asn Asn
 180 185 190
 Tyr Ile Val Ser Asp Ser Asn Gly Tyr Trp Asn Trp Lys Gly Ala Asn
 195 200 205
 Pro Glu Asp Trp Ile Glu Gly Ala Ala Val Ala Lys Gln Asp Tyr
 210 215 220
 Pro Gly Val Val Asn Asp Thr Thr Lys Asp Trp Phe Val Lys Ala Ala
 225 230 235 240
 Val Ser Gln Glu Tyr Ala Asp Lys Trp Arg Ala Glu Val Thr Pro Val
 245 250 255
 Thr Gly Lys Arg Leu Met Glu Ala Gln Arg Val Thr Ala Gly Tyr Ile
 260 265 270
 His Leu Trp Phe Asp Thr Tyr Val Asn Arg
 275 280

<210> 5
 <211> 987
 <212> ADN
 <213> Desconocido

<220>
 <223> ADN obtenido a partir de una muestra ambiental

<400> 5
 atgaacaata agaagtttat tttgaagtta ttcatatgta gtatggtact tagcgctttt 60
 gtatttgctt tcaatgataa gaaaaccggt gcagctagct ctattaatgt gcttgaaaat 120
 tggctagat ggatgaaacc tataaatgat gacataccgt tagcacgaat ttcaattcca 180
 ggaacacatg atagtggaac gttcaagttg caaaatccga taaagcaagt gtggggaatg 240
 acgcaagaat atgattttcg ttatcaaatg gatcatggag ctagaatttt tgatataaga 300
 gggcggttaa cagatgataa tacgatagtt cttcatcatg ggccattata tctttatgta 360
 acactgcacg aattttataaa cgaagcgaaa caatttttaa aagataatcc aagtgaacg 420
 attattatgt ctttaaaaaa agagtatgag gatatgaaag gggcggaag ctcatttagt 480
 agtacgtttg agaaaaatta ttttcgtgat ccaatctttt taaaaacaga agggaatata 540
 aagcttgag atgctcgtgg gaaaattgta ttactaaaaa gatatagtgg tagtaatgaa 600
 tctgggggat ataataattt ctattggcca gacaatgaga cgtttacctc aactataaat 660
 caaaatgtaa atgtaacagt acaagataaa tataaagtga gttatgatga gaaaaataac 720
 gctattaaag atacattaaa tgaaacgatt aacaatagt aagatgttaa tcatctatat 780
 attaatatta caagcttgct ttctggtggt acagcatgga atagtccata ttattatgag 840
 tcctacataa atcctgaaat tgcaaattat atgaagcaaa agaatcctac gagagtgggc 900
 tggataatac aagattatat aaatgaaaaa tggtcaccat tactttatca agaagttata 960
 agagcgaata agtcacttgt aaaatag 987

<210> 6
 <211> 328
 <212> PRT
 <213> Desconocido

<220>

<223> Proteína obtenida a partir de una muestra ambiental

<220>

<221> SEÑAL

5 <222> (1)...(23)

<220>

<221> DOMINIO

<222> (56)...(195)

10 <223> Fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol, dominio X

<400> 6

```

Met Asn Asn Lys Lys Phe Ile Leu Lys Leu Phe Ile Cys Ser Met Val
1      5      10      15
Leu Ser Ala Phe Val Phe Ala Phe Asn Asp Lys Lys Thr Val Ala Ala
20      25      30
Ser Ser Ile Asn Val Leu Glu Asn Trp Ser Arg Trp Met Lys Pro Ile
35      40      45
Asn Asp Asp Ile Pro Leu Ala Arg Ile Ser Ile Pro Gly Thr His Asp
50      55      60
Ser Gly Thr Phe Lys Leu Gln Asn Pro Ile Lys Gln Val Trp Gly Met
65      70      75      80
Thr Gln Glu Tyr Asp Phe Arg Tyr Gln Met Asp His Gly Ala Arg Ile
85      90      95
Phe Asp Ile Arg Gly Arg Leu Thr Asp Asp Asn Thr Ile Val Leu His
100     105     110
His Gly Pro Leu Tyr Leu Tyr Val Thr Leu His Glu Phe Ile Asn Glu
115     120     125
Ala Lys Gln Phe Leu Lys Asp Asn Pro Ser Glu Thr Ile Ile Met Ser
130     135     140
Leu Lys Lys Glu Tyr Glu Asp Met Lys Gly Ala Glu Ser Ser Phe Ser
145     150     155     160
Ser Thr Phe Glu Lys Asn Tyr Phe Arg Asp Pro Ile Phe Leu Lys Thr
165     170     175
Glu Gly Asn Ile Lys Leu Gly Asp Ala Arg Gly Lys Ile Val Leu Leu
180     185     190
Lys Arg Tyr Ser Gly Ser Asn Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Asn Phe Tyr
195     200     205
Trp Pro Asp Asn Glu Thr Phe Thr Ser Thr Ile Asn Gln Asn Val Asn
210     215     220
Val Thr Val Gln Asp Lys Tyr Lys Val Ser Tyr Asp Glu Lys Ile Asn
225     230     235     240
Ala Ile Lys Asp Thr Leu Asn Glu Thr Ile Asn Asn Ser Glu Asp Val
245     250     255
Asn His Leu Tyr Ile Asn Phe Thr Ser Leu Ser Ser Gly Gly Thr Ala
260     265     270
Trp Asn Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ala Ser Tyr Ile Asn Pro Glu Ile Ala
275     280     285
Asn Tyr Met Lys Gln Lys Asn Pro Thr Arg Val Gly Trp Ile Ile Gln
290     295     300
Asp Tyr Ile Asn Glu Lys Trp Ser Pro Leu Leu Tyr Gln Glu Val Ile
305     310     315     320
Arg Ala Asn Lys Ser Leu Val Lys
325

```

<210> 7

15 <211> 897

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Generada sintéticamente

<400> 7

```

atggctagct ctattaatgt gcttgaaaat tggcttagat ggatgaaacc tataaatgat      60
gacataccgt tagcacgaat ttcaattcca ggaacacatg atagtggaaac gttcaagttg      120
caaaatccga taaagcaagt gtgggggaatg acgcaagaat atgattttcg ttatcaaagt      180
gatcatggag ctagaatttt tgatataaga gggcggttaa cagatgataa tacgatagtt      240
cttcatcatg ggccattata tctttatgta acactgcacg aatttataaa cgaagcgaaa      300
caatttttaa aagataatcc aagtgaacg attattatgt ctttaaaaaa agagtatgag      360
gatatgaaag gggcggaag ctcatttagt agtacgtttg agaaaaatta ttttcgtgat      420
ccaatctttt taaaaacaga aggaaatata aagcttggag atgctcgtgg gaaaattgta      480
ttactaaaaa gatatagtgg tagtaatgaa tctgggggat ataatttttt ctattggcca      540
gacaatgaga cgtttacctc aactataaat ggtaaatgtaa atgtaacagt acaagataaa      600
tataaagtga gtttgatga gaaaataaac gctattaaag atacattaaa tgaaacgatt      660
aacaatagtg aagatgtaa tcatctatat attaatTTTA caagcttgtc ttctggtggt      720
acagcatgga cgagtccata ttattatgcg tccaggataa atcctgaaat tgcaaattat      780
attaagcaaa agaatcctac gagagtgggc tggataatac aagattttat aaatgaaaaa      840
tggcatccat tactttatca agaagttata aatgcgaata agtcacttgt aaaatga      897

```

<210> 8

<211> 298

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Generada sintéticamente

<400> 8

```

Met Ala Ser Ser Ile Asn Val Leu Glu Asn Trp Ser Arg Trp Met Lys
1          5          10          15
Pro Ile Asn Asp Asp Ile Pro Leu Ala Arg Ile Ser Ile Pro Gly Thr
20          25          30
His Asp Ser Gly Thr Phe Lys Leu Gln Asn Pro Ile Lys Gln Val Trp
35          40          45
Gly Met Thr Gln Glu Tyr Asp Phe Arg Tyr Gln Met Asp His Gly Ala
50          55          60
Arg Ile Phe Asp Ile Arg Gly Arg Leu Thr Asp Asp Asn Thr Ile Val
65          70          75          80
Leu His His Gly Pro Leu Tyr Leu Tyr Val Thr Leu His Glu Phe Ile
85          90          95
Asn Glu Ala Lys Gln Phe Leu Lys Asp Asn Pro Ser Glu Thr Ile Ile
100          105          110
Met Ser Leu Lys Lys Glu Tyr Glu Asp Met Lys Gly Ala Glu Ser Ser
115          120          125
Phe Ser Ser Thr Phe Glu Lys Asn Tyr Phe Arg Asp Pro Ile Phe Leu
130          135          140
Lys Thr Glu Gly Asn Ile Lys Leu Gly Asp Ala Arg Gly Lys Ile Val
145          150          155          160
Leu Leu Lys Arg Tyr Ser Gly Ser Asn Glu Ser Gly Gly Tyr Asn Phe
165          170          175
Phe Tyr Trp Pro Asp Asn Glu Thr Phe Thr Ser Thr Ile Asn Gly Asn
180          185          190
Val Asn Val Thr Val Gln Asp Lys Tyr Lys Val Ser Leu Asp Glu Lys
195          200          205
Ile Asn Ala Ile Lys Asp Thr Leu Asn Glu Thr Ile Asn Asn Ser Glu
210          215          220
Asp Val Asn His Leu Tyr Ile Asn Phe Thr Ser Leu Ser Ser Gly Gly
225          230          235          240

Thr Ala Trp Thr Ser Pro Tyr Tyr Tyr Ala Ser Arg Ile Asn Pro Glu
245          250          255
Ile Ala Asn Tyr Ile Lys Gln Lys Asn Pro Thr Arg Val Gly Trp Ile
260          265          270
Ile Gln Asp Phe Ile Asn Glu Lys Trp His Pro Leu Leu Tyr Gln Glu
275          280          285
Val Ile Asn Ala Asn Lys Ser Leu Val Lys
290          295

```

<210> 9

<211> 900

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Generada sintéticamente

<400> 9

atggccagca	gcatcaacgt	cctcgaaaac	tggtcgcgct	ggatgaagcc	gatcaacgac	60
gacatccgc	tgcccgcat	cagcatcccg	ggcaccacg	acagcggcac	cttcaagctg	120
cagaacccga	tcaagcaggt	ctggggcatg	accaggaat	acgacttccg	ctaccagatg	180
gaccacggcg	cccgcattct	cgacatccgc	ggccgcctga	ccgacgacaa	caccatcgtg	240
ctgcaccacg	gcccgcgtga	cctgtacgtg	accctgcacg	aattcatcaa	cgaagccaag	300
cagttcctga	aggacaaccc	gagcgaacc	atcatcatga	gcctgaagaa	agaatacgaa	360
gacatgaagg	gcgcgaaag	cagcttcagc	agcaccttcg	aaaagaacta	cttccgcgac	420
ccgatcttcc	tgaagaccga	aggcaacatc	aagctggcg	acgcccgcgg	caagatcgtc	480
ctcctgaagc	gctacagcgg	cagcaacgaa	agcggcggt	acaacttctt	ctactggccg	540
gacaacgaaa	ccttcaccag	caccatcaac	ggcaacgtga	acgtgaccgt	gcaggacaag	600
tacaaggtga	gcctggacga	aaagatcaac	gccatcaagg	acaccctgaa	cgaaccatc	660
aacaacagcg	aagacgtgaa	ccacctgtac	atcaacttca	ccagcctgag	cagcggcggc	720
accgcctgga	ccagcccgtg	ctactacgcc	agccgcacat	acccggaaat	cgccaactac	780
atcaagcaga	agaacccgac	ccgcgtgggc	tggtatcatc	aggacttcat	caacgaaaag	840
5	tggcaccgcg	tgctgtacca	ggaagtgatc	aacgcgaaca	agagcctggt	900

<210> 10

<211> 900

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Generada sintéticamente

15 <400> 10

atggcgagca	gcatcaacgt	cttgagaaac	tggtcccggt	ggatgaagcc	catcaacgac	60
gatatccac	tgcccgcat	ctcgatcccg	ggcaccacg	acagcggcac	ctttaaaactc	120
cagaacccaa	tcaaacaggt	ctggggcatg	accaggaat	acgacttccg	ctaccagatg	180
gaccacggcg	cccgcattct	cgacatccgc	ggccgcctga	ccgacgacaa	caccatcgtg	240
ctgcaccacg	ggccgcgtga	cctgtacgtg	accttgcacg	agttcatcaa	tgaggcgaag	300
cagttcctga	aggacaaccc	gagcgaacc	atcatcatgt	ccctgaagaa	agaatacgaa	360
gacatgaagg	ggcggagag	ttcggtcagc	agcaccttcg	aaaagaacta	cttccgcgac	420
ccgatcttcc	tgaagaccga	gggcaacatc	aaactggcg	acgcccgcgg	caagatcgtg	480
ctgttgaagc	ggtacagcgg	cagcaacgag	tcggggggct	acaacttctt	ttactggccg	540
gataacgaaa	ccttcacttc	gacgatcaac	ggcaacgtga	acgtgaccgt	gcaggacaag	600
tacaaggtca	gcctcgacga	aaagatcaat	gccatcaagg	acaccctgaa	cgagaccatc	660
aataacagcg	aggacgtgaa	ccacttgtac	atcaacttca	ccagtctctc	ctccggcggc	720
accgcctgga	ccagcccgtg	ctactacgcg	agtcgtatca	accccgagat	cgccaactac	780
atcaaacaga	aaaacccac	ccgggtcggt	tggtatcatc	aggacttcat	caacgagaag	840
15	tggcaccgcg	tgctgtacca	ggaggtgatc	aacgcgaaca	aatcgctggt	900

REIVINDICACIONES

1. Un método para desgomar un aceite bruto comestible que comprende:
 - i) mezclar un ácido acuoso con el aceite bruto comestible para obtener una mezcla ácida que tiene un pH de menos de aproximadamente 4;
 - ii) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene un pH de aproximadamente 6-9; y
 - iii) desgomado enzimático para obtener un aceite desgomado, en donde la enzima comprende la SEQ ID NO: 8;
- en donde el mezclado en las etapas i) y/o ii) crea una emulsión que comprende (a) al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen de tamaño de gotas entre aproximadamente 15 μ m y aproximadamente 45 μ m de tamaño, o (b) una fase acuosa de tamaño medio de gotas entre aproximadamente 15-35 μ m.
2. El método de la reivindicación 1, donde el aceite desgomado comprende menos de aproximadamente 30 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 20 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 15 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 10 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 7 ppm de fósforo, menos de aproximadamente 5 ppm de fósforo o menos de aproximadamente 3 ppm de fósforo.
3. El método de la reivindicación 1, en donde la emulsión comprende al menos aproximadamente 90% de la fase acuosa en volumen de tamaño de gotas de aproximadamente 15-45 μ m, 20-40 μ m, 20-45 μ m, 25-40 μ m, 20-35 μ m, 30-40 μ m, 35-40 μ m o 25-45 μ m.
4. El método de la reivindicación 1, en donde el ácido se selecciona del grupo que consiste en ácido fosfórico, ácido acético, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido succínico y una mezcla de los mismos.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el pH de la mezcla ácida en la etapa i) es de aproximadamente 1 a aproximadamente 4.
6. Un método para obtener un fosfolípido que comprende:
 - i) mezclar un ácido acuoso con un aceite bruto comestible para obtener una mezcla ácida que tiene un pH de menos de aproximadamente 4;
 - ii) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene un pH de aproximadamente 6-9, donde el mezclado en las etapas i) y/o ii) crea una emulsión que comprende (a) al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen de tamaño de gotas entre aproximadamente 15 μ m y aproximadamente 45 μ m de tamaño, o (b) una fase acuosa de tamaño medio de gotas entre aproximadamente 15-35 μ m;
 - iii) mezclar una enzima fosfolipasa, en donde la enzima comprende la SEQ ID NO: 8; y
 - iv) aislar el fosfolípido.
7. El método de la reivindicación 6, en donde el fosfolípido comprende fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS), fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA), lisofosfatidilcolina (LPC), lisofosfatidiletanolamina (LPE), lisofosfatidilserina (LPS), lisofosfatidilinositol (LPI), ácido lisofosfatídico (LPA), colina (C), etanolamina (E), serina (S), inositol (I) o una de sus combinaciones.
8. Un método para obtener inositol que comprende:
 - i) mezclar un ácido acuoso con un aceite bruto para obtener una mezcla ácida que tiene un pH de menos de aproximadamente 4;
 - ii) mezclar una base con la mezcla ácida para obtener una mezcla de reacción que tiene un pH de aproximadamente 6-9, en donde la mezcla en las etapas i) y/o ii) crea una emulsión que comprende al menos aproximadamente 60% de una fase acuosa en volumen de tamaño de gotas entre aproximadamente 15 μ m y aproximadamente 45 μ m de tamaño;
 - iii) mezclar una enzima fosfolipasa, en donde la enzima comprende la SEQ ID NO: 8; y
 - iv) aislar el inositol.

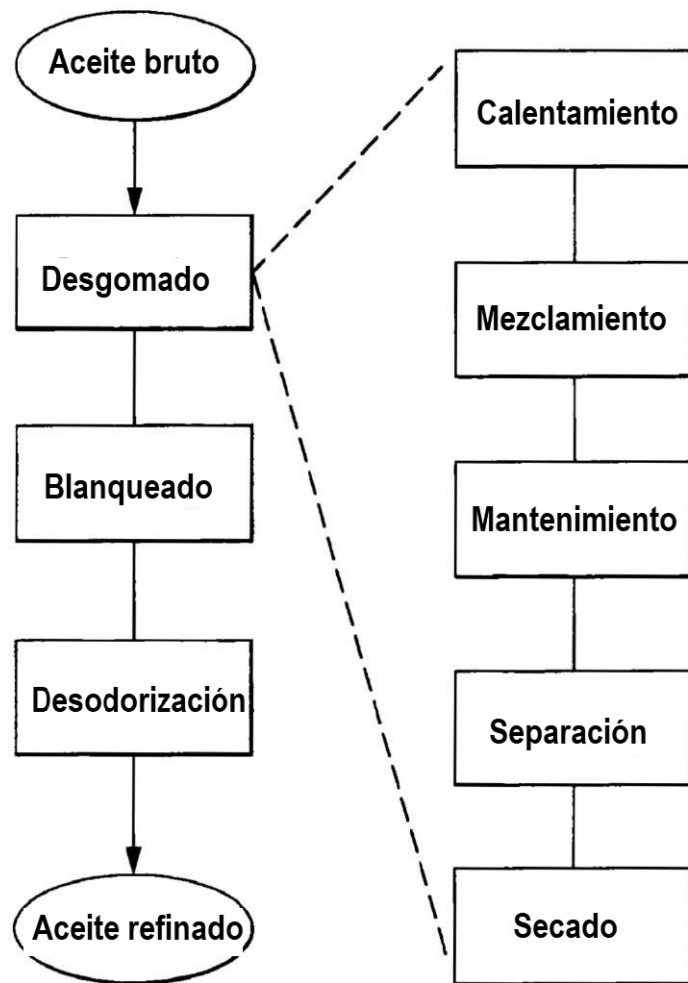


FIG. 1

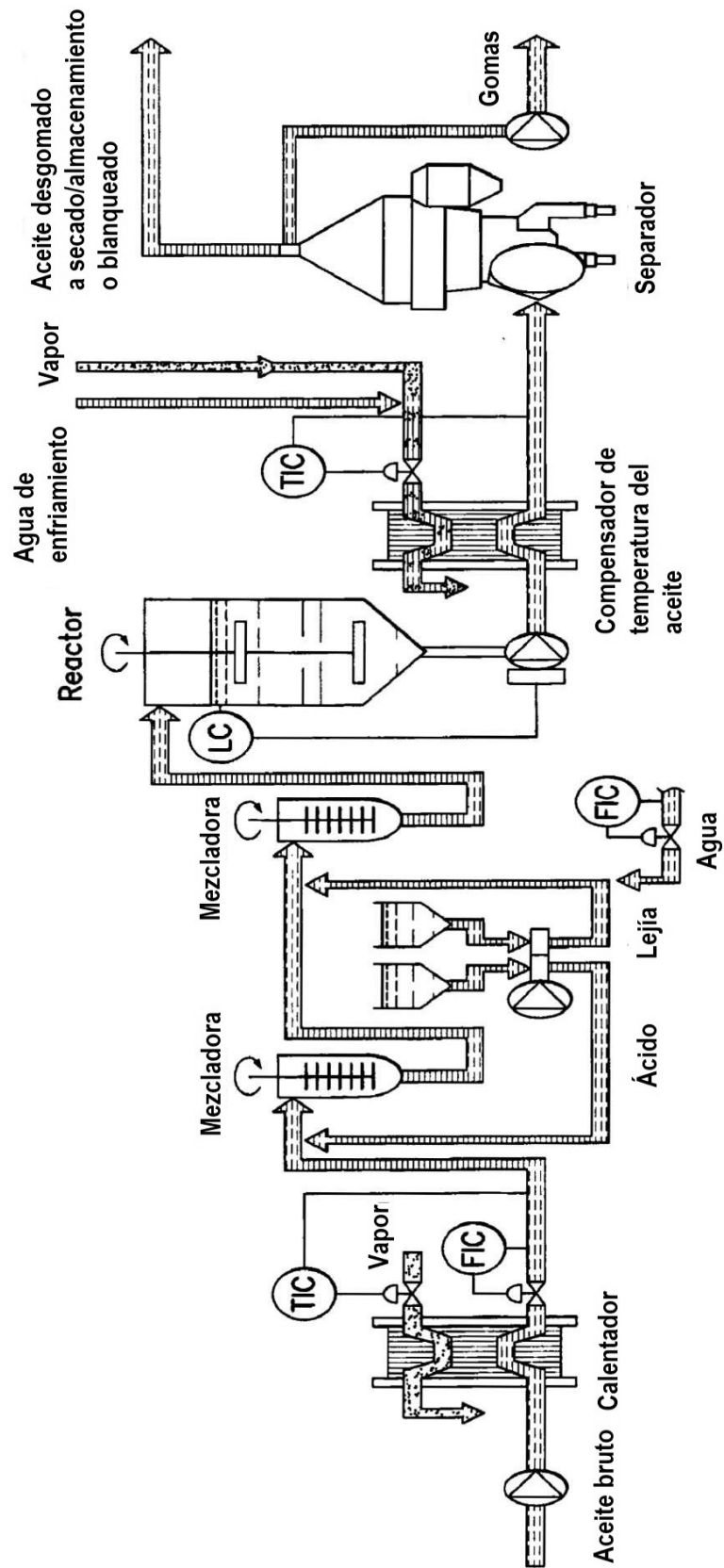


FIG. 2

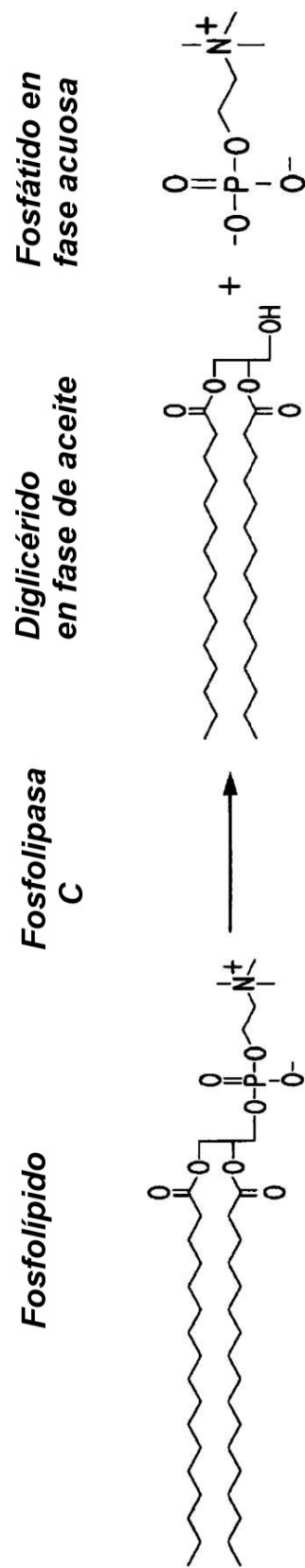


FIG. 3

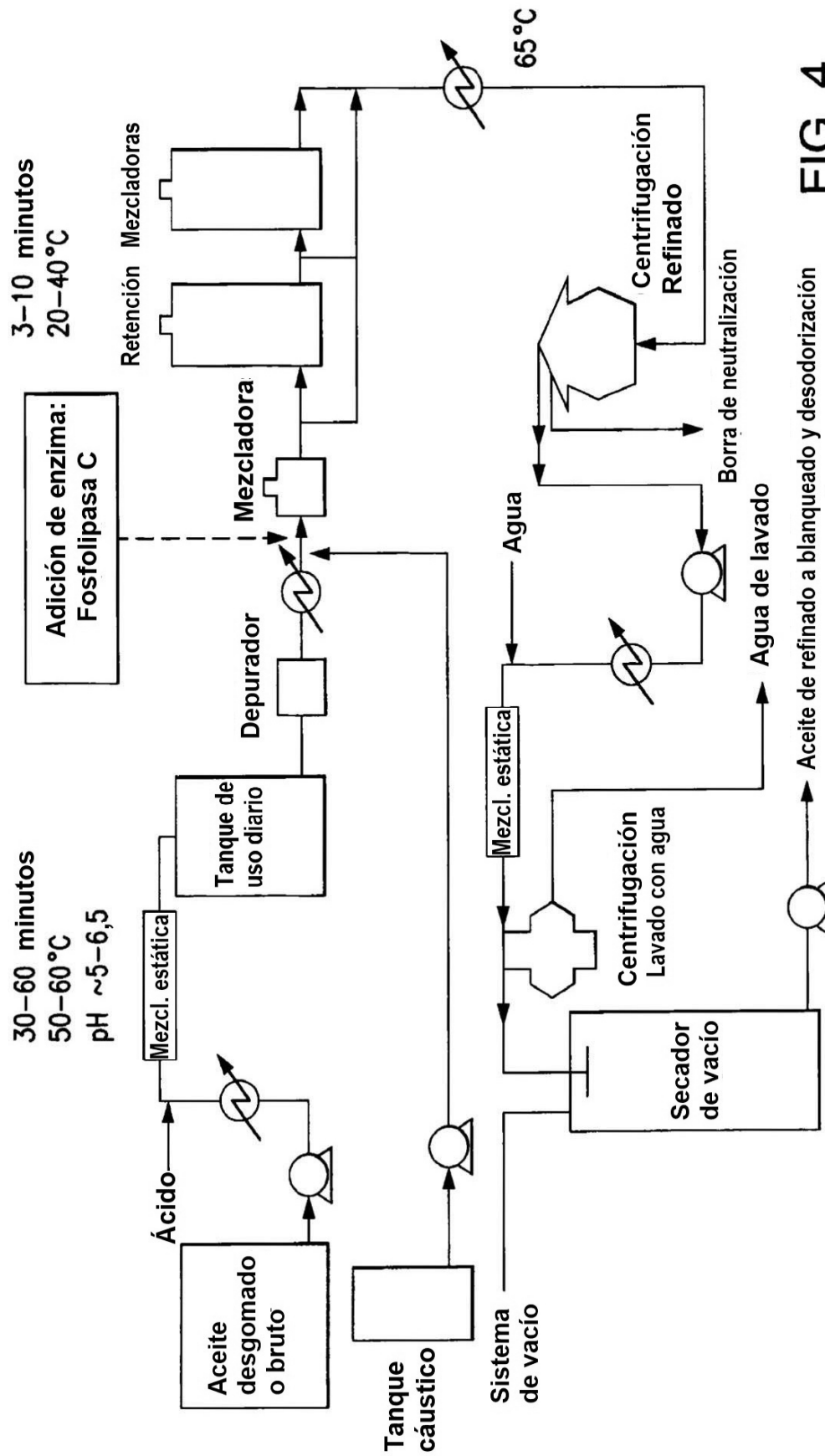


FIG. 4

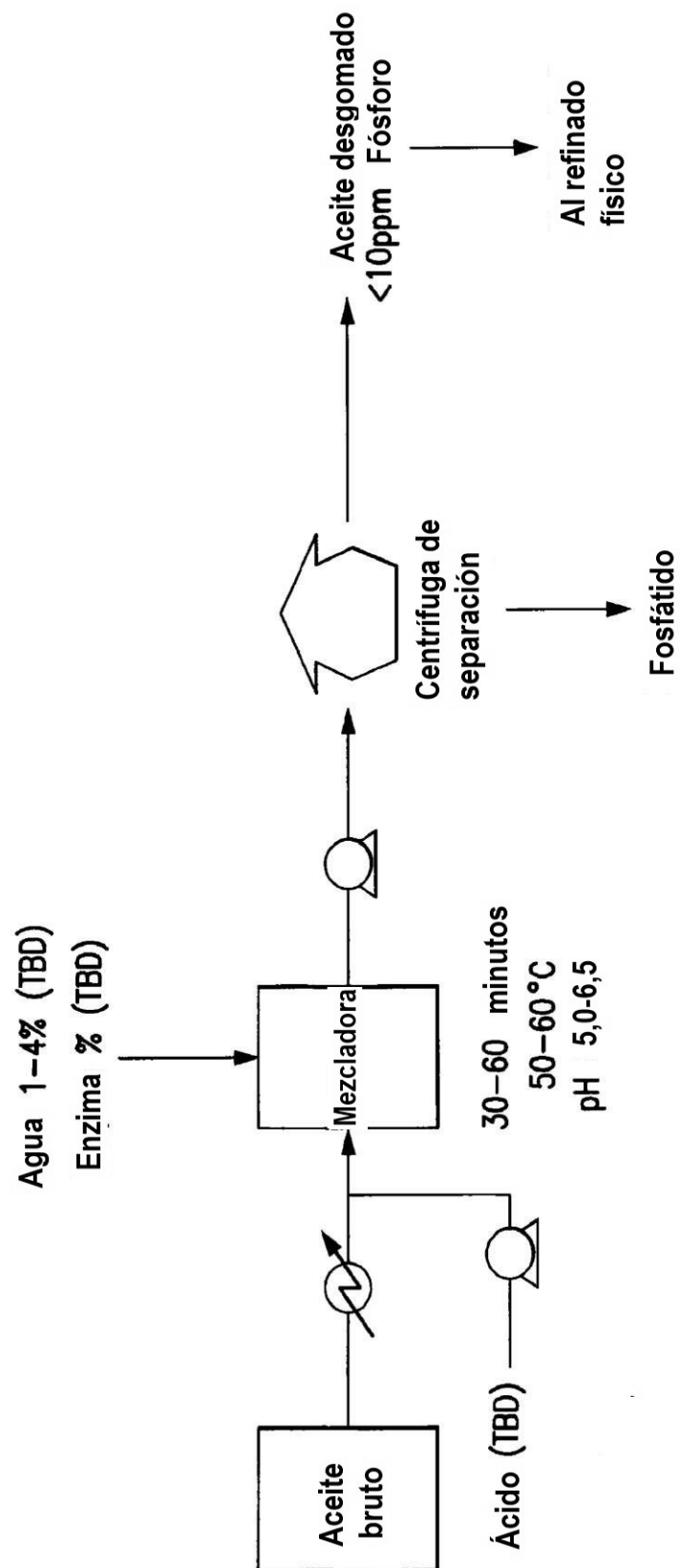


FIG. 5

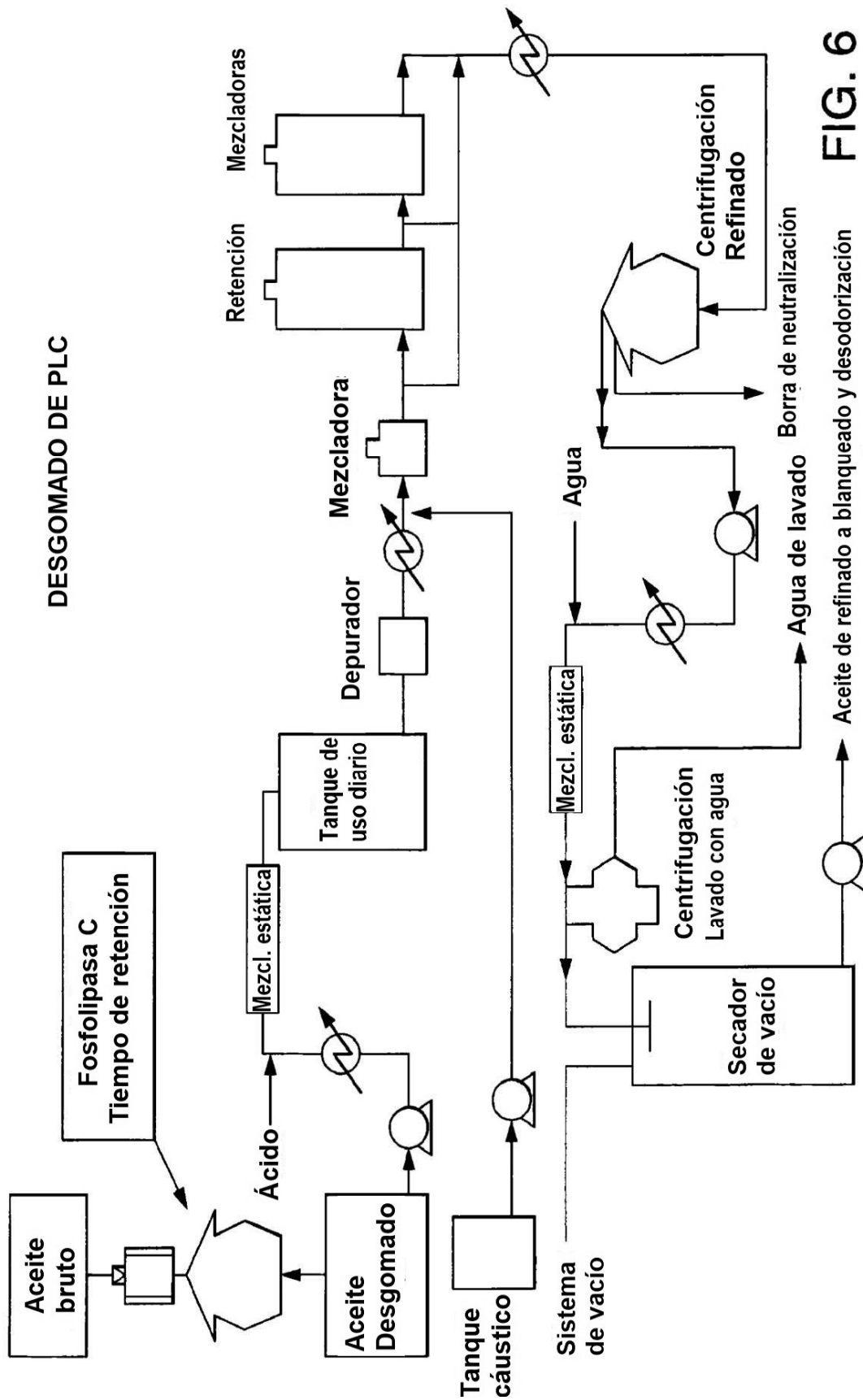
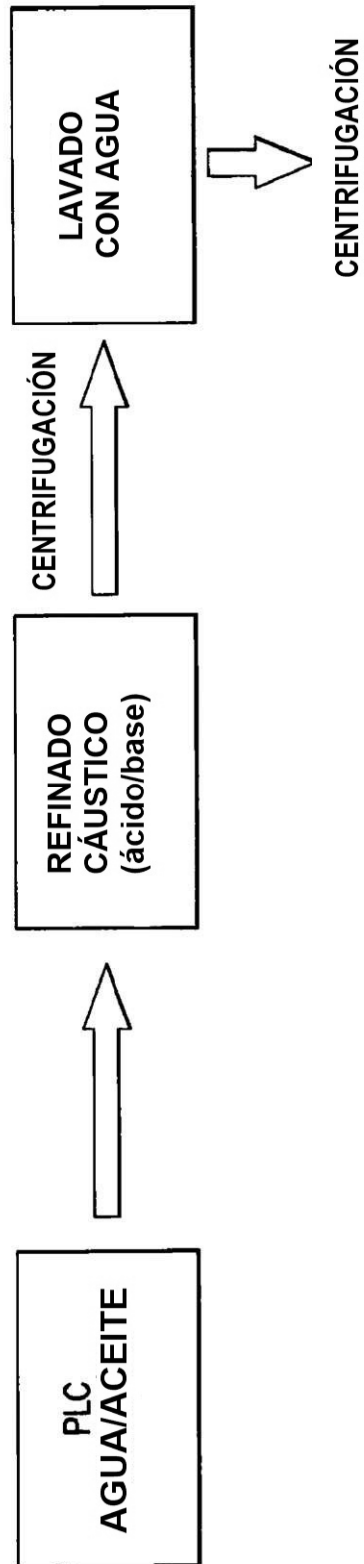
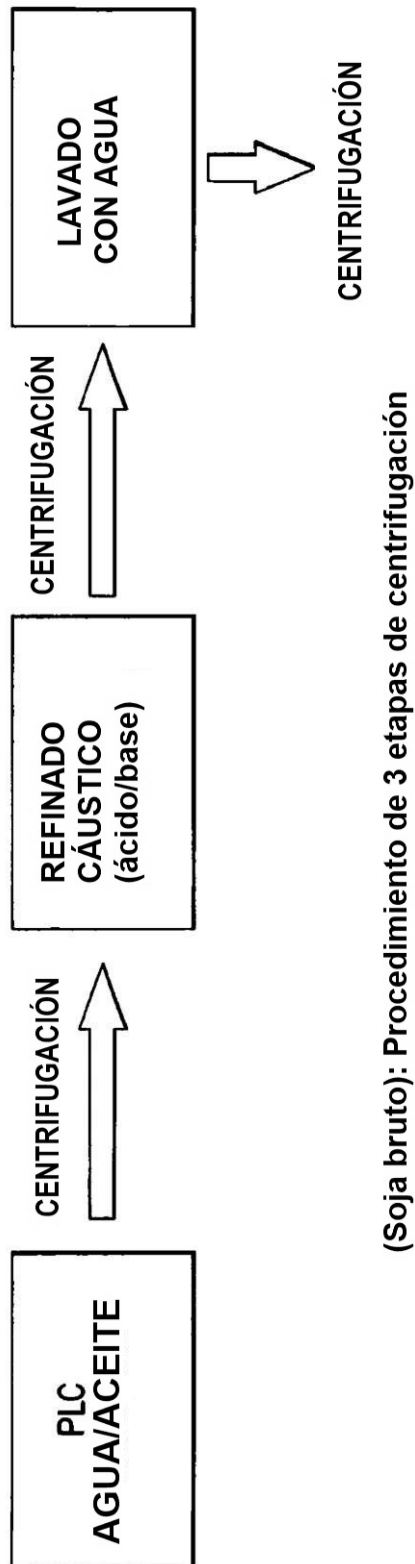


FIG. 6



(Soja bruto): Procedimiento de 2 etapas de centrifugación

FIG. 7



(Soja bruto): Procedimiento de 3 etapas de centrifugación

FIG. 8



(Aceite de soja bruto) Procedimiento de etapas de centrifugación con tratamiento ácido

FIG. 9

mutación	codón original	codón mutado	fracción en peso de PL totales después de reacción					PA (μM)	PI (μM)	PI/PA (μM)	(TIP/PI)/ (PA/TIP)	DAG liberado (rel. por HPLC)
			PA	PE	PI	PC	PA					
E41A	GAG	GCA	0,083	0,000	0,337	0,000	234	985	4,209	7,445		1,407
E41W	GAG	TGG	0,061	0,000	0,301	0,000	173	878	5,075	10,973		1,339
E41F	GAG	TTC										
E41Y	GAG	TAC										
E41R	GAG	CGT										
E94R	GAG	CGG	0,056	0,000	0,294	0,000	158	859	5,437	12,015		1,354
D100L	GAT	TTG	0,000	0,000	0,276	0,000	0	806	#DIV/O!	#DIV/O!		1,358
D100M	GAT	ATG	0,000	0,000	0,293	0,000	0	854	#DIV/O!	#DIV/O!		1,350
D100Y	GAT	TAT	0,044	0,000	0,359	0,000	124	1043	8,411	12,023		1,343
D100F	GAT	TTT	0,030	0,000	0,396	0,000	84	1150	13,690	17,307		1,338
D100W	GAT	TGG	0,034	0,000	0,270	0,000	97	792	8,165	21,728		1,226
A104L	GCT	CTT	0,069	0,000	0,318	0,000	195	926	4,749	9,388		1,273
D111R	GAT	AGG	0,096	0,000	0,374	0,000	268	1087	4,056	5,476		1,304
T112R	ACT	CGG	0,057	0,000	0,330	0,000	162	971	5,994	10,530		1,302
Y116W	TAT	TGG	0,086	0,000	0,428	0,000	245	1256	5,127	5,450		1,300
I117W	ATT	TGG	0,093	0,000	0,347	0,000	264	1018	3,856	6,288		1,288
P118W	CCT	TGG	0,051	0,000	0,292	0,000	143	851	5,951	14,102		1,376
E125K	GAA	AAG	0,067	0,000	0,301	0,000	189	875	4,630	9,938		1,352
D171V	GAT	GTG	0,052	0,000	0,338	0,000	145	986	6,800	12,003		1,430
D171E	GAT	GAG	0,074	0,000	0,317	0,000	209	927	4,435	8,391		1,463
M176W	ATG	TGG	0,021	0,000	0,359	0,000	59	1055	17,881	26,363		1,481
D230H	GAT	CAT	0,048	0,000	0,308	0,000	135	893	6,615	13,569		1,366
D230R	GAT	CGT	0,053	0,000	0,308	0,000	148	896	6,054	13,100		1,339

FIG. 10-1

D234W	GAT	TGG	0,045	0,000	0,302	0,000	127	881	6,937	14,552	1,382
D234V	GAT	GTG	0,051	0,000	0,312	0,000	145	915	6,310	13,574	1,349
D234G	GAT	GGT	0,057	0,000	0,297	0,000	162	873	5,389	12,230	1,377
D234R	GAT	CGG	0,043	0,000	0,310	0,000	120	897	7,475	16,582	1,344
D234K	GAT	AAG	0,045	0,000	0,280	0,000	126	809	6,421	15,011	1,336
Q265R	CAG	CGT	0,074	0,000	0,000	0,000	209	0	0,000	#DIV/0!	1,441
parental (SEQ ID NO:176)			0,072	0,000	0,278	0,000	205	816	3,980	9,948	1,338
parental (SEQ ID NO:176)			0,082	0,000	0,280	0,000	230	811	3,526	9,186	1,428
Control positivo (E41A)			0,021	0,000	0,340	0,000	59	985	16,690	28,320	1,470
Control negativo			0,119	0,450	0,357	0,643	338	1049	3,104	4,672	0,466
Control negativo			0,096	0,346	0,234	0,517	270	681	2,522	9,093	0,417

FIG. 10-2

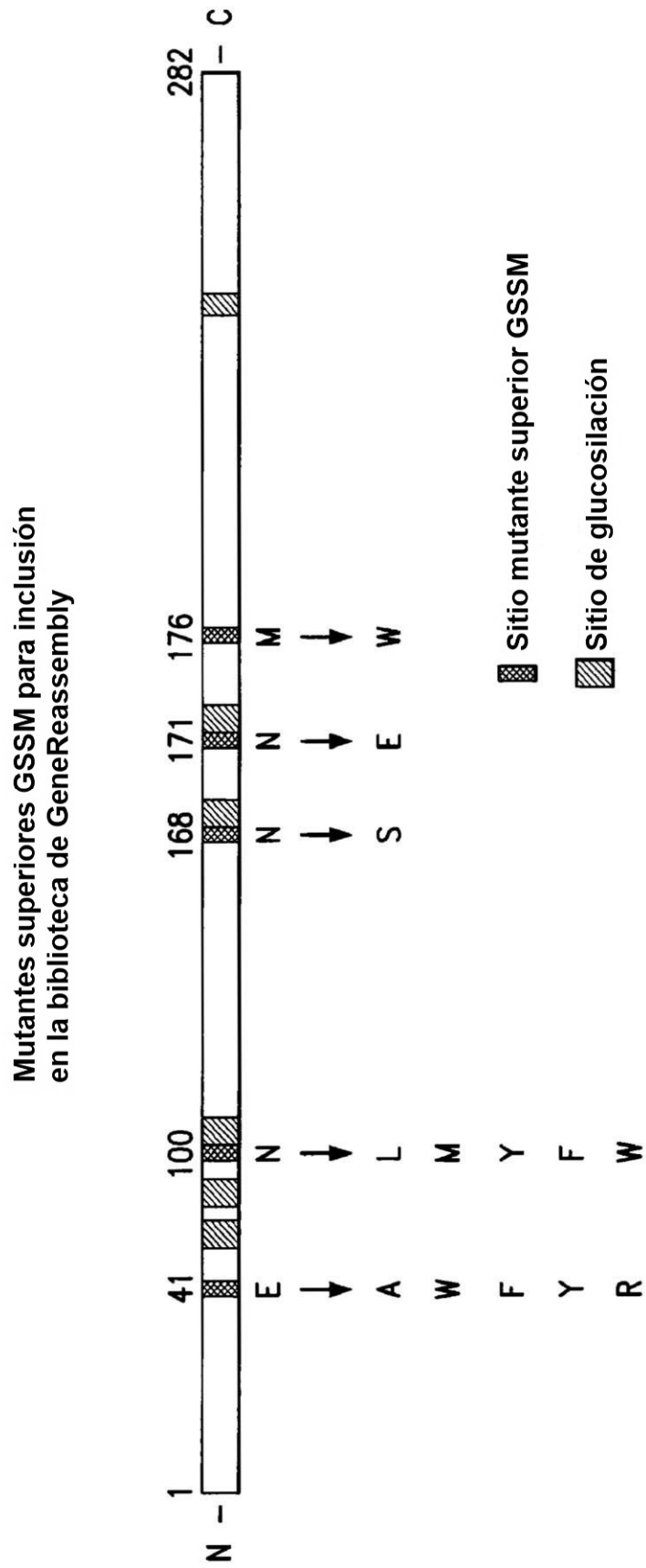


FIG. 11

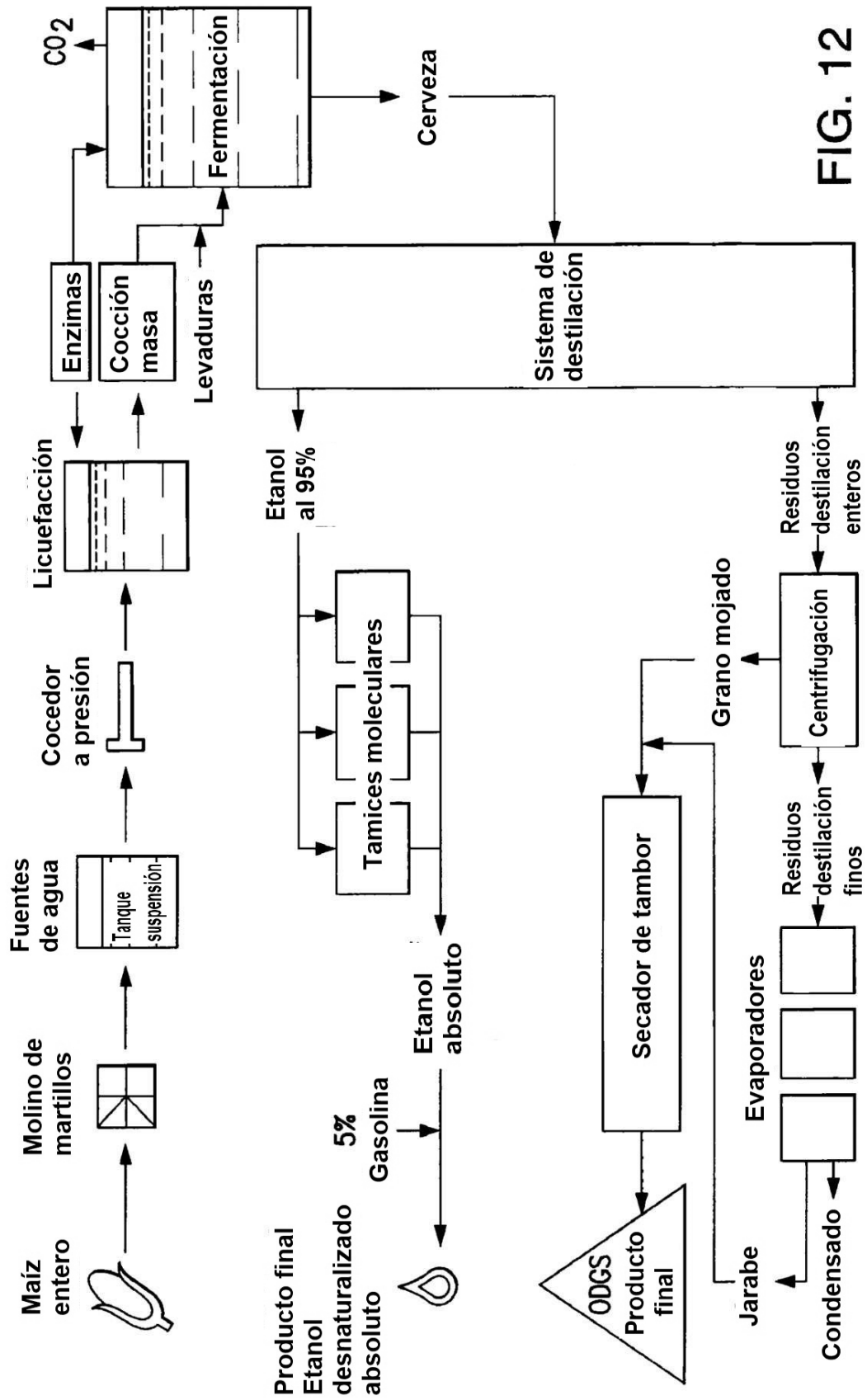


FIG. 12

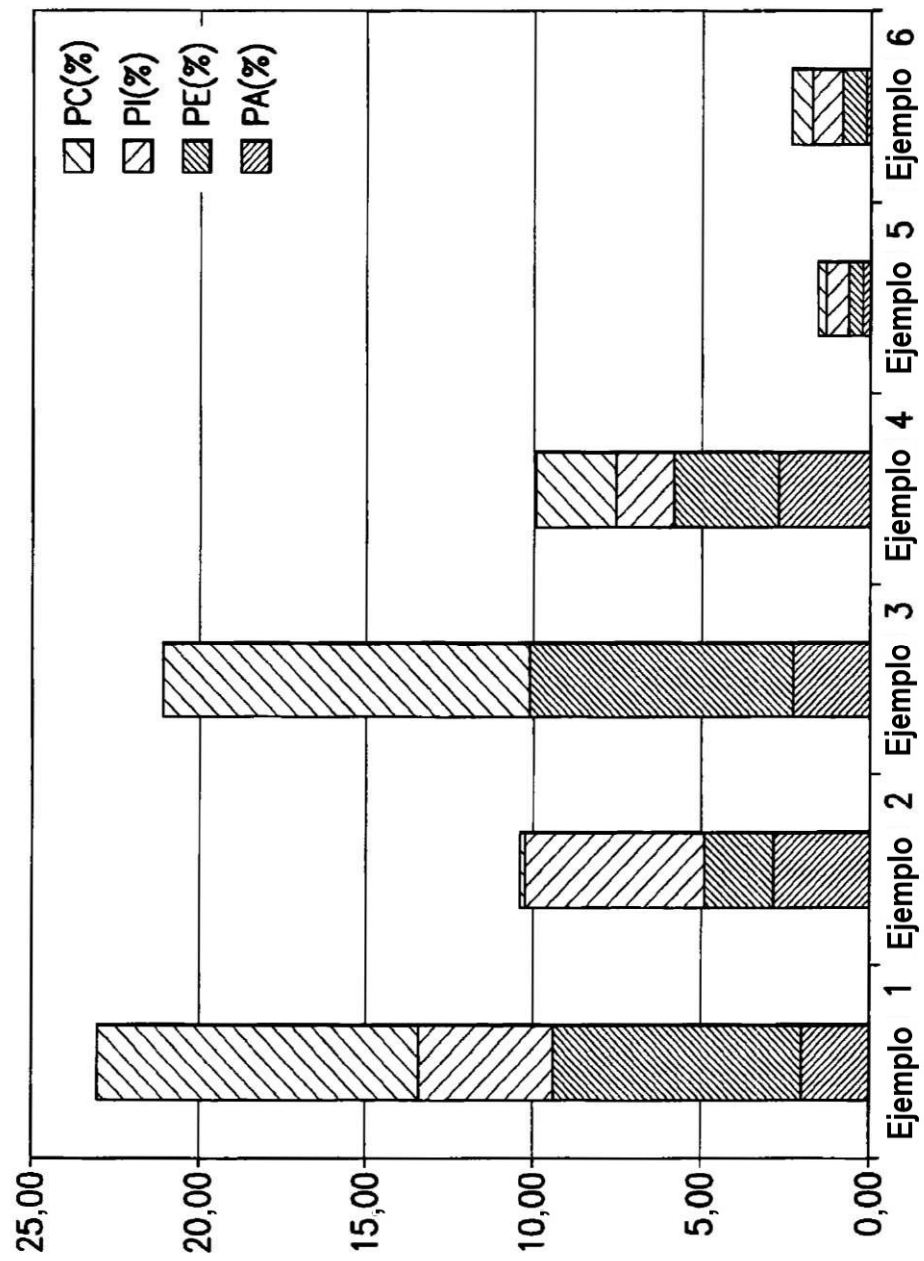
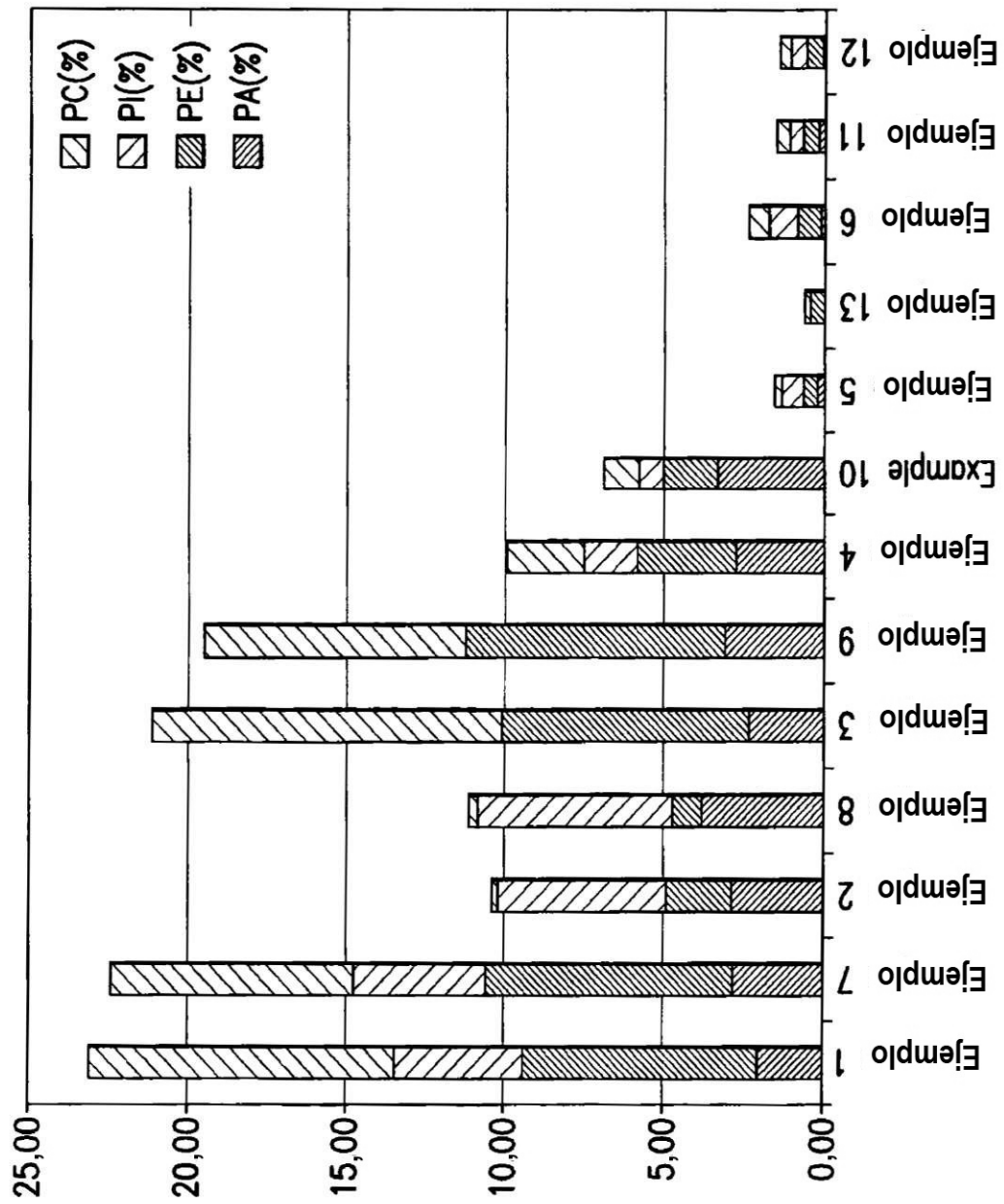
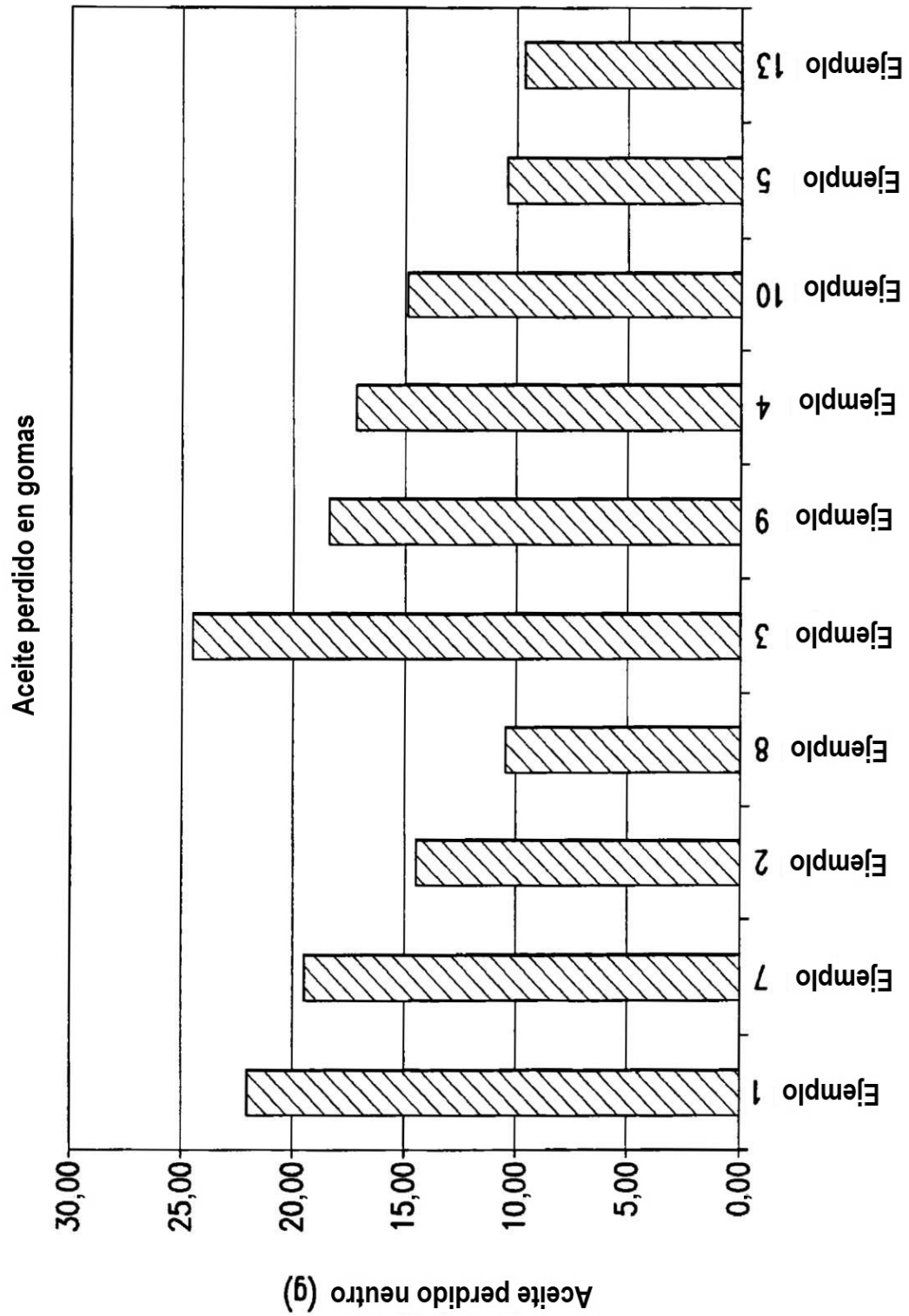


FIG. 13

FIG. 14





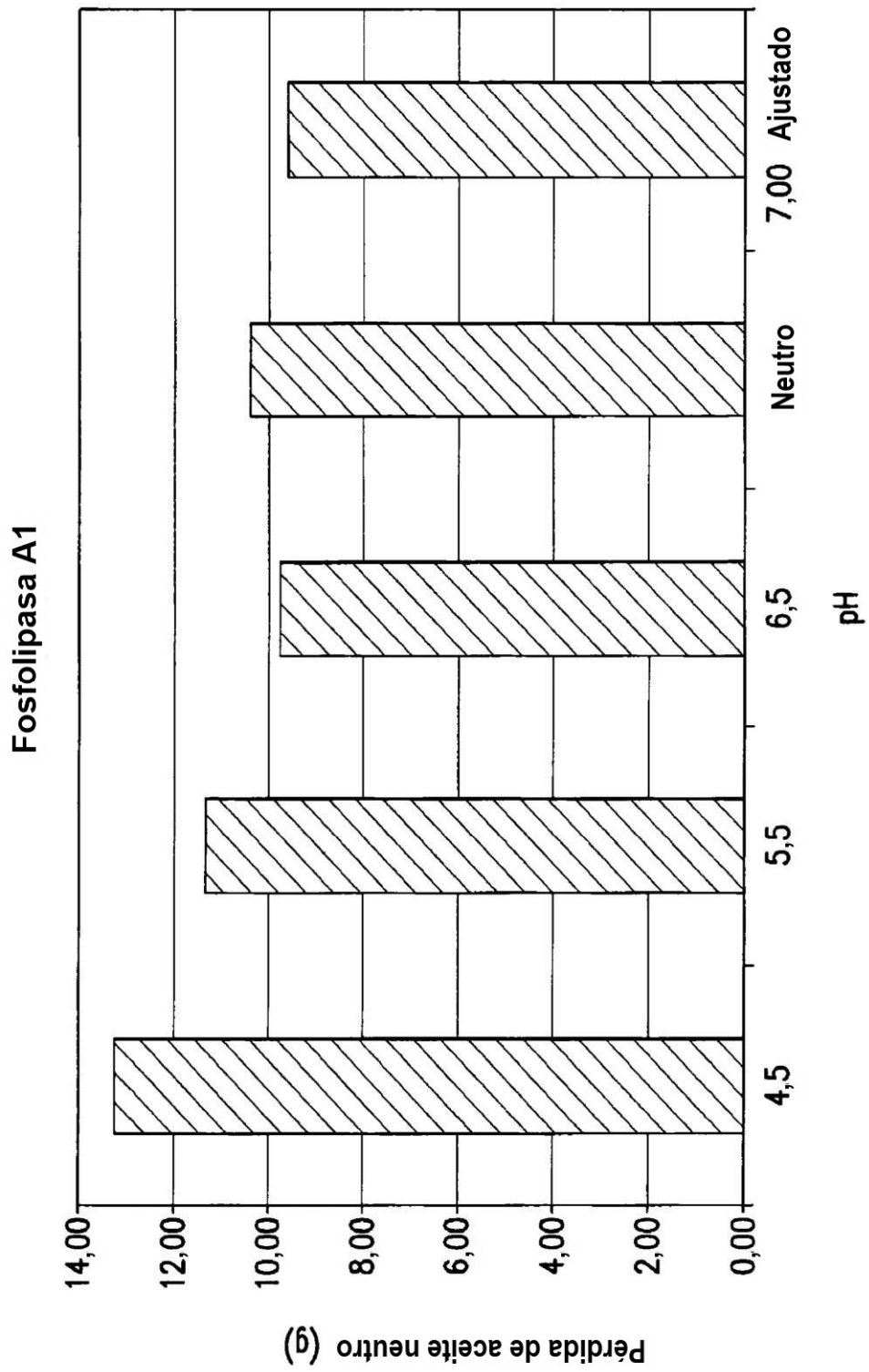
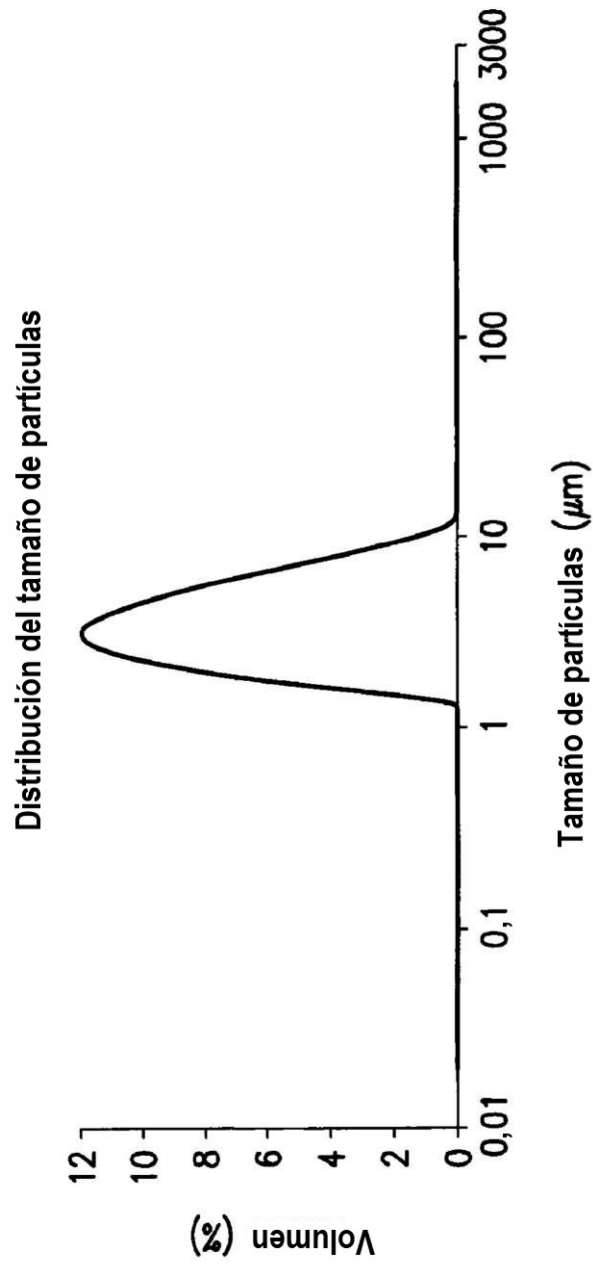
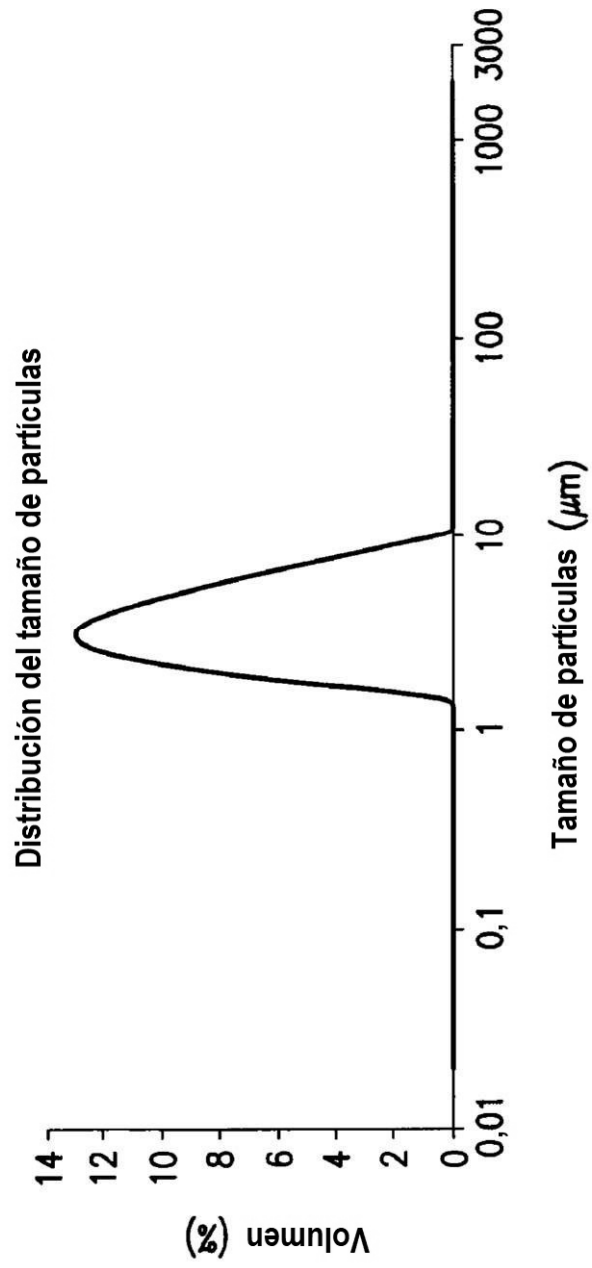


FIG. 16



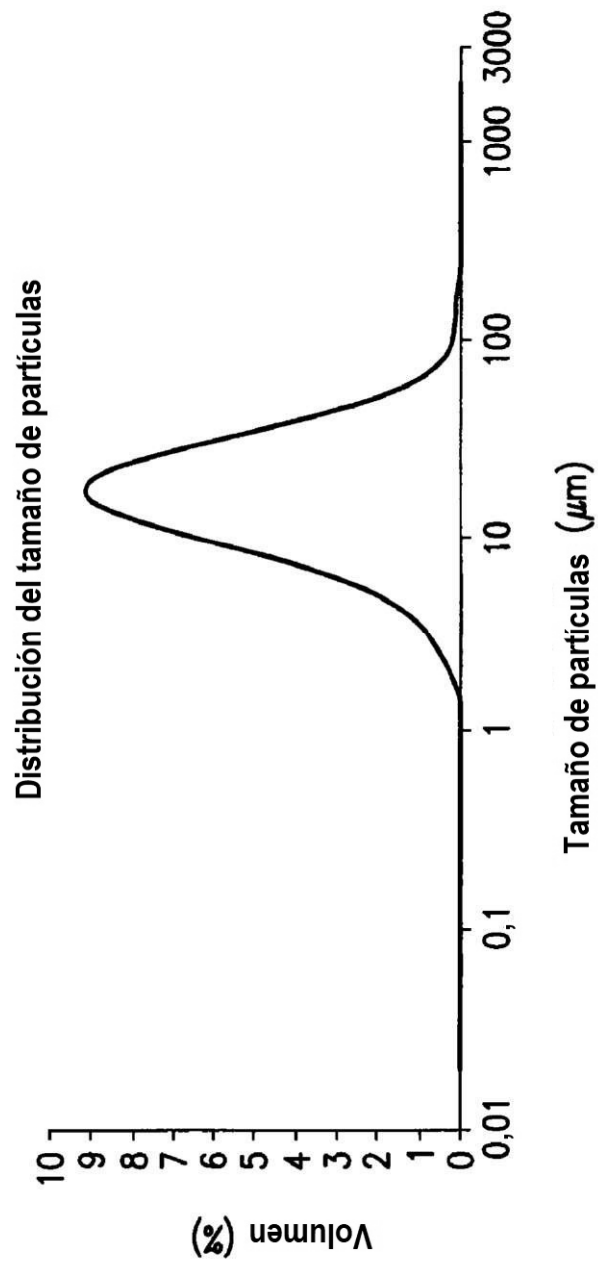
— Prueba4 reexp2, Lunes, 17 de Agosto, 2009 11:55:14 AM

FIG. 17



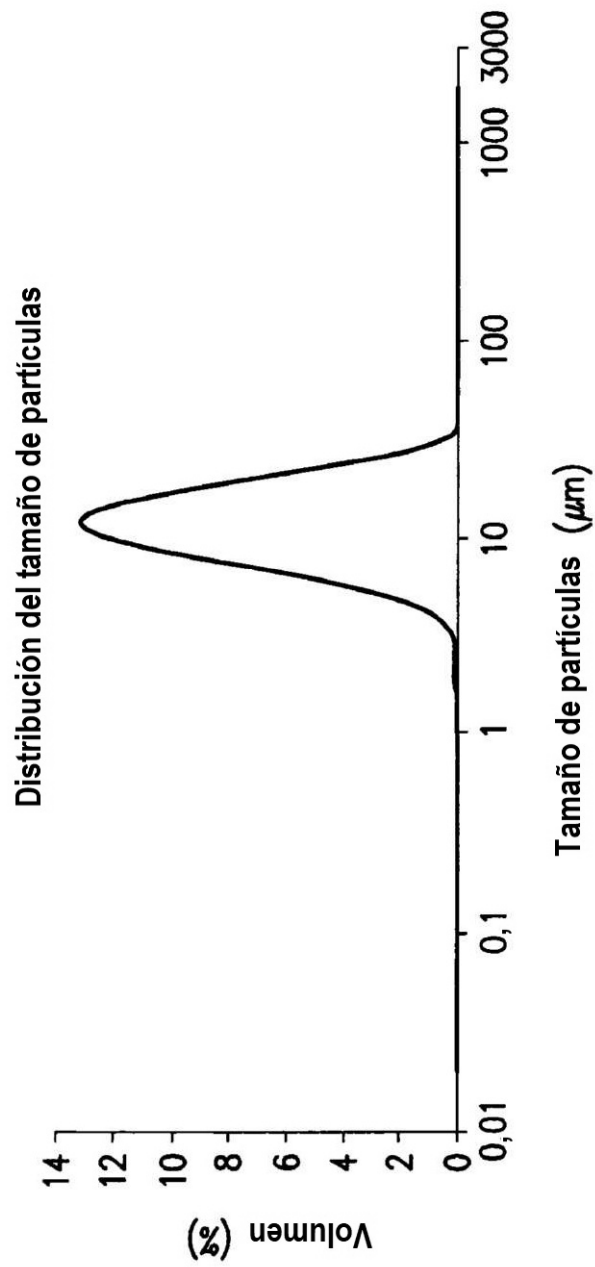
— Prueba5, Lunes, 17 de Agosto, 2009 1:14:14 PM

FIG. 18



— Emulsión prueba 2, Jueves, 13 de Agosto, 2009 4:26:10 PM

FIG. 19



— Mezcla con cizalladura en línea con PLA2 3, Lunes, 24 de Agosto, 2009 1:37:52 PM

FIG. 20

Distribución del tamaño de partículas

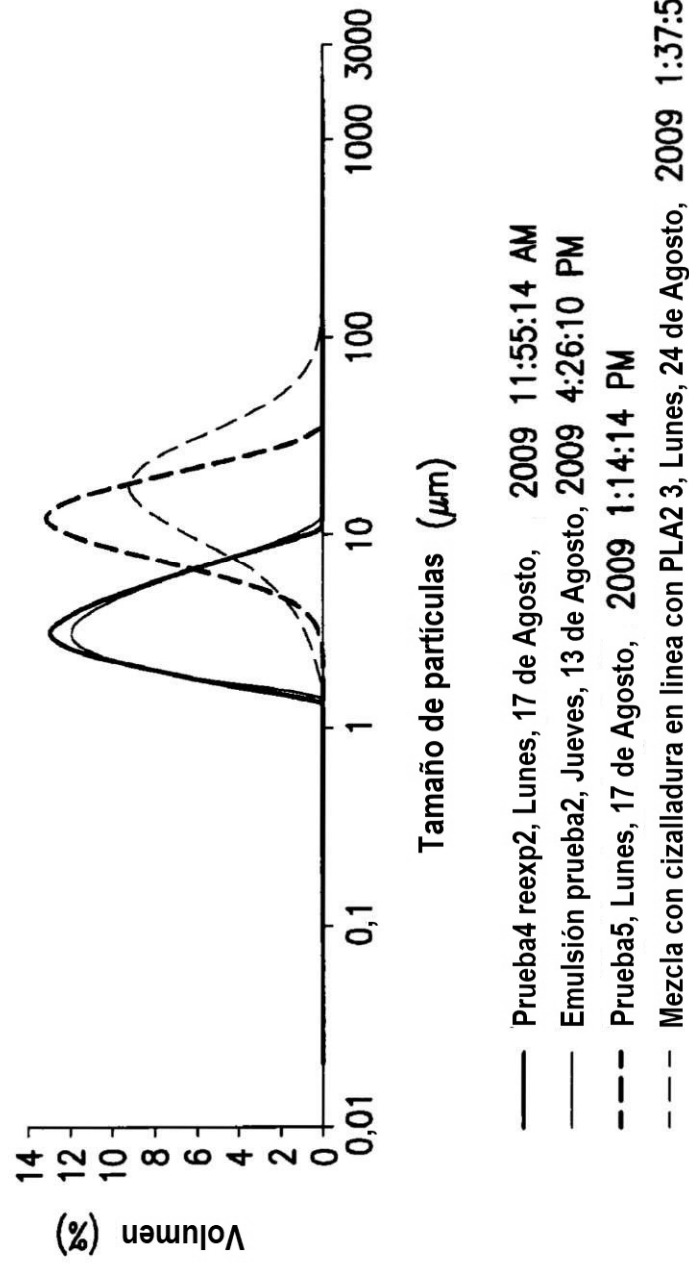


FIG. 21