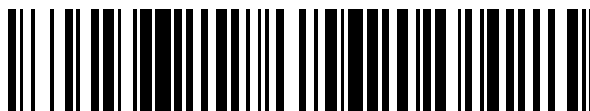


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 202**

51 Int. Cl.:

A23C 19/032 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.07.2018** **E 18185988 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019** **EP 3434108**

54 Título: **Lipasas a partir de basidiomicetos para el uso en la quesería**

30 Prioridad:

28.07.2017 EP 17183833

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

27.05.2020

73 Titular/es:

**OPTIFERM GMBH (100.0%)
Oberzollhauser Steige 4
87466 Oy-Mittelberg, DE**

72 Inventor/es:

**ZORN, HOLGER;
KREUTER, NADJA;
WEICHHARD, EDGAR;
FLEISCHNER, WILHELM y
MANHARD, JULIA**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 763 202 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

Lipasas a partir de basidiomicetos para el uso en la quesería

5 **[0001]** La presente invención se refiere a la producción de queso, p. ej. queso en salmuera como feta, en particular el uso de una lipasa derivada de un basidiomiceto para la producción de queso y procedimiento para la producción de queso, en los que una lipasa derivada de basidiomicetos actúa sobre un producto base de la producción de queso, p. ej. sobre leche de quesería o queso madurado. Por consiguiente también se pone a disposición un queso producido con el procedimiento según la invención que presenta un aroma característico. El objeto de la invención son además procedimientos para la producción de una lipasa derivada de un basidiomiceto a partir de un cultivo de basidiomicetos, así como lipasas correspondientes, p. ej. a partir de *Flammulina velutipes* o *Pleurotus citrinopileatus*.

[0002] En el estado de la técnica se usan lipasas en la producción de queso, dado que contribuyen a la generación de un aroma de queso típico. Las lipasas catalizan la ruptura de enlaces éster, como por ejemplo, la hidrólisis de triglicéridos formando glicerol y ácidos grasos libres, en donde ante todo los ácidos grasos liberados de cadena corta contribuyen directamente al aroma del queso. Mediante el uso de lipasas en la producción de queso se puede inducir la configuración del aroma típico para el queso correspondiente. Con esta finalidad se conocen el uso de lipasas de origen animal y el uso de lipasas de origen microbiano. A este respecto se diferencia el espectro de sustratos de distintas lipasas, de modo que el uso de diferentes lipasas conduce a la liberación de otros ácidos grasos y por consiguiente a un aroma diferente del queso.

[0003] Las lipasas animales se obtienen en el estado de la técnica, por ejemplo, a partir del tejido de glándulas del zona de boca y garganta de crías, como p. ej. terneros, corderos o cabritillos. El documento US 5320959 A (1994) describe un procedimiento para la extracción de lipasas de la zona de boca y garganta de crías. Un aroma típico para queso feta o queso similar se origina, por ejemplo, mediante la acción de una lipasa base lingual (también designada como lipasa de cabra), que puede liberar los ácidos carbónicos de ácido acético, ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico y ácido cáprico a partir de triglicéridos, sobre leche o productos base de la producción de queso.

[0004] Es desventajoso que el queso, que se produjo usando lipasas de origen animal, no es apropiado para personas que se alimentan de forma estrictamente vegetariana. Además, tampoco entra en consideración un queso, que se produjo usando lipasas animales, para miembros de creencias cuya alimentación está ligada con determinadas normas de alimentación, que se quieren alimentar, por ejemplo, kosher o halal. Para eludir esta problemática, algunos productores de quesos omiten desde hace algunos años la lipasa animal, lo que conduce a que algunos tipos de quesos han perdido su aroma característico.

[0005] Alternativamente a las lipasas animales, en el estado de la técnica se describe el uso de lipasas microbianas, por ejemplo, de mohos.

[0006] El documento US 3973042 A describe el uso de lipasas microbianas de mohos o de fuentes animales para la producción de queso azul. El documento US 4595594 A da a conocer un procedimiento para la producción de un producto de queso con sabor a queso intenso usando lipasas animales o microbianas. El documento EP 1535519 A describe el uso de lipasas, en particular lipasas de hongos, en sistemas de aromatización para la producción de queso, que posibilitan la producción de queso con el perfil de sabor deseado. El documento EP 0150743 B1 da a conocer una composición para la aceleración del proceso de maduración del queso usando lipasas. El documento EP 1085817 B1 describe un procedimiento para la producción de un aroma de queso usando lipasas. El documento US20110123674 describe la producción de composiciones con aroma de queso para la generación de un sabor de queso en alimentos.

[0007] El experto en la materia se enfrenta al problema de proporcionar procedimientos alternativos para la producción de queso con aroma característico, en el que se deben usar lipasas no animales, que permitan la producción de un queso vegetariano o adecuado kosher o halal. El objetivo se consigue mediante la presente invención, en particular mediante el objeto de las reivindicaciones.

[0008] Los inventores de la presente solicitud han descubierto que las lipasas derivadas de basidiomicetos, usadas en la producción de queso, generan un aroma como las lipasas animales, en particular, como las lipasas usadas de forma clásica en la producción de queso en salmuera, por ejemplo feta, p. ej. lipasa base lingual de cabra.

[0009] La presente invención posibilita por ello el uso de una lipasa derivada de un basidiomiceto para la producción de queso.

[0010] Ventajosamente los quesos, que se han producido usando esta lipasa, pueden ser quesos kosher o halal. Lo mismo es válido para el suero que se produce como subproducto en la producción de queso, que se puede utilizar como alimento o también, por ejemplo, como relleno para medicamentos en la industria farmacéutica.

[0011] La presente invención también permite por ello un procedimiento para la producción de productos de

suero, p. ej. suero, lactosa o proteínas de suero, como alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina o lactoferrina, que pueden ser vegetarianas, kosher y/o halal, en el que se usa una lipasa derivada de un basidiomiceto para la producción de queso y se separa el suero.

5 **[0012]** Igualmente, el objeto de la invención es un procedimiento para la producción de queso o productos de suero, que comprende la acción de una lipasa derivada de un basidiomiceto sobre un producto base de la producción de queso, preferiblemente sobre la leche.

[0013] El basidiomiceto, del que se deriva la lipasa, preferiblemente no es venenoso para las personas, p. ej. un hongo comestible. Al usar una lipasa a partir de basidiomicetos venenosos para las personas se debe prestar especial atención en la separación de los venenos de las lipasas durante el aislamiento de la lipasa. Alternativamente también se puede usar una lipasa producida genéticamente en otra célula huésped a partir de basidiomicetos venenosos. Ventajosamente el basidiomiceto es un hongo de la subsección Agaricomycotina, preferiblemente de la clase Agaricomycetes, preferiblemente de la subclase Agaricomycetidae, de forma especialmente preferida del orden Agaricales, p. ej. de las familias de la Physalacriaceae o Pleurotaceae.

[0014] Preferiblemente el basidiomiceto se puede cultivar en el cultivo sumergido. Igualmente es posible un cultivo emergido.

20 **[0015]** En una configuración especialmente ventajosa, el basidiomiceto está seleccionado del grupo que comprende *Flammulina* spp., *Pleurotus* spp., *Agrocybe* spp., *Armillaria* spp., *Auricularia* spp., *Clitocybe* spp., *Fistulina* spp., *Hericium* spp., *Hypholoma* spp., *Hypsizygus* spp., *Kuehneromyces* spp., *Laetiporus* spp., *Lactarius* spp., *Lentinula* spp., *Lentinus* spp., *Lycoperdon* spp., *Macrolepiota* spp., *Phallus* spp., *Piptoporus* spp., *Panellus* spp., o *Polyporus* spp., en particular *Flammulina velutipes*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Agrocybe aegerita*, *Armillaria bulbosa*,
25 *Armillaria gallica*, *Armillaria melea*, *Auricularia fuscusuccinea*, *Clitocybe geotropa*, *Fistulina hepatica*, *Hericium erinaceus*, *Hericium cirrhatum*, *Hericium coralloides*, *Hypholoma capnoides*, *Hypsizygus tessulatus*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Laetiporus sulphureus*, *Lactarius deliciosus*, *Lentinula edodes*, *Lentinus squarrolus*, *Lycoperdon pyriforme*, *Macrolepiota procera*, *Phallus impudicus*, *Piptoporus betulinus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus flabellatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Panellus serotinus*, o *Polyporus umbellatus*.

30 **[0016]** Preferiblemente el basidiomiceto es *Flammulina velutipes* o *Pleurotus citrinopileatus*, p. ej. *Flammulina velutipes* depositado bajo el número maestro DSM-1658 o *Pleurotus citrinopileatus* depositado bajo el número maestro DSM- 5341 en la empresa Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH. Las lipasas derivadas de estos basidiomicetos, ante todo de *Flammulina velutipes* condujeron a un aroma especialmente adecuado de un
35 queso producido así, y son apropiadas en particular para la producción de queso en salmuera, p. ej. feta.

[0017] En el marco de la invención no se usan los basidiomicetos vivos o muertos completos, sino que está aislada la lipasa usada. Preferiblemente la lipasa se aísla de un cultivo de basidiomicetos. En otra forma de realización, la lipasa se produce usando organismos modificados genéticamente, p. ej. levaduras o bacterias. Los organismos
40 modificados genéticamente para la producción de la lipasa pueden ser, por ejemplo, *S. cerevisiae*, *P. pastoris* o *E. coli*. Aislado significa que la lipasa está separada al menos de algunos otros componentes de las células en las que se produjo, opcionalmente de esencialmente todos los otros componentes. Aquí se describen procedimientos para el aislamiento o purificación.

45 **[0018]** Las lipasas se designan también como esterases debido a su capacidad para la ruptura de enlaces de triglicéridos. Los términos de lipasa y esterasa se usan aquí como sinónimos. El término “unos” o “uno” comprende en el marco de esta invención siempre uno o varios, siempre y cuando no se señale expresamente de otra manera, de modo que una lipasa en el sentido de esta invención comprende una o varias lipasas, p. ej. también una mezcla de distintos homólogos y/o derivados de esta lipasa o de distintas lipasas. En particular, las lipasas preferidas para la
50 producción de queso en salmuera son capaces de escindir a partir de triglicéridos con ácidos grasos correspondientes los ácidos grasos de ácido acético, ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico y ácido cáprico.

[0019] Preferiblemente el objeto de la invención es un procedimiento para la producción de queso. El queso también puede ser p. ej. un queso en salmuera, queso de pasta hilada, queso duro (también queso extraduro), queso
55 en lonchas, queso blando, o queso fresco, p. ej. feta, queso de montaña, gruyere, emmental, cheddar, appenzeller, comte, jurassic, sbrinz, tilsiter, raclette, gouda, edam, provolone, kaschkawal, romano, parmesano, grana padano, pecorino, manchego, graviera, kefalotir, un queso blando con maduración de moho o un queso blando con unto rojo, mozzarella, camembert, brie o queso fresco. Preferiblemente se trata de un queso madurado, es decir, p. ej. un quark o queso fresco, para permitir el desarrollo de un aroma claro. Se puede tratar de un queso cremoso, queso con toda
60 la grasa, queso con un cuarto de grasa o queso magro.

[0020] Preferiblemente el queso es un queso aromático. El tipo de queso, que se puede producir según la invención de forma especialmente ventajosa, es un queso en salmuera, como queso feta o un queso de tipo griego (esto se utiliza aquí independientemente del origen geográfico), queso de pastor, queso de los Balcanes, queso en
65 salmuera búlgaro (p. ej. queso sirene o schipka), beyaz peynir, valbreseo. La idoneidad especial de las lipasas de

Pleurotus citrinopileatus o *Flammulina velutipes* para la producción de quesos de este tipo se describe en la parte de ejemplos.

- [0021]** También se pueden producir ventajosamente otros quesos aromáticos con estas lipasas o lipasas con características similares, en particular perfil de sustrato similar, p. ej. provolone, kaschkawal, romano, pressato, parmesano, grana padano, pecorino, rigatino, crotonese, canestrato, fiore sardo, mozzarella, manchego, queso de montaña, gruyere, emmental, cheddar, appenzeller, comte, jurassic, sbrinz, tilsiter. También se pueden producir ventajosamente otros quesos - según el aroma deseado - con otras lipasas de basidiomicetos.
- 10 **[0022]** En una configuración ventajosa, la producción de queso según la invención comprende la puesta en contacto de la lipasa derivada de un basidiomiceto con un producto base de la fabricación de queso, p. ej. leche. El procedimiento puede comprender las etapas siguientes:
- 15 a) facilitación de un producto base de queso que comprende leche de quesería,
b) coagulación del producto base de queso, en donde se origina gelatina (también designada como cuajada),
c) corte de la gelatina,
d) moldeado,
e) salazón, y
f) maduración,
- 20 donde un producto base de la producción de queso entra en contacto con una lipasa derivada de un basidiomiceto, lo que se realiza en una de las etapas a, b, c o d, pero preferiblemente se realiza en la etapa a o b, la mayoría de las veces preferiblemente en la etapa b.
- 25 **[0023]** El producto base del queso en la etapa a comprende leche de quesería, p. ej. leche de vaca, leche de oveja, leche de cabra, leche de búfala o un producto vegetal sustituto de la leche, p. ej. leche de soja, leche de avena, leche de arroz, leche de espelta, leche de nueces o leche de almendras, leche de cáscara de psilio, que también se designa aquí como leche. Más frecuentemente el queso se produce usando leche de vaca. El queso en salmuera se produce p. ej. con frecuencia a partir de leche de vaca, leche de cabra o leche de oveja. El queso en salmuera vegano
- 30 también se puede producir p. ej. a base de leche de soja.
- [0024]** La leche puede ser leche cruda o leche pasteurizada. Habitualmente la leche se centrifuga o separa, preferentemente también homogeneiza, para ofrecer p. ej. a las lipasas una superficie de ataque más elevada para la lipólisis. También puede tener lugar una pasteurización, a menos que se quiera producir queso de leche cruda. Para
- 35 obtener el contenido de grasa deseado del queso, la leche se desnata la mayoría de las veces y a continuación se ajusta p. ej. con nata a un contenido de grasa definido.
- [0025]** El producto base de queso se puede ajustar a un contenido de grasa de aprox. 1,7 - 10%, preferiblemente 3 - 8,5% (v/v), p. ej. de 3,2 - 3,6% en sbrinz, 3,4 - 3,7% en provolone, 3,3-4,5% o 3,5-4,2% en queso
- 40 en salmuera, donde el contenido de grasa se debe adaptar correspondientemente al nivel de contenido de grasa requerido (grasa en masa seca) del producto final de queso. Al producto base de queso se le puede añadir calcio, p. ej. en forma de cloruro de calcio, durante la facilitación o también posteriormente en la etapa b.
- [0026]** Antes de la coagulación, en la etapa b se pone en contacto habitualmente (p. ej. para queso en salmuera,
- 45 queso de pasta hilada, queso duro (también queso extra-duro), queso en lonchas, queso en lonchas semiblando, queso semiduro, queso blando) el producto base de queso con ayuda de cultivos de fermentos, que comprenden bacterias de ácido láctico (p. ej. *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactococcus* sp.), y se madura previamente y a continuación se cuaja opcionalmente de forma enzimática, p. ej. con cuajo.
- 50 **[0027]** Como cultivos de fermentos se pueden usar p. ej. cultivos de fermentos directos mesófilos y/o termófilos, por ejemplo, Lyofast M 036 L (Sacco Srl.).
- [0028]** Se puede usar cuajo animal, p. ej. cuajo de estómago de ternero, no obstante, preferiblemente para la producción de un producto vegetariano, kosher o halal se usa un sustituto de cuajo. A este respecto se trata de un
- 55 cuajo microbiano y/o producido biotecnológicamente, p. ej. con la ayuda de mohos como cuajo producido de *Mucor mihei* o *Aspergillus niger*. Preferiblemente el cuajo es una enzima de cuajo producida de forma microbiana, así denominado microcuajo, p. ej. opti-lase (optiferm GmbH).
- [0029]** También se pueden usar enzimas vegetales, p. ej. de *Cynara cardunculus*. Para la coagulación se
- 60 calienta habitualmente el producto base de queso, p. ej. a 27°-45°, p. ej. a 36-38°C con provolone, p. ej. a 31-32° con kaschkawal, p. ej. a 32-34°C con queso en salmuera o por ejemplo 33°C.
- [0030]** En el caso de quesos madurados, p. ej. quark, queso fresco, queso en salmuera solo se agregan bacterias de ácido láctico, sin cuajo o solo una pequeña cantidad de cuajo para la mejora de la coagulación de los
- 65 ácidos.

- 5 **[0031]** Preferiblemente la lipasa derivada de un basidiomiceto se añade p. ej. para la producción de queso en salmuera, el producto base de queso simultáneamente con el cultivo de fermentos y opcionalmente calcio. Pero también es posible mezclar el producto base de leche ya anteriormente o posteriormente (p. ej. adición de cuajo) con las lipasas.
- 10 **[0032]** La lipasa se puede añadir en el uso según la invención o en el procedimiento según la invención con una concentración final de 70-285 U/L referido al caprilato en 3 l de producto base de queso, p. ej. leche de quesería. De forma especialmente preferida la lipasa se añade con una concentración de 100-200 U/L o 150-170 U/L.
- 15 **[0033]** La coagulación puede durar aprox. 25 - 75 min, preferiblemente aprox. 30 - 45 min.
- [0034]** Una maduración previa se puede realizar, p. ej. después de la mezcla de la leche ajustada a a aprox. 4,2% de grasa con el cultivo de fermentos, cloruro de calcio y la lipasa durante aprox. 30-60 min, p. ej. 45-50 min o por ejemplo 45 min. Tras la adición de cuajo (p. ej. opti-lase, optiferm GmbH) se realiza la coagulación durante los siguientes 15-20 min, aprox. 16 min. Después de otro espesamiento de aprox. 30-60 min, p. ej. 45-50 min o por ejemplo 45 min, la cuajada ha alcanzado la resistencia deseada p. ej. para la producción de queso en salmuera.
- 20 **[0035]** Si la leche coagulada tiene la consistencia deseada, entonces se corta en la etapa c, p. ej. con un arpa para queso. El producto del corte se designa como requesón. Cuanto más fina se tritura el requesón, tanto más suero se deposita y tanto más duro se vuelve el queso terminado. Para queso en salmuera se corta el requesón en aprox. trozos del tamaño de una avellana.
- 25 **[0036]** Opcionalmente el requesón se puede quemar.
- [0037]** El moldeado en la etapa d puede comprender p. ej. estiraje y relleno en moldes, así como volteo (p. ej. 2-10 veces, p. ej. aprox. 4 veces). Gracias al escurrido, prensado y/o volteo se puede separar suero adicional del taco de queso.
- 30 **[0038]** La salazón como etapa d se realiza durante la producción de todos los tipos de queso, excepto en el queso fresco, y puede tener lugar mediante salazón en seco o preferiblemente mediante baño en salmuera. El contenido de sal de la salmuera es según el tipo de queso 15 - 25% (m/v), preferiblemente 18 - 22% (m/v). Para la producción de queso en salmuera se puede realizar un baño de sal de aprox. 60 min a 15 °C y un contenido de sal de aprox. 20%, donde el pH del baño de sal se corresponde idealmente con el pH de la pasta de queso fermentada al
- 35 comienzo de la salazón, p. ej. pH 5,2.
- [0039]** Como etapa e se realiza la maduración del queso, que se requiere para todo queso a excepción del queso fresco. Una maduración de días, semanas o meses es importante para el alcance del estado de consumo y el desarrollo del aroma típico del tipo. A este respecto, los procesos de metabolismo de microorganismos desempeñan un papel importante, pero en el marco de la invención también la ruptura de triglicéridos mediante las lipasas según la invención. Durante el madurado los quesos enteros opcionalmente se voltean, cubren, cepillan, se tratan con moho o unto rojo o se cubren de hierbas. La maduración puede durar entre dos semanas o hasta varios años. Preferiblemente la maduración se realiza con humedad del aire elevada (p. ej. 70-95%) y temperatura esencialmente constante, preferiblemente con temperaturas por debajo de 20 °C, p. ej. 10-15 °C. Las condiciones ambientales en el almacén de
- 45 maduración varían en función del tipo de queso respectivo, del tiempo de maduración y tratamiento del queso.
- [0040]** Para la producción de queso en salmuera, el queso se deja escurrir habitualmente después del baño de sal (p. ej. durante aprox. 24 h), y luego se deja madurar sin aire, p. ej. plastificado en una lámina. A este respecto, se puede realizar una maduración durante aprox. 20-60 días preferiblemente a temperaturas por debajo de la temperatura ambiente (20 °C), p. ej. a 10-15 °C, p. ej. 25-40 días o aprox. 30 días a 10-15 °C. Es posible un almacenamiento adicional, preferiblemente a aprox. 4-15 °C o 4-8 °C.
- [0041]** La producción también puede comprender distintos procedimientos para la protección de la superficie, p. ej. el desarrollo de una corteza de queso, aplicación de una capa protectora de revestimiento de queso, cera o parafina y/o el envasado en una lámina. El queso, también queso en salmuera, también se puede introducir o envasar p. ej. en aceite, p. ej. aceite de oliva, eventualmente con especias.
- 55 **[0042]** Es especialmente ventajoso en el uso según la invención o el procedimiento según la invención que la lipasa genere un aroma durante la producción del queso, donde el aroma está caracterizado preferiblemente por la presencia de ácidos grasos libres de ácido caproico (ácido n-hexanoico), ácido caprílico (ácido n-octanoico) y ácido cáprico (ácido n-decanoico), así como ácido acético y ácido butírico (ácido n-butanoico). Los ácidos carboxílicos, como ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico se destacan por un olor tipo macho cabrío y por ello son especialmente apropiados para la producción de aromas fuerte, picante, como se desea, por ejemplo, para el queso en salmuera, como feta, queso de montaña, provolone, parmesano y quesos aromáticos similares.
- 60

[0043] Un objeto de la invención también es un procedimiento para la producción de una lipasa según la invención, derivada de un basidiomiceto a partir de un cultivo de basidiomicetos, que comprende cultivo de un basidiomiceto en un medio (preferiblemente medio de peptona y extracto de malta), que comprende un inductor para el aumento de la secreción de lipasas, y aislamiento del sobrenadante de cultivo que comprende las lipasas, así como purificación de la lipasa. Preferiblemente el procedimiento comprende las etapas siguientes:

- a) cultivo de un basidiomiceto en un medio (preferiblemente medio de peptona y extracto de malta), que comprende un inductor para el aumento de la secreción de lipasas,
- b) aislamiento del sobrenadante de cultivo que comprende las lipasas,
- c) precipitación de proteínas,
- d) concentración, y
- e) purificación de la lipasa.

[0044] Las etapas c-e se pueden realizar en este caso en cualquier orden o simultáneamente. Preferiblemente las etapas se realizan en el orden descrito a)-e).

[0045] El cultivo del basidiomiceto se puede realizar en un medio apropiado, p. ej. medio de peptona y extracto de malta, solución nutriente estándar (SNL) o medio de glucosa y patata. Preferiblemente el cultivo se realiza en el medio de peptona y extracto de malta. El cultivo se puede realizar p. ej. en un agitador (p.ej. 150 rpm), con privación de luz a aprox. 20-30 °C, preferiblemente aprox. 24-25 °C. Un período apropiado puede ser p. ej. 10-30 días o 20-21 días. Es posible un cultivo previo sin adición del inductor.

[0046] El inductor para el aumento de la secreción de lipasas comprende triglicéridos, preferiblemente de productos lácteos, o triglicéridos, que también aparecen en los productos lácteos. Como inductor se pueden usar p. ej. mantequilla clarificada, mantequilla o grasa de quark, preferiblemente grasa de quark y mantequilla clarificada, en particular grasa de quark.

[0047] El aislamiento del sobrenadante de cultivo que comprende las lipasas se puede realizar p. ej. tras la sedimentación o centrifugación o mediante filtrado.

[0048] Según la invención, la precipitación de proteínas puede ser una precipitación con sulfato de amonio o etanol, preferiblemente una precipitación con sulfato de amonio. Se puede precipitar p. ej. con 60 o 70% de sulfato de amonio, donde la proteína precipitada se sigue reacondicionando. Opcionalmente se realiza una precipitación fraccionada.

[0049] Una concentración, retamponaje o desalado se puede realizar p. ej. mediante centrifugación con un filtro, p. ej. con un tamaño de exclusión (MWCO; molecular weight cut-off) de 10-30 kDa, preferiblemente 10 kDa, p. ej. por medio de filtro Vivaflow. Por ejemplo, se puede realizar una separación de componentes, que tienen un tamaño mayor de 300 kDa, mediante una primera filtración con un filtro con MWCO de 300 kDa, seguido por una o varias etapas de filtración con filtro con MWCO más pequeño para la concentración, por ejemplo, 100, 50, 30, 10 kDa. De forma especialmente preferida, la última etapa de filtración tiene lugar con un filtro con un MWCO de 10 kDa.

[0050] En un procedimiento según la invención, la purificación o aislamiento puede comprender varias etapas, preferiblemente al menos dos (p. ej. tres o cuatro o cinco).

[0051] Una etapa preferida es una cromatografía de intercambio iónico (IEX), p. ej. cromatografía de intercambio aniónico (AEX) o cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y/o cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). Esta etapa se puede realizar p. ej. por FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*), por ejemplo, con una matriz de dietilaminoetil, p. ej. con una columna de flujo rápido de sefrosa DEAE (DEAE-FF). También se pueden realizar varias cromatografías de intercambio iónico.

[0052] Otra etapa preferida del aislamiento puede ser p. ej. La cromatografía por exclusión de tamaño, p. ej. como segunda etapa después de una cromatografía de intercambio iónico.

[0053] Preferiblemente, el procedimiento según la invención para la producción de una lipasa derivada de un basidiomiceto comprende el cultivo del basidiomiceto (p. ej. *Pleurotus citrinopileatus* o *Flammulina velutipes*), aislamiento del sobrenadante del cultivo, una precipitación de proteínas, p. ej. con sulfato de amonio, concentración IEX (preferiblemente AEX) y SEC, opcionalmente una cromatografía de interacción hidrófoba (HIC). El orden de las etapas también se puede modificar.

[0054] Ventajosamente, en los procedimiento de purificación según la invención se seleccionan respectivamente las fracciones con elevada actividad de la esterasa / lipasa. La actividad de la esterasa / lipasa de las lipasas según la invención se puede determinar en los análisis de esterases / lipasas conocidos en el estado de la técnica, p. ej. con el análisis de esterases según Purdy y Kolattukudy, 1973 (Purdy und Kolattukudy 1973), o en el análisis de lipasas Winkler y Stuckmann, 1979, preferiblemente según Purdy y Kolattukudy. Las actividades de la

esterasa / lipasa preferidas de fracciones seleccionadas son, por ejemplo, al menos 70 U/L, al menos 200 U/L, al menos 300 U/L, al menos 400 U/L o al menos 500 U/L.

[0055] En una forma de realización especialmente preferida, las lipasas contienen tras la realización de las etapas de purificación del procedimiento según la invención una actividad de la peptidasa reducida respecto al sobrenadante del cultivo en relación a la actividad de la esterasa / lipasa, preferiblemente ninguna actividad de la peptidasa significativa, es decir, lo que se consigue p. ej. en tanto que se seleccionan procedimiento de purificación que separan entre sí las lipasas y peptidasas. Se pueden rechazar p. ej. fracciones con actividad de la peptidasa. De este modo se puede evitar un sabor erróneo amargo y jabonoso, debido eventualmente a las peptidasas presentes.

La actividad de la peptidasa se puede testear por medio de la azocaseína (Kilcawley et al. 2002)

[0056] En una forma de realización, la invención pone a disposición un procedimiento para la producción de queso, en el que según el procedimiento según la invención aquí descrito se produce una lipasa derivada de un basidiomiceto y entonces esta lipasa se usa en un procedimiento según la invención para la producción de queso.

[0057] Otro objeto de la invención es una lipasa derivada de un basidiomiceto, según la invención, preferiblemente de uno basidiomiceto aquí descrito, p. ej. *Pleurotus citrinopileatus* o *Flammulina velutipes*, que es capaz preferiblemente de liberar uno o varios ácidos grasos libres del grupo que se compone de ácido acético, ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico y ácido cáprico a partir de triglicéridos. Las lipasas de este tipo se pueden obtener p. ej. por un procedimiento según la invención.

[0058] En una forma de realización, la lipasa se deriva de un basidiomiceto, p. ej. a partir de *Flammulina velutipes*. En el estado de la técnica se conoce una secuencia de péptidos de una *Putative carotinoid ester lipase* (Número de acceso según Uniprot G8A515 a partir de *Flammulina velutipes*, que comprende 725 aminoácidos (SEQ ID NO: 1), peso molecular 79 kDa. En el estado de la técnica no se conocía ninguna función de la proteína.

[0059] En una forma de realización, la lipasa según la invención *Flammulina velutipes* presenta 250-725 aminoácidos. Opcionalmente tiene menos de 725 aminoácidos, en particular menos de 500 aminoácidos.

[0060] En el análisis de las fracciones activas en el análisis de lipasas a partir de la *Flammulina velutipes* con SDS-PAGE seminataiva con coloración de esterasa se encontró que las proteínas más activas se pudieron comprobar en el caso de aprox. 30-40 kDa. Se encontraron otras proteínas activas en el caso de aprox. 60-70 kDa.

[0061] En una forma de realización, la lipasa según la invención a partir de *Flammulina velutipes* tiene por ello un peso molecular de menos de 79 kDa, en particular 25-45 kDa, preferiblemente de 30-40 kDa, de forma especialmente preferida de 32-38 kDa. En otra forma de realización, el peso molecular es aprox. 60-70 kDa. También puede estar presente una composición con una mezcla de distintas formas. En una forma de realización preferida, las lipasas en una mezcla semejante de más del 50%, preferiblemente más del 80% tienen un peso molecular de aprox. 25-45 kDa.

[0062] En la secuenciación se encontraron fragmentos de la lipasa de aprox. 80-420 posiciones de aminoácidos de la arriba mencionada *Putative carotinoid ester lipase*. En una forma de realización, la lipasa comprende una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90% o al menos 95%, p. ej. 100% con una secuencia de SEQ ID NO:2, donde la lipasa está derivada de un basidiomiceto, p. ej. a partir de *Flammulina velutipes*. De forma especialmente preferida la lipasa no presenta el 90% de la secuencia de SEQ ID NO: 1 o más, en particular no la secuencia completa de SEQ ID NO: 1.

[0063] No obstante, también se puede usar una lipasa que comprenda una secuencia de aminoácidos que presenta una identidad de al menos el 80%, preferiblemente al menos 85%, al menos 90% o al menos 95%, o 100% con una secuencia de SEQ ID NO:1, para la producción de queso (preferiblemente queso en salmuera u otro queso aromático), p. ej. con el procedimiento según la invención, donde la lipasa está derivada de un basidiomiceto, p. ej. a partir de *Flammulina velutipes*.

[0064] Después de la secuenciación del ADN genómico de partidores derivados de *Flammulina velutipes* de fragmentos aislados se encontró una secuencia diferente de la SEQ ID NO: 1, concretamente SEQ ID NO: 14. En una forma de realización, la invención proporciona por consiguiente una lipasa, que presenta una identidad de secuencia al menos del 98%, preferiblemente al menos 99%, al menos 99,5% o 100% con la SEQ ID NO: 14 o comprende secuencias correspondientes. Alternativamente se puede usar una lipasa que es un fragmento de proteína con al menos 30 kDa de tamaño, que presenta una identidad de secuencia de al menos el 98%, preferiblemente al menos 99%, al menos 99,5 % o 100% con la SEQ ID NO: 14. Preferiblemente el fragmento presenta una identidad de al menos el 80% con una secuencia de SEQ ID NO:2.

[0065] En una forma de realización, una lipasa según la invención presenta una identidad de secuencia de al menos el 99,5% respecto a la SEQ ID NO: 17, preferiblemente comprende la SEQ ID NO: 17. La SEQ ID NO: 17 es un fragmento de la SEQ ID NO: 14, que presenta respecto a la SEQ ID NO: 2 dos sustituciones de aminoácidos.

Evidentemente una lipasa semejante también puede ser más larga de forma terminal N o C respecto a la SEQ ID NO: 17, no obstante se asume que no es necesario todo el término C de la SEQ ID NO: 14 para la función de la proteína.

[0066] Un fragmento de lipasa según la invención se puede expresar opcionalmente como proteína de fusión, p. ej. con una secuencia de aminoácidos que facilita la purificación, como una His-Tag (etiqueta de poli-histadina).

[0067] Una lipasa según la invención con SEQ ID NO: 14 se puede codificar por el ADN genómico con SEQ ID NO: 15 o ADNc con SEQ ID NO: 16. Una ADNc con codones optimizados para la expresión de un organismo huésped, que está codificado para una lipasa con SEQ ID NO: 14, es objeto de la invención. Igualmente se proporciona un ácido nucleico, p. ej. un vector de expresión, que codifica para una lipasa con identidad de secuencia de al menos el 99,5% a la SEQ ID NO: 17, preferiblemente para una lipasa con SEQ ID NO: 17.

[0068] Además, se proporciona un vector de expresión que codifica para una lipasa, que presenta una identidad de secuencia al menos del 98%, preferiblemente al menos 99%, al menos 99,5% o 100% con SEQ ID NO: 14 o comprende secuencias correspondientes, o es un fragmento de esta proteína, donde el fragmento presenta preferiblemente una identidad de al menos el 80% con una secuencia de SEQ ID NO: 2. Un vector de expresión semejante puede comprender p. ej. el ADNc según la SEQ ID NO: 16 o comprende un fragmento de ella.

[0069] El concepto de que la lipasa está derivada de un basidiomiceto no excluye mutaciones, es decir, se puede tratar de homólogos de la lipasa con SEQ ID NO: 1 de otros basidiomicetos (p. ej. *Flammulina spp.*), eventualmente con forma mutada, o formas mutadas de la lipasa a partir de *Flammulina velutipes*, p. ej. con uno, dos o tres intercambios de aminoácidos, preferiblemente fuera de la zona de la SEQ ID NO: 2.

[0070] La lipasa según la invención está acoplada opcionalmente, pero preferiblemente luego cuando la lipasa presenta la SEQ ID NO: 1, a una secuencia de aminoácidos, que facilita la purificación, p. ej. una His-Tag. Adicional o alternativamente se proporcionó la lipasa según la invención en organismos modificados genéticamente, de modo que puede presentar otro patrón de glicosilación que en la purificación de un basidiomiceto.

[0071] Una lipasa según la invención puede presentar el óptimo de temperatura y pH representado en la fig. 10.

[0072] En una forma de realización, la lipasa está derivada de un *Pleurotus citrinopileatus*. En el análisis de las fracciones activos en el análisis de lipasas a partir de este basidiomiceto con SDS-PAGE seminativa con coloración de esterasa se encontró que las proteínas más activas se pudieron comprobar en el caso de aprox. 30-40 kDa. Se encontraron otras proteínas activas en el caso de aprox. 80-95 kDa.

[0073] Preferiblemente la lipasa según la invención a partir de *Pleurotus citrinopileatus* tiene por ello un peso molecular de 25-45 kDa, preferiblemente de 30-40 kDa, de forma especialmente preferida de 32-38 kDa. En otra forma de realización, el peso molecular es aprox. 80-95 kDa o está presente una mezcla de estos dos formas. En una forma de realización preferida, la lipasa respecto a más del 50%, preferiblemente más del 80% tiene un peso molecular de aprox. 25-45 kDa. En una forma de realización, la lipasa comprende una secuencia con una identidad de aminoácidos de al menos el 40%, preferiblemente al menos el 60% o al menos 80% respecto a la SEQ ID NO: 2.

[0074] Los homólogos de las lipasas según la invención de otros basidiomicetos, en particular los géneros y familias aquí mencionados, se pueden aislar por el experto en la material y testear respecto a su actividad, en particular durante la fabricación de queso con un perfil de aroma deseado. El perfil de aroma deseado puede estar caracterizado por los ácidos grasos de ácido caproico, ácido caprílico y ácido cáprico, así como ácido butírico y ácido acético y un aroma de macho cabrío conferido de este modo, no obstante, también se puede desear otro perfil.

[0075] Un objeto de la invención también es un vector de expresión que codifica una lipasa según la invención, p. ej. a partir de *Flammulina velutipes*, donde la secuencia codificadora está acoplada funcionalmente con el promotor apropiado para la expresión en una célula huésped. El objeto de la invención también es una célula huésped transformada que comprende un vector de expresión semejante, donde la célula huésped está seleccionada a partir del grupo que comprende bacterias, p. ej. *E. coli* y levaduras p. ej. *S. cerevisiae* o *P. pastoris*.

[0076] Otro objeto de la invención se refiere a un procedimiento para la producción de una lipasa según la invención, derivada de basidiomicetos, que comprende las etapas siguientes:

- a) cultivo de la célula huésped según la invención, y
- b) aislamiento de la lipasa a partir del cultivo.

[0077] La presente invención se refiere también a un queso, que comprende una lipasa según la invención, derivada de un basidiomiceto, p. ej. a partir de *Flammulina velutipes* o *Pleurotus citrinopileatus*. También se pone a disposición un queso, obtenible por un procedimiento según la invención, donde el queso comprende preferiblemente ácidos grasos libres del grupo que se compone de ácido caproico, ácido caprílico y ácido cáprico, así como ácido

butírico y ácido acético y opcionalmente una lipasa según la invención, derivada de un basidiomiceto.

[0078] Preferiblemente el queso puede comprender después de la maduración adecuado (p. ej. 30 días a 13 °C y 8-12 semanas, en particular 12 semanas a 4 °C) cantidades comprobables por GC/MS/MS de ácido caproico, ácido caprílico y ácido cáprico, así como de ácido butírico y ácido acético.

[0079] En una forma de realización, el queso, producido con la lipasa a partir de *Pleurotus citrinopileatus*, comprende a este respecto más ácido caprílico que ácido caproico y ácido cáprico, donde las cantidades de ácido caproico y ácido cáprico son aproximadamente iguales (+/-10%). A este respecto, la cantidad de ácido acético es preferiblemente 50-90% menor que la cantidad de ácido butírico. Preferiblemente en el cromatograma de SPME-GC-MS/MS resulta un cromatograma conforme a la fig. 4B-E).

[0080] En una forma de realización, el queso, producido con la lipasa a partir de *Flammulina velutipes*, comprende a este respecto más ácido caproico que ácido caprílico y ácido cáprico, donde la cantidad de ácido cáprico es mayor que la de ácido caproico. A este respecto, la cantidad de ácido acético es 0-50% menor que la cantidad de ácido butírico. Preferiblemente en el cromatograma de SPME-GC-MS/MS resulta un cromatograma conforme a la fig. 4B-E).

LEYENDA

[0081]

La fig. 1 muestra las actividades de la esterasa / lipasa medidas en el sobrenadante de cultivos *Pleurotus citrinopileatus* en los instantes indicados en el cultivo en medio MEP (A), en el medio MEP con 0,5% mantequilla clarificada (B) y medio MEP con 0,05% grasa de quark (C). Sustrato de acetato de p-nitrofenilo (pNPA), butirato (pNPB), valerato (pNPV), hexanoato (pNPH), octanoato (pNPO) y palmirato (pNPP).

La fig. 2 muestra la actividad de la esterasa en el sobrenadante del cultivo antes de la purificación y la actividad de la esterasa de la lipasa producida en los cultivos de *Flammulina velutipes* (A) und *Pleurotus citrinopileatus* (B) para el uso en la producción de queso.

La fig. 3 muestra las actividades de la esterasa de distintas fracciones de FPLC del sobrenadante del cultivo *Flammulina velutipes* después de la primera etapa de purificación por medio de DEAE-FF (A) y después de la segunda etapa de purificación de la fracción C1 por medio de SEC (B).

La fig. 4 muestra los análisis SDS-PAGE de distintas fracciones de *Flammulina velutipes* después de la purificación con FPLC.

(a) SDS-PAGE seminataiva (marcador (M), fracción C1 según DEAE-FF (C1), fracción 14 según SEC (SEC14), fracción 15 según SEC (SEC15) y fracción 16 según SEC (SEC16); coloración de Coomassie a la izquierda; coloración de esterasa a la derecha).

(B) SDS-PAGE desnaturalizante (marcador (M), pellet (P), Ultrasette (U), concentrado según Vivaflow (V), fracción B6 según DEAE-FF (B6), fracción C1 según DEAE-FF (C1), fracción 14 según SEC (SEC14), fracción según 15 SEC (SEC15) y fracción 16 según SEC (SEC16); coloración de Coomassie)

La fig. 5 muestra las actividades de la esterasa de distintas fracciones de FPLC del sobrenadante del cultivo *Pleurotus citrinopileatus* después de la primera etapa de purificación por medio de DEAE-FF (A) y después de la segunda etapa de purificación de la fracción C2 y C3 por medio de SEC (B).

La fig. 6 muestra los análisis SDS-PAGE de distintas fracciones de *P. citrinopileatus* después de la purificación con FPLC.

(A) SDS-PAGE seminataiva (marcador (M), fracción 10 según SEC (2.10), fracción 11 según SEC (2.11), fracción 12 según SEC (2.12), fracción 13 según SEC (2.13), fracción C2 según DEAE-FF (C2), fracción C4 según DEAE-FF (C4) y concentrado según Vivaflow (Konz.); coloración de Coomassie a la izquierda; coloración de esterasa a la derecha).

(B) SDS-PAGE desnaturalizante (marcar (M), concentrado según Vivaflow (Konz.), fracción C5 según DEAE-FF (C5), C4 según DEAE-FF (C4), C3 según DEAE-FF(C3), C2 según DEAE-FF (C2), fracción 13 (3.13 según SEC de C3), fracción 12 (3.12 según SEC de C3), fracción 11 (3.11 según SEC de C3) y fracción 10 (3.10 según SEC de C3), fracción 13 (2.13 según SEC de C2), fracción 12 (2.12 según SEC de C2), fracción 11 (2.11 según SEC de C2) y fracción 10 (2.10 según SEC de C2) marcador (M); coloración de Coomassie)

La fig. 7 muestra la secuencia de péptidos de una *Putative carotenoid ester lipase* (número de acceso UniProt G8A515) de *F. velutipes* (SEQ ID NO: 1). Los fragmentos de péptidos ESI-MS/MS encontrados están representados subrayado y en negrita (A). Después de la producción de partidores sobre esta base y secuenciación de ADN genómico (SEQ ID NO: 15) se identificó la secuencia de aminoácidos de una nueva lipasa a partir de *F. velutipes* (SEQ ID NO: 14, ADNg), que está comparado en (B) con SEQ ID NO: 1 (UniProt). Se muestra en un plano de aminoácidos una desviación de más de 3% respecto a la *Putative carotenoid ester lipase* (número de acceso de UniProt G8A515).

La fig. 8 muestra un desarrollo a modo de ejemplo de un proceso de quesería según la invención.

La fig. 9 muestra la cromatografía SPME-GC-MS/MS de muestras de queso de test después del almacenamiento durante 30 días a 13 °C (a), durante 30 días a 13 °C + 4 semanas a 4 °C (b); durante 30 días en 13 °C + 8 semanas a 4 °C (c) y 30 días a 13 °C + 12 semanas a 4 °C (d), producido sin lipasa (A), con opti-zym z10uc (B), con Piccantase (C), con lipasa de *Flammulina velutipes* (D) y con lipasa (E) de *Pleurotus citrinopileatus* (E).

La fig. 10 muestra el valor de pH óptimo determinado por medio de ensayo de esterases de la lipasa *F. velutipes* según la invención después de la purificación con FPLC (ejemplo 3) (A), donde el valor de pH óptimo se sitúa en aprox. 7-10, preferiblemente en 8-9,5 o en aprox. 8,5; y la temperatura óptima determinada por medio de ensayo de esterasa (pNPH) de la lipasa según la invención de *F. velutipes* después de la purificación con FPLC (B), donde la temperatura óptima se sitúa en aprox. 50-70 °C, preferiblemente en 55-65 °C o aprox. 60 °C.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Gestión del cultivo

Mantenimiento de la cepa

[0082] Las cepas de hongos de basidiomicetos usadas se han cultivado sobre placas de agar - peptona y extracto de malta (MEPA). Para la producción de las placas se pesaron los componentes del medio (agar agar 15 g, extracto de malta 30 g, proteína de soja 3 g), llenaron con agua ultrapura para 1 l, ajustaron con 1 M NaOH a pH 5,6 y lavado por autoclave durante 20 min. a 121 °C.

[0083] Sobre las placas de agar se colocó con una espátula estéril de forma centrada una pieza de agar con 1 cm² de tamaño, cubierta de forma homogénea con micelio, se cerró la placa de Petri con parafilm y se incubó a 24 °C en la incubadora. Las placas de agar cubiertas en aprox. el 80% se almacenaron a continuación a 4 °C y se inocularon regularmente según el mismo procedimiento.

Cultivo previo

[0084] Para la gestión del cultivo previo se usó el medio de peptona y extracto de malta. Para ello se pesaron los componentes de medio individuales (30g de extracto de malta, 3g de proteína de soja), se ajustaron con 1 M NaOH a pH 5,6 y rellenaron para 1 l. Cada vez 100 ml del medio se llevaron al matraz Erlenmeyer de 250 ml y se cerraron con un tapón de celulosa, así como lámina de aluminio. La esterilización de los medios se realizó durante 20 min a 121 °C en la autoclave.

[0085] Una pieza de agar con 1 cm² de tamaño, cubierta de forma homogénea se llevó con la ayuda de una espátula estéril a 100 ml de medio de peptona y extracto de malta y se homogeneizó por medio de un dispersador Ultra-Turrax durante 30 s a 10.000 rpm. El cultivo previo se incubó con privación de luz a 24 °C en el agitador de incubación (150 rpm). La duración del cultivo previo se realizó tras la observación de la duración de crecimiento sobre la placa de agar MEPA.

Cultivo principal

[0086] La gestión del cultivo principal se realizó en el medio nutriente de peptona y extracto de malta. Cada vez 100 ml de medio se llevó al matraz Erlenmeyer de 250 ml,

se cerró con un tapón de celulosa y lámina de aluminio y se trató en autoclave (20 min, 121 °C). Después de la homogeneización del cultivo previo por medio del dispersador Ultra-Turrax (30 s, 10.000 rpm) se llevó a un matraz Erlenmeyer de 250 ml para el cultivo principal respectivamente 10 ml del cultivo previo (10% del medio de cultivo principal). Los cultivos se incubaron sobre un agitador con privación de la luz a 24 °C y 150 rpm durante 21 días.

Toma de muestras

[0087] A intervalos regulares se han tomado muestras estériles y determinado la actividad de la esterasa / lipasa por medio de análisis fotométricos. Para ello se ha tomado y centrifugado respectivamente una muestra de 1 ml del cultivo sumergido (14.000 rpm, 18.000 g, 5 min, 4 °C). El sobrenadante se separó y usó para los análisis respectivos.

Recogida del cultivo

[0088] La recogida de los cultivos sumergidos se realizó el día del máximo de actividad del basidiomiceto respectivo por medio de filtración a través de un embudo Buchner; a este respecto se capturó el sobrenadante del cultivo en una botella de succión y se congeló hasta el procesamiento posterior a -20 °C. El micelio se desechó.

Optimización de la composición del medio

[0089] Para la optimización de la expresión de enzimas se han testeado distintos medios nutrientes: Medio de

peptona y extracto de malta (MEP), solución nutriente estándar (SNL) y medio de glucosa y patata. Las cepas usadas presentaron diferencias en los distintos medios en el crecimiento así como en la coloración del medio. Mediante las actividades de la esterasa / lipasa determinadas en los sobrenadantes de cultivo de los distintos medios se seleccionó el medio de peptona y extracto de malta como el medio más apropiado.

5

Adición de inductores apropiados para el aumento de la secreción de lipasas / esterases extracelulares

[0090] Después de que el medio de peptona y extracto de malta ha resultado ser el medio nutriente apropiado, a este medio se le añadieron distintos inductores para el aumento de la secreción de lipasas extracelulares. Los inductores son grasa y quark (extraído según Weibull-Stoldt del quark comestible: 50% grasa en masa seca), mantequilla clarificada y mantequilla (mantequilla de calidad alemana, ligeramente agriada) (Matissek et al. 2014).

[0091] Las actividades de la esterasa / lipasa segregadas se han aumentado significativamente por la adición de mantequilla clarificada y grasa de quark, en particular en el caso de *Pleurotus citrinopileatus* (fig. 1).

15

Ejemplo 2: Análisis enzimáticos fotométricos

[0092] La actividad de la esterasa se determinó por medio de análisis de esterases según Purdy y Kolattukudy, 1973 mediante la conversión de cinco sustratos de acetato de p-nitrofenilo (pNPA), butirato (pNPB), valerato (pNPV), hexanoato (pNPH), octanoato (pNPO). La determinación de la actividad de lipasas se realizó según el análisis de lipasas según Winkler y Stuckmann, 1979 con el palmirato de p-nitrofenilo (pNPP). Para la determinación de la actividad de la peptidasa se realizó el análisis de la azocaseína según Kilcawely et al. (2002).

Ejemplo 3: Purificación y concentración de preparaciones de lipasa

25

Precipitación de proteínas Precipitación de proteínas con sulfato de amonio

[0093] El sobrenadante del cultivo respectivo de los distintos basidiomicetos se llevó a un vaso de precipitación y se trasladó a un baño frío removiendo con una cantidad definida de sulfato de amonio. La adición de la sal se realizó a intervalos regulares en pequeñas porciones. En tanto que el sulfato de amonio se disolvió completamente, se removió hasta el ajuste del equilibrio durante otras 2 h. A continuación se centrifugaron las proteínas precipitadas (4.000 rpm, 3.283 g, 30 min, 4 °C). El pellet obtenido se recibió y disolvió en un volumen definido de agua ultrapura o tampón. La saturación ajustada de sulfato de amonio para la precipitación de proteínas fue del 60% en el caso de *Pleurotus citrinopileatus* y 70 % en el caso de *Flammulina velutipes*.

35

Concentración

[0094] Para la concentración, retamponaje o desalado se usaron conforme al volumen las unidades de centrifugación de Macrosep® - Microsep™ o Nanosep® (Pall, Dreieich) con un tamaño de exclusión (MWCO) de 10 kDa. Antes del primer uso se acondicionaron las unidades de centrifugación respectivamente tres veces con agua ultrapura, en tanto que se centrifugaron a 4 °C y 4.000 rpm (3.283 g).

[0095] Los componentes que son mayores de 300 kDa por medio de caja de filtración de flujo tangencial de laboratorio Ultrasette™ se separaron del sobrenadante del cultivo (unidad de membrana: membrana Omega™ (poli (éter sulfona) modificada con baja afinidad por las proteínas), con sustrato de poliolefina, separada y soportada por pantalla de poliéster y/o canal de pantalla suspendida).

[0096] La concentración de grandes volúmenes de cultivo se realizó por medio de la unidad de Vivaflow 200 (MWCO 10 kDa) con una membrana de poli (éter sulfona). La aplicación así como la purificación de la membrana se realizó según las especificaciones del fabricante.

Cromatografía líquida rápida de proteínas (Fast Protein Liquid Chromatography. FPLC)

[0097] La purificación de las proteínas precipitadas anteriormente se realizó a través de dos etapas de purificación por medio de FPLC. Para la purificación de dos etapas se usó la cromatografía de intercambio iónico (IEX) como primera etapa de purificación y la cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) como segunda etapa de purificación.

[0098] Como eluyente se usaron dos tampones de fosfato de potasio distintos (eluyente A, 50 mM, pH 7,0 y eluyente B, 50 mM, pH 7,0 con 1 M NaCl). Como columna sirvió en una primera etapa de purificación una columna de flujo rápido de sefarsa de dietilaminoetil (DEAE-FF). A este respecto se trata de un intercambiador aniónico débil. En una segunda etapa de purificación se concentraron y retamponaron las fracciones más activas de las columna DEAE-FF (véase 1.4.2) y purificaron por medio de una cromatografía por exclusión de tamaño (SEC). Como eluyente se ha usado un tampón de fosfato de potasio (50 mM, pH 7,0 con 0,15 M NaCl). La concentración de proteínas, así como la actividad de la esterasa o lipasa en las fracciones acumuladas individuales se comprobaron por medio del ensayo de

65

esterasas o lipasas de Bradford.

Cromatografía de intercambio aniónico (IEX)

- 5 [0099] Tanto las proteínas obtenidas por medio de precipitación de sulfato de amonio fraccionada, como también los sobrenadantes de cultivo usados, concentrados y retamponados directamente se sometieron a una purificación de proteínas por medio de FPLC-IEX (tabla 1). Para los ensayos iniciales se usaron tampones de Tris-HCl, en particular para la obtención de preparados enzimáticos para la producción de queso se han usado tampones de fosfato de potasio.

10

Tabla 1: Parámetros estándar para la purificación de proteínas por medio de cromatografía de intercambio iónico

Cromatografía de intercambio iónico	
FPLC	Sistema de cromatografía NGC
Columna	XK 26 (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg)
Material de columna	DEAE-FF (<i>Flujo rápido de sefarosa de dietilaminoetil</i>)
Volumen de columna	20 ml/175 ml/140 ml (columna recién preparada)
Tampón inicial (A)	50 mM tampón de tris-HCl pH 7,0 o 50 mM tampón de fosfato de fosfato pH 7,0
Tampón de elución (B)	50 mM tampón de Tris-HCl con 1 M NaCl, pH 7,0 o 50 mM tampón de fosfato de potasio con 1 M NaCl, pH 7,0
Tasa de flujo	2 - 4 ml min ⁻¹
Programa	Toma de prueba Elución 1 SV: 100% A, 0% B 2 SV: 100% A a 0% A, 0% B a 100% B 1 SV: 0% A, 100% B 2 SV: 100% A, 0% B
Detección	Detector UV
Longitud de onda	280 nm
Muestras	Sobrenadante (después de precipitación de sulfato de amonio, concentrado y retamponado en el tampón inicial)
Toma de prueba	A través de bomba A (posición 4)
Volumen de muestra	10 ml o 90 ml
Número de fracciones	55 o 24
Tamaño de fracciones	30 ml

Cromatografía por exclusión de tamaño (SEC)

- 15 [0100] Las fracciones IEX purificadas y concentradas se han purificado posteriormente por medio de FPLC-SEC (tabla 2).

Tabla 2: Parámetros estándar para la purificación de proteínas por medio de FPLC-SEC (SV: volumen de columna)

Cromatografía por exclusión de tamaño	
FPLC	Biologic Duo Flow
Columna	HiLoad 16/60 Superdex 200 pg (GE Healthcare Life Sciences, Freiburg)
Material de columna	Agarosa reticulada transversal + dextrano
Volumen de columna	24 ml o 120 ml
Tampón de elución	50 mM tampón de fosfato de potasio con 0,15 M NaCl, pH 7,0
Tasa de flujo	0,8 ml min ⁻¹
Programa	Elución 2 SV
Detección	Detector UV
Longitud de onda	280 nm
Muestras	Fracciones más activas de la 1ª etapa de purificación (concentrada y retamponada en el tampón inicial)
Toma de prueba	100 µl o 1 ml de bucle de muestra
Volumen de muestra	100 µl - 1 ml (concentrado de muestra total)
Número de fracciones	38 o 62
Tamaño de fracciones	1 ml o 4 ml

20

- [0101] La actividad de la esterasa en el sobrenadante del cultivo se comparó con la actividad de la esterasa en

el concentrado de lipasa producido durante el uso en la producción de queso. Mediante el proceso según la invención, la actividad de la esterasa en el concentrado de lipasa se pudo aumentar considerablemente en comparación a la actividad en el sobrenadante del cultivo. (fig. 2).

- 5 **[0102]** Además, la actividad de la esterasa se determinó en fracciones individuales después de la primera etapa de purificación por medio de intercambiadores aniónicos débiles, así como después de la segunda etapa de purificación por medio de SEC. Una actividad de la esterasa significativa se detectó en el caso de *Flammulina velutipes* en la fracción C1 después de la primera etapa de purificación (AEX) y en las fracciones 14-16 después de la segunda etapa de purificación (SEC) (fig. 3). Una actividad de la esterasa significativa se detectó en el caso de *Pleurotus citrinopileatus* en las fracciones B6-C5 después de la primera etapa de purificación (AEX) y en las fracciones 10-13 después de la segunda etapa de purificación (SEC) (fig. 5).

Ejemplo 4: Métodos electroforéticos

- 15 **[0103]** Las fracciones de *Flammulina velutipes* y *Pleurotus citrinopileatus* después de la purificación con FPLC se analizaron para la caracterización de las esterases / lipasas por medio de SDS-PAGE seminataiva y desnaturalizante (fig. 4/6).

Preparación de muestras

- 20 **[0104]** Para la concentración, desalado y retamponaje de las fracciones FPLC se concentraron y retamponaron estas en primer lugar con ayuda de dispositivos de filtro Amicon Ultra-0,5 10 K según las indicaciones del fabricante.

Electroforesis en gel con poliacrilamida - dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)

- 25 **[0105]** Para la SDS-PAGE se vertieron geles compuestos de gel colector y separador (tabla 3). La concentración de acrilamida fue en el gel colector 6% y en el gel separador 12%. Los geles de la SDS-PAGE seminataiva y desnaturalizante se diferencian en la composición por tampón Lower Tris y Upper Tris.

Tabla 3a: Composición del gel colector y gel separador

Producto químico	Gel colector (6%)	Gel separador (12%)
H ₂ O	1,8 ml	2,7 ml
Upper Tris (pH=6,8)	750 ml	-
Lower Tris (pH=8,8)	-	1,5 ml
Rotiphoerese® Gel 40	450 mL	1,8 ml
APS	10 µl	15 µl
TEMED	4 µL	7,5 µl

30

SDS-PAGE desnaturalizante

- [0106]** 15 µl de muestra se mezclaron antes de la aplicación con 5 µl de un tampón de aplicación de muestra desnaturalizante y 3 µl de una

35

solución DTT 1 M y se desnaturalizó durante 10 min en baño de agua hirviendo. A continuación las muestras se enfriaron en hielo y se pipetearon en el recipiente de gel. Como marcador se usaron 10 µl de "PageRuler Unstained Protein Ladder" de la empresa Life Technologies GmbH.

40 SDS-PAGE seminataiva

- [0107]** Al contrario de la SDS-PAGE desnaturalizante, las muestras para la SDS-PAGE seminataiva no se desnaturalizaron en un baño de agua hirviendo, además, las muestras no se mezclaron con DTT y se usó un tampón de aplicación de muestra seminataivo. La separación se realizó de forma análoga a la SDS-PAGE desnaturalizante.

45

Tabla 3b: Composición del tampón de aplicación de muestras

Producto químico	Gel colector (6%)	Gel separador (12%)
1 M Tris-HCl, pH = 6,8	1,0 ml	1,0 ml
Solución SDS (20%)	1,0 ml	1,0 ml

(continuación)

Producto químico	Gel colector (6%)	Gel separador (12%)
Azul de bromofenol	20,0 mg	20,0 mg
Glicerol	2,2 ml	2,2 ml
Agua (ultrapura)	ad 8,0 ml	ad 8,0 ml

Coloración del gel

- 5 [0108] Los geles de SDS-PAGE desnaturalizante se colorearon por medio de Coomassie coloidal o solución colorante de Coomassie. Los geles de SDS-PAGE seminativa y geles IEF se dividieron en dos partes, a fin de poder realizar tanto una coloración con Coomassie coloidal o solución colorante de Coomassie, como también una coloración de actividad de la esterasa.

10 Coloración con Coomassie coloidal

- [0109] Para la coloración de bandas de proteínas se colocó el gel en una solución colorante de Coomassie coloidal. Mientras que los geles SDS se incubaron durante la noche en el agitador orbital, para la coloración de los geles IEF fue suficiente una incubación de 30 min.

15

Coloración de la actividad de la esterasa

- [0110] Para la coloración de la actividad se necesitaron dos soluciones colorantes, que se produjeron de forma separada entre sí y se almacenaron sobre hielo (tabla 4). El gel se puso en la solución 1 y se recubrió inmediatamente con la solución 2. A continuación siguió la coloración durante como máximo 30 min sobre un agitador orbital a 20 rpm. Para retirar cualquier resto de reactivos colorantes se colocaron los geles antes de la documentación en agua (ultrapura).

Tabla 4: Soluciones para la coloración de actividad de la esterasa

	Sustancia	Cantidad
Solución 1	Fast Blue RR	50 mg en 100 ml de tampón de fosfato de potasio (80 mM, pH 7,0)
Solución 2	α -naftil butirato	10 mg en 1 ml de acetona

25

Ejemplo 5: Secuenciación de las fracciones de proteínas 14-16 de la FPLC

- [0111] Las fracciones 14-16 purificadas por medio de FPLC a partir de sobrenadante del basidiomiceto *Flammulina velutipes* con actividad de la esterasa detectada (fig. 3) se secuenciaron después de la digestión con tripsina por medio de LC-ESI-MS/MS).

30

- [0112] En la tabla 5 están expuestos los fragmentos de péptidos encontrados de las fracciones individuales.

Tabla 5: Fragmentos de péptidos encontrados de los análisis LC-ESI-MS/MS de las fracciones individuales

Fragmento de péptido	Fracción 14	Fracción 15	Fracción 16
AAIDEAEFVWTPR (SEQ ID NO: 3)	-	x	x
TGCSNASDTLACLR (SEQ ID NO: 4)	-	x	x
EAGVGNLGLQDQR (SEQ ID NO: 5)	-	x	x
TADFDTLK (SEQ ID NO: 6)	-	-	x
YVGAFGGDPTK (SEQ ID NO: 7)	-	x	x
FDGALFSDLPQNLIQGK (SEQ ID NO: 8)	-	x	x

35

(continuación)

Fragmento de péptido	Fracción 14	Fracción 15	Fracción 16
LLALYPSDPSQGSPFDTGSDNAIT- PQYK(SEQ ID NO: 9)	-	x	-
FVATLDPNGNTGISWPK(SEQ ID NO: 10)	-	x	-
SAALLGDLFQTSR(SEQ ID NO: 11)	-	x	-
YLINELSGK(SEQ ID NO: 12)	-	x	-
WLPTASDAEIDR(SEQ ID NO: 13)	-	x	-

[0113] La comparación de la base de datos produjo concordancias con una *Putative carotenoid ester lipase* a partir de *Flammulina velutipes* (número de acceso UniProt G8A515). La secuencia de péptidos de esta *Putative carotenoid ester lipase* a partir de *Flammulina velutipes* está representada en la fig. 7 (SEQ ID NO: 1), a este respecto los fragmentos de péptidos encontrados de los análisis LC-ESI-MS/MS están representados subrayados y en negrita.

Ejemplo 6: Producción de queso

[0114] En conjunto se han producido respectivamente hasta seis quesos de test distintos de las clases de queso de queso en salmuera del tipo de queso a la manera griega. Para ello, para la producción de queso de lechería se ajustó la leche entera fresca (Stich Feinkäserei GmbH, leche entera fresca, 3,5% de grasa, pasteurizada, homogeneizada) con nata a un contenido de grasa de 4,2% y se llevó un volumen definido a la cuba de ensayo y se atemperó a 33 °C.

[0115] Acto seguido se realizó la adición del cultivo de bacterias de ácido láctico (cultivo inicial directo mesófilo de tipo Lyofast M036L, Sacco Srl.), así como la adición de la lipasa correspondiente. A continuación comenzó el período de maduración previa durante en conjunto 45 min. Tras la conclusión del tiempo de maduración previa se mezcló y añadió a intervalos de tiempo de 5 min calcio (opti-calc, optiferm GmbH) y cuajo (microcuajo: opti-lase, optiferm GmbH) a las cuba de ensayo. Luego siguió el tiempo de período de cuajado, así como el período de espesado. Como referencia sirvió una producción sin adición de lipasas ("blank") y cada vez un estándar con 0,1 g de lipasa de cabra opti-zym z10uc (conforme a una dosificación práctica promedio de 3,5 g 100 l de leche) y con 0,1 g Piccantase® KLC (DSM Nutritional Products GmbH), de una lipasa de ternero recombinante adquirible comercialmente.

[0116] Después de la coagulación de la leche siguió el corte de la gelatinas con liras para queso en trozos aprox. del tamaño de una avellana. El requesón se estiró a intervalos regulares con la mano y tras la salida del suero se llevó a moldes precalentados correspondientes. Los moldes se voltearon para la salida uniforme del suero a intervalos regulares. A continuación se introdujo el queso en un baño de sal (ajustado al 20%, pH 5,2 con 80% de ácido láctico), así como el escurrido. Tras 24 h se cuartearon las muestras y plastificaron en una lámina. El tiempo de maduración fue de 30 d a 13 °C, a continuación las muestras se almacenaron durante otras 12 semanas a 4 °C.

Tabla 10: Resumen de las etapas del procedimiento en la producción de feta en escala piloto

Lapso de tiempo	Etapas del procedimiento	Parámetros del proceso	Valor orientativo
	Intercambio de calor	Atemperado de leche	33°C
	Purificación, mezcla	Adición: cultivo inicial Lyofast M 036 L, opcionalmente lipasa (p. ej. opti-zym z10uc o lipasa de test), CaCl ₂	1 UC/100 L 3,5 g/100 L 1:10.000
	Permanencia	Maduración previa	45 min
0 min	Purificación, mezcla	Adición: Microcuajo	220 IMCU 17 ml/100 L
16 min	Solidificación	Período de cuajado	
45 min	Solidificación	Cuajado de cuajo	

(continuación)

Lapso de tiempo	Etapas del procedimiento	Parámetros del proceso	Valor orientativo
45 min	Troceado	Corte de gelatina en dados	Longitud de borde 20 - 30 mm
50 min/ 60 min 70 min/ 80 min	Reestructuración	Traslado de los dados troceados	En el ciclo de 10 min
90 min	Purificación Separación	Adición de agua, servido, envasado de los tacos troceados en moldes	1 l con 48°C
10 min/ 60 min 120 min/ 240 min	Formación Volteo	Sedimentación y crecimiento del fragmento	
24 h	Escurreo	Secado de superficie	Durante la noche
Día 2	Intercambio de materia	Baño de sal	50 min 20 °Baume 15 °C
Día 2	Escurreo	Secado de superficie	
Día 2	Envasado	Envasado al vacío	
30 días	Proteólisis, lipólisis, almacenamiento	Maduración	a 10 - 15 °C

[0117] Por encima del período de maduración y almacenamiento se valoraron de forma sensorial las especialidades de queso generadas respectivamente en comparación a los productos de referencia sin adición de lipasas, con lipasa de cabra opti-zym z10uc y con la lipasa de ternero recombinante Piccantase® KLC (DSM Nutritional 5 Products GmbH).

[0118] Complementariamente se realiza una caracterización amplia instrumental-analítica de los ácidos grasos liberados por las lipasas. Los quesos producidos se examinaron por medio de microextracción de fase sólida (SPME) en acoplamiento con el análisis por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas respecto a la 10 presencia de ácidos grasos libres.

Ejemplo 7: Valoración sensorial del queso de test producido

[0119] Después de la maduración de 30 días a 10 - 15 °C tuvo lugar respectivamente por 3-10 personas 15 (trabajadores de la empresa optiferm GmbH y del Instituto de química y biotecnología de alimentos de JLU Gießen) una amplia valoración óptica y sensorial de las muestras, respectivamente en comparación con los productos de referencia. A continuación se almacenaron las muestras a 4 °C y de nuevo realizaron la cata después de 4, 8 y 12 semanas adicionales de almacenamiento.

20 **[0120]** Las impresiones sensoriales percibidas se subdividieron en aspecto (color), olor, sabor y textura (consistencia).

[0121] El queso de referencia sin lipasa se valoró durante la duración de las catas en conjunto como de sabor 25 neutral, puro y sin errores.

[0122] El queso de test producido con opti-zym z10uc desarrolló olor y sabor típico según la lipasa de cabra comparable con el aroma picante de un parmesano.

30 **[0123]** Las muestras de Piccantase® tuvieron básicamente menos éxito que las muestras producidas con opti-zym z10uc. Las muestras producidas con Piccantase® desarrollaron un aroma decente, que recuerda a la lipasa de cabra, sin embargo, mucho menos intenso y menos estable en el tiempo. Tanto más largo fue el almacenamiento a 4 °C, tanto más se formó un gusto erróneo (ligeramente amargo / jabonoso).

[0124] El queso de test producido con lipasas a partir de *Flammulina velutipes* presentó un olor neutral hasta ligeramente ácido. El sabor fue valorado como (ligeramente) aromático.

- 5 **[0125]** Las muestras de feta producidas con las lipasas de *Pleurotus citrinopileatus* desarrollaron un olor marcado, aromático intenso, que todavía se amplificó con duración de maduración creciente. Este olor se encontró como intenso y muy similar a las muestras producidas con lipasa de cabra. Este olor aromático-picante, comparado con el aroma generado con la lipasa de cabra de las muestras también se reflejó como resultado de los análisis de ácidos grasos (fig. 9). De sabor las muestras de *Pleurotus citrinopileatus* se valoraron igualmente como (ligeramente) aromáticas y comparables con las muestras de lipasa de cabra. La textura del queso se modificó durante el almacenamiento durante el período de catas de seca a cremosa.

Ejemplo 8: Análisis por espectrometría de masas de los ácidos grasos libres del queso por medio de SPME-GC-MS/MS

- 15 **[0126]** Los quesos de test producidos se examinaron tras diferentes períodos de almacenamiento por medio de microextracción de fase sólida (SPME) en acoplamiento con análisis por cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas, así como por medio de GC-MS respecto a la presencia de ácidos grasos libres. La extracción se realizó por medio de fibras de divinilbenceno / polidimetilsiloxano del espacio superior del vial con espacio de cabeza de 20 ml. Para ello se pesaron respectivamente 3 g de queso en un vial con espacio de cabeza de 20 ml y se usaron para el examen SPME-GC-MS/MS. Los parámetros están representados en la tabla 11.

[0127] Los cromatogramas SPME-GC-MS/MS correspondientes están representados en la fig. 9.

- 25 **[0128]** La cantidad de ácidos grasos libres de ácido acético, ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico y ácido cáprico aumentaron durante el período de almacenamiento. Los quesos de test, que se produjeron sin lipasa, presentaron al contrario de los productos de referencia con lipasa de cabra opti-zym z10uc o con lipasa de ternero recombinante Piccantase® KLC después de 12 semanas de almacenamiento muy pocos ácidos grasos libres (fig. 9A-C). En conjunto la cantidad y tipo de los ácidos grasos en el queso de test producido con lipasas a partir de *Flammulina velutipes* y *Pleurotus citrinopileatus* durante el período de almacenamiento fueron comparables con las referencias con Piccantase y opti-zym, pero donde hubo diferencias en las relaciones de cantidades (fig. 9D/E).

Tabla 11: Parámetros de SPME-GC-MS/MS para el análisis de ácidos grasos libres del queso

SPME-GC-MS/MS-O	
SPME: Fibras	• Supelco; DVB/PDMS (divinilbenceno / polidimetilsiloxano)
SPME: Programa de temperatura	• 55 °C (10 min); agitar; 55 °C (40 min)
Cromatografía de gases	• 7890 GC System, Agilent Technologies
Inyector	• Split/Splitless (ALS), 250 °C con SPME-Liner
Relación de separación	• 50:1 o sin
Columna de separación	• Agilent Technologies J&W Scientific VF-Waxms • 30 m de longitud; 250 µm de diámetro; • 0,25 µm de espesor de film
Gas de soporte	• He
Flujo	• 1,2 ml·min ⁻¹ (constante)
Programa de temperatura	• 40 °C (3 min); 5 °C·min ⁻¹ a 240 °C (12 min); en conjunto 55 min
Detector	• Detector triple eje Agilent 5975 C MSD
Temperaturas	• Fuente de iones: 230 °C • Cuadrupolo: 150 °C
Ionización	• EI 70 eV

(continuación)

• Rango de masa	• Escaneo de iones total: m/z 33 a 300
• Software	• Chemstation E02.00.493
• Base de datos	• NIST 2008 MS

Ejemplo 9: Caracterización de proteínas por medio de HPLC-ESI-MS/MS

- 5 **[0129]** Las tres fracciones purificadas por medio de FPLC DE *Flammulina velutipes* con actividad de la esterasa detectada se secuenciaron tras la digestión con tripsina por medio de LC-MS/MS con ionización por electrospray (ESI).

Digestión de proteínas a partir de las fracciones de FPLC

- 10 **[0130]** Para la digestión de las proteínas se mezcló la solución de proteínas en primer lugar con RapiGest™ SF (a 15 mg de proteína aproximadamente 10 ml). La solución se calentó durante 20 min a 80 °C y se enfrió a continuación a la temperatura ambiente. Acto seguido se agregó 5 ml de una solución DTT de 10 mM, se calentó durante 20 min a 60 °C y se enfrió a continuación de nuevo a la temperatura ambiente. A continuación se añadieron
15 5 ml de una solución de iodacetamida 200 mM y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente con privación de luz. En último término se añadieron 1,5 ml de tripsina (1mg ml⁻¹) e incubaron a 37 °C durante la noche. Al día siguiente se purificaron y concentraron las proteínas por medio de puntas de pipeta ZipTip®.

Puntas de pipeta ZipTip® para la concentración y purificación de muestras para la espectrometría de masas

- 20 **[0131]** Para acidificar la muestra, esta se mezcló con 1 ml de ácido fórmico. Una punta de pipeta ZipTip® se humedeció con 10 ml de acetonitrilo (100%) (5 veces). A continuación se equilibró la punta de pipeta ZipTip® con 10 ml de solución TFA al 0,1% (5 veces). La columna se cargó: 10 ml de la solución de analito acidificada se pusieron 10 veces y se entregaron en el mismo tapón Eppendorf. Con una solución TFA al 0,1% se enjuagaron las impurezas de la columna (3 veces). El analito se eluyó con acetonitril / H₂O (1:1) (1% FA) de la columna (3 veces con 5 ml) y se le dio a un nuevo tapón Eppendorf. Repetición del procedimiento (3 veces): La punta de pipeta se enjuagó para ello 5 veces con 10 ml de acetonitril / H₂O (1:1) y 5 veces con acetonitrilo (100%) y se prosiguió el proceso desde el equilibrado de la columna con la solución TFA al 0,1%.
- 30 **[0132]** Las muestras se congelaron y al día siguiente se analizaron por medio de Nano-ESI-MS/MS (Q Exactive, m/z 100-2000, R= 140000 @ m/z 200, MS/MS por medio HCD, 1.7 kV de tensión)

Derivación de partidores

- 35 **[0133]** Mediante la secuencia de aminoácidos secuenciada anteriormente se comparó la secuencia de ADNc obtenida de ella de la lipasa a partir de *F. velutipes* con la secuencia de una *Putative carotinoide ester lipase* a partir de *F. velutipes*. De estos datos se derivaron los partidores para la amplificación. Gracias a las secciones de secuencia obtenidas se derivaron otros partidores para la secuencia completa del ADNg.

40 Aislamiento de ADN genómico

- [0134]** El día de la máxima actividad de la esterasa o lipasa se recogieron los cultivos y se separó el micelio del sobrenadante. A continuación se trituró el micelio bajo nitrógeno líquido y se llevaron aprox. 4 microespátulas del micelio triturado a un recipiente de reacción de 1,5 ml. El resto del micelio se congeló a -20 °C. En el recipiente de
45 reacción se pipetearon 500 µl de un tampón de lisis (tabla 12), se removió e incubó 10 min a temperatura ambiente.

Tabla 12 Composición del tampón de lisis para el aislamiento del ADN genómico

Producto químico	Solución madre	Volumen usado [ml]
400 mM Tris HCl pH 8.0	1M	4 ml
60 mM EDTA pH 8,0	200 mM	3 ml
150 mM NaCl	1M	1,5 ml
1% SDS	10%	1 ml
Agua ultrapura estéril	/	0,5 ml

- [0135]** A continuación se añadieron 150 µl de una solución de acetato de potasio 3M (pH 4,8), se removió y centrifugó durante 10 min a 14.000 rpm (18.000 g) a temperatura ambiente. El sobrenadante se llevó a un nuevo
50 recipiente de reacción de 1,5 ml y se mezcló con el mismo volumen de isopropanol (aprox. 600 µl). La mezcla se

centrifugó de nuevo durante 10 min a temperatura ambiente y 14.000 rpm (18.000 g). A continuación se desechó el sobrenadante y se recibió el pellet en 500 µl de etanol (70%), la lavó y centrifugó 1 m (14.000 rpm, 18.000 g, RT). El sobrenadante se desechó de nuevo y se liberó el pellet en una centrifugadora de vacío durante 5 min del disolvente restante. El pellet seco se suspendió de nuevo a continuación en 50 µl o 100 µl (en el caso de pellets mayores, 5 visibles) de agua ultrapura estéril. Por medio del NanoPhotometer™ se determinó la concentración de ADN. El almacenamiento del ADN genómico se realizó hasta el uso posterior a -21 °C.

Regeneración de cadena de polimerasa (PCR)

- 10 [0136] Para la amplificación de los fragmentos de ADN_g deseados se usó la PCR. Como polimerasas se usaron las polimerasas Phusion® (Nueva Inglaterra, Biolabs, Ipswich, USA) La composición de la mezcla maestro (tabla 13) así como el programa de temperaturas (tabla 14) se rigieron por las especificaciones del fabricante de las polimerasas.

15 **Tabla 13** Composición de la mezcla maestro por principio de PCR de 20 µl con polimerasa de ADN Phusion® High-Fidelity.

Componentes	Volumen [µl]	Concentración final
5x Tampón de reacción GC	4,0	1x
Componentes	Volumen [µl]	Concentración final
10 mM dNTPs	0,4	200,0 µM
10 µM Partidor Forward	1,0	0,5 µM
10 µM Partidor Reverse	1,0	0,5 µM
Polimerasa de ADN Phusion® High-Fidelity	0,2	0,02 U µl ⁻¹
Patrón de ADN	variable	50 - 250 ng por 20,0 µL PCR
DMSO, 100% (opcional)	0,6	3%
Cloruro de magnesio, 50 mM (opcional)	0,6	1,5 mM
Nucleasa - agua ultrapura libre	ad 20	

PCR analítica

- 20 [0137] Para obtener la temperatura de hibridación óptima del partidor derivado, se llevó a cabo un gradiente de temperatura. A este respecto se aplicó a 5 °C por debajo de la temperatura de fusión del primer indicada por el fabricante. La composición es análoga a la tabla 13, sin embargo, se aplicaron 10 µl en lugar de 20 µl.

Tabla 14 Programa de temperatura de una reacción PCR con polimerasa de ADN Phusion® High-Fidelity

Nº de etapa	Etapas	Temperatura [°C]	Tiempo
1	Fase de desnaturalización inicial	98	5,0 min
2	Desnaturalización	98	30 s
3	Recocido de partidor	Gradiente: 45 °C a 69 °C	30 s
4	Elongación	72	10 - 30 s por kb
Vuelta a la etapa nº 2 durante 30-40 ciclos			
5	Elongación final	72	5 min
6	Almacenamiento	8	∞

25 PCR preparatoria

[0138] Para la PCR preparatoria se aplicaron 200 µl de la mezcla maestro, a fin de obtener cantidades mayores de ADN. Los productos de la PCR se reacondicionaron y secuenciaron después del aislamiento de la banda correspondiente a partir del gel de agarosa.

30

Electroforesis por gel de agarosa

[0139] Tras la finalización de la PCR se separaron los productos obtenidos por medio de electroforesis por gel de agarosa. La concentración del gel dependió a este respecto del tamaño de los fragmentos de ADN a separar.

- 35 Fragmentos > 2 kb se separan en geles al 1 - 1,5% y < 2 kb se separan en geles al 1,5 - 3%. En la tabla está expuesta la composición de tampón TAE 50x usado para la electroforesis.

Tabla 15 Composición del tampón TAE 50x

Componentes	Concentración
Tris-base	242,0 g l ⁻¹
0,5 M EDTA, pH 8	100,0 ml l ⁻¹
Ácido acético	57,7 ml l ⁻¹

[0140] Antes del uso se ha diluido el tampón 1:50 con agua ultrapura (tampón TAE 1x). La cantidad correspondiente de agarosa se pesaron y suspendió en el tampón TEA 1x. Para geles pequeños se necesitaron 56 ml y para geles grandes 168 ml. La suspensión se calentó en el microondas hasta la disolución completa de la agarosa.

- 5 A continuación se agitó la solución en un agitador y se enfrió a aprox. 60 °C, a fin de verterla luego en un carro de gel. Después del vertido se usó un peine. Después de aprox. 30 minutos se endureció el gel y se pudo revestir con el tampón TAE 1x. Las muestras de la PCR analítica se mezclaron con 1 µl de Midori Green Direct y se aplicaron directamente sobre el gel. En las muestras de la PCR preparatoria se aplicó solo una muestra con el colorante, todas las otras se mezclaron sin el colorante, para ello 1:10 con tampón de carga de ADN 10x (tabla), y se cortaron las
- 10 bandas correspondientes en base a los fragmentos coloreados.

Tabla 16 Tampón de carga de ADN 10x

Componentes	Cantidad
Azul de bromofenol	25 mg
EDTA 0,5 M	200 µl
Glicerol	3,5 ml
SDS 10%	500 µl
Xilenocianol	25 mg
Agua ultrapura	ad 10 ml

[0141] En función del tamaño de gel se aplicó una tensión entre 80 y 120 V para la electroforesis. Con la ayuda de un estándar de tamaño (100 bp de conductor de ADN extendido de ADN para amplificadores de PCR; 1 kbp conductor de ADN para digestión de restricción, Carl Roth) se pudieron estimar los tamaños de los fragmentos de ADN. Los geles se observaron y documentaron por medio de la instalación DeVision DBOX (Decon Science Tec., Hohengandern), equipado con un transiluminador UV (312 nm), una cámara y el software DeVision G versión 2.0.

20 Aislamiento de fragmentos de ADN

[0142] Los fragmentos de ADN relevantes se cortaron con un escalpelo a partir del gel y se llevaron a un recipiente de reacción estéril de 2 ml. La purificación de los fragmentos del gel se realizó por medio del gel NucleoSpin® y kit de limpieza de PCR (Macherey-Nagel) según las indicaciones del fabricante. La determinación de la concentración de las soluciones que contienen ADN se realizó en el NanoPhotometer™. El almacenamiento del ADN aislado se realizó hasta el uso posterior a -21 °C.

Secuenciación del ADN

- 30 **[0143]** La secuenciación de los fragmentos de ADN aislados se realizó por medio del servicio de secuenciación de SeqLab-Microsynth GmbH, Göttingen.

Índice de bibliografía

- 35 **[0144]** Kilcawley, K.N.; Wilkinson, M.G.; Fox, P.F (2002): Determination of key enzyme activities in commercial peptidase and lipase preparations from microbial or animal sources. En: Enzyme and Microbial Technology 31 (3), pág. 310-320. DOI: 10.1016/S0141-0229(02)00136-9.

- 40 Matissek, Reinhard; Steiner, Gabriele; Fischer, Markus (2014): Lebensmittelanalytik. Berlín, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

- Purdy, R. E.; Kolattukudy, P. E. (1973): Depolymerization of a hydroxy fatty acid biopolymer, cutin, by an extracellular enzyme from *Fusarium solani* f. pisi. Isolation and some properties of the enzyme. En: Archives of Biochemistry and Biophysics 159 (1), S. 61-69. DOI: 10.1016/0003-9861(73)90429-3.

Winkler, U. K.; Stuckmann, M. (1979): Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. En: Journal of bacteriology 138 (3), pág. 663-670.

LISTADO DE SECUENCIAS

[0145]

5 <110> Optiferm GmbH

<120> LIPASAS A PARTIR DE BASIDIOMICETOS PARA EL USO EN LA QUESERÍA

<130> OPT18343EP

10

<160> 17

<170> BiSSAP 1.3.6

15 <210> 1 <211> 725 <212> PRT

<213> Flammulina velutipes

<400> 1

Met	Thr	Arg	Ala	Pro	Leu	Pro	His	Leu	Ser	His	His	Gly	Pro	Thr	Ser
1				5					10					15	
Glu	Asp	Cys	Leu	Thr	Ile	Asn	Val	Val	Lys	Pro	Ala	Asn	Val	Glu	Glu
			20					25					30		
Gly	Ala	Gln	Leu	Pro	Val	Val	Ala	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Val	Gly	Gly
			35				40					45			
Thr	Ser	Glu	Tyr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Val	Ser	Arg	Ser	Leu	Glu	Leu
	50					55					60				
Gln	Glu	Pro	Val	Ile	Tyr	Val	Ser	Phe	Asn	Tyr	Arg	Leu	Asn	Gly	Phe
65					70					75					80
Gly	Phe	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Ala	Gly	Val	Gly	Asn	Leu
				85					90					95	
Gly	Leu	Gln	Asp	Gln	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Tyr	Val
			100					105					110		
Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Thr	Lys	Val	Thr	Ile	Trp	Gly	Glu	Ser
			115				120					125			
Ala	Gly	Ala	Glu	Ala	Val	Val	Tyr	His	Met	Val	Ser	Asn	Asp	Gly	Asn
						135					140				
Thr	Glu	Gly	Leu	Tyr	Arg	Ala	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Gly
145					150					155					160
Ser	Tyr	Gly	Gly	Leu	Glu	Asn	Gly	Gln	Asp	Ala	Tyr	Asp	Gly	Ile	Val
				165					170					175	
Asn	Lys	Thr	Gly	Cys	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Thr	Leu	Ala	Cys	Leu	Arg
			180					185					190		
Thr	Ala	Asp	Phe	Asp	Thr	Leu	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Glu	Ala	Glu	Phe
			195				200					205			
Val	Trp	Thr	Pro	Arg	Phe	Asp	Gly	Ala	Leu	Phe	Ser	Asp	Leu	Pro	Gln
	210					215					220				
Asn	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Lys	Val	Ala	Asp	Val	Pro	Leu	Ile	Thr	Gly
225					230					235					240
Asn	Cys	Gly	Asp	Glu	Gly	Thr	Leu	Tyr	Ser	Ile	Ser	Tyr	Asn	Ile	Ser
				245					250					255	
Thr	Asp	Ala	Glu	Phe	Lys	Thr	Phe	Leu	Gln	Thr	Arg	Trp	Leu	Pro	Thr
			260					265					270		
Ala	Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Asp	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser	Asp
			275				280					285			
Pro	Ser	Gln	Gly	Ser	Pro	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Asp	Asn	Ala	Ile	Thr
						295					300				
Pro	Gln	Tyr	Lys	Arg	Ser	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu	Phe	Gln
305					310					315					320
Thr	Ser	Arg	Arg	Tyr	Leu	Ile	Asn	Glu	Leu	Ser	Gly	Lys	Gln	Asp	Ile
				325					330					335	
Tyr	Thr	Tyr	Ile	His	Asn	Arg	Gln	Arg	Arg	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Ser
			340					345					350		

Phe	His	Ala	Ser	Asp	Leu	Val	Asn	Val	Tyr	Gly	Gly	Gly	Asp	Met	Ser
		355					360					365			
Asp	Tyr	Leu	Ile	Arg	Phe	Val	Ala	Thr	Leu	Asp	Pro	Asn	Gly	Asn	Thr
	370					375					380				
Gly	Ile	Ser	Trp	Pro	Lys	Trp	Thr	Ser	Glu	Ala	Pro	Asn	Met	Leu	Ala
385					390					395					400
Phe	Ser	Asp	Asp	Glu	Ala	Val	Pro	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Asp	Thr	Tyr
			405						410					415	
Arg	Lys	Glu	Ala	Met	Ala	Ala	Ser	Gly	Met	Ile	Gln	Ser	Cys	Tyr	Ile
			420					425					430		
Tyr	Val	Trp	Gln	Arg	Gln	Ile	Lys	Thr	Leu	Leu	Glu	Ala	Tyr	Val	Tyr
		435					440					445			
Gly	Arg	Tyr	Pro	Asp	Arg	Ala	Ser	Glu	Lys	Val	Thr	Ala	Thr	Arg	Thr
	450					455					460				
Leu	Asn	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Lys	Gly	Lys	Thr	Gly	Arg
465					470					475					480
Phe	Ser	Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Pro	Ser	Arg	Ala	Ser	Lys	Asn	Lys	Pro
				485					490					495	
Val	Pro	Ala	Val	Ile	Val	Ile	Gly	Phe	Ala	Asp	Ser	Thr	Phe	Leu	Asn
			500					505					510		
Asn	Gly	Ile	Ala	Gln	Ala	Thr	Phe	Asp	Ala	Asn	Ser	Val	Ala	Ala	Asp
		515					520					525			
Ser	Thr	Ser	Lys	Thr	Gly	Ala	Phe	His	Asn	Ile	Tyr	Ser	Glu	Asp	Ile
	530					535					540				
Gly	Ser	Leu	Leu	Ala	Trp	Gly	Trp	Gly	Ser	His	Arg	Val	Leu	Asp	Ala
545					550					555					560
Leu	Glu	Leu	Val	Ala	Pro	Glu	Ile	Asp	Ser	Thr	Arg	Val	Gly	Val	Met
				565					570					575	
Gly	Cys	Ser	Arg	Tyr	Gly	Lys	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Gly	Ile	Phe	Asp
			580					585					590		
Asp	Arg	Leu	Val	Glu	Thr	Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Trp	Ser	Arg	Leu	Phe
		595					600					605			
His	Gly	Gly	Gln	Lys	Arg	Ala	Cys	Lys	Thr	Thr	Tyr	Arg	Met	Arg	Ile
	610					615					620				
Val	Phe	Pro	Trp	Met	Pro	Ile	Ser	Leu	Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Arg	Ala
625					630					635					640
Leu	Pro	Phe	Gly	Ile	Lys	Met	Asn	Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Gly	Val	Thr
				645					650					655	
Phe	Pro	Ala	Thr	Gln	Met	Val	Tyr	Lys	Phe	Leu	Gly	Ala	Glu	Glu	Asn
			660					665					670		
Val	Gly	Val	Ala	Leu	Arg	Asn	Ser	Gly	His	Cys	Asp	Pro	Ser	Gly	Thr
		675					680					685			
Asn	Asn	Val	Leu	Asp	Phe	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Leu	Gly	Ser	Gln	Arg
	690					695					700				
Thr	Arg	Asn	Tyr	Thr	Thr	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gln	Ala	His	Pro	Glu	Ala
705					710					715					720
Tyr	Pro	Trp	Ala	Ile											
				725											

<210> 2

<211> 341

5 <212> PRT

<213> Flammulina velutipes

<400> 2

ES 2 763 202 T3

Leu Asn Gly Phe Gly Phe Leu Ala Ser Lys Glu Val Lys Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 Val Gly Asn Leu Gly Leu Gln Asp Gln Arg Leu Ala Leu Lys Trp Ile
 20 25 30
 Gln Lys Tyr Val Gly Ala Phe Gly Gly Asp Pro Thr Lys Val Thr Ile
 35 40 45
 Trp Gly Glu Ser Ala Gly Ala Glu Ala Val Val Tyr His Met Val Ser

50 55 60
 Asn Asp Gly Asn Thr Glu Gly Leu Tyr Arg Ala Ala Phe Ala Gln Ser
 65 70 75 80
 Gly Ser Val Gly Ser Tyr Gly Gly Leu Glu Asn Gly Gln Asp Ala Tyr
 85 90 95
 Asp Gly Ile Val Asn Lys Thr Gly Cys Ser Asn Ala Ser Asp Thr Leu
 100 105 110
 Ala Cys Leu Arg Thr Ala Asp Phe Asp Thr Leu Lys Ala Ala Ile Asp
 115 120 125
 Glu Ala Glu Phe Val Trp Thr Pro Arg Phe Asp Gly Ala Leu Phe Ser
 130 135 140
 Asp Leu Pro Gln Asn Leu Ile Leu Gln Gly Lys Val Ala Asp Val Pro
 145 150 155 160
 Leu Ile Thr Gly Asn Cys Gly Asp Glu Gly Thr Leu Tyr Ser Ile Ser
 165 170 175
 Tyr Asn Ile Ser Thr Asp Ala Glu Phe Lys Thr Phe Leu Gln Thr Arg
 180 185 190
 Trp Leu Pro Thr Ala Ser Asp Ala Glu Ile Asp Arg Leu Leu Ala Leu
 195 200 205
 Tyr Pro Ser Asp Pro Ser Gln Gly Ser Pro Phe Asp Thr Gly Ser Asp
 210 215 220
 Asn Ala Ile Thr Pro Gln Tyr Lys Arg Ser Ala Ala Leu Leu Gly Asp
 225 230 235 240
 Leu Leu Phe Gln Thr Ser Arg Arg Tyr Leu Ile Asn Glu Leu Ser Gly
 245 250 255
 Lys Gln Asp Ile Tyr Thr Tyr Ile His Asn Arg Gln Arg Arg Leu Pro
 260 265 270
 Val Leu Gly Ser Phe His Ala Ser Asp Leu Val Asn Val Tyr Gly Gly
 275 280 285
 Gly Asp Met Ser Asp Tyr Leu Ile Arg Phe Val Ala Thr Leu Asp Pro
 290 295 300
 Asn Gly Asn Thr Gly Ile Ser Trp Pro Lys Trp Thr Ser Glu Ala Pro
 305 310 315 320
 Asn Met Leu Ala Phe Ser Asp Asp Glu Ala Val Pro Leu Ser Leu Thr
 325 330 335
 Glu Asp Thr Tyr Arg
 340

<210> 3

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Flammulina velutipes

<400> 3

Ala Ala Ile Asp Glu Ala Glu Phe Val Trp Thr Pro Arg
 1 5 10

10

<210> 4

<211> 14

<212> PRT
<213> Flammulina velutipes

<400> 4

5

Thr	Gly	Cys	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Thr	Leu	Ala	Cys	Leu	Arg
1				5					10				

<210> 5

<211> 13

10 <212> PRT

<213> Flammulina velutipes

<400> 5

Glu	Ala	Gly	Val	Gly	Asn	Leu	Gly	Leu	Gln	Asp	Gln	Arg
1				5					10			

15

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

20 <213> Flammulina velutipes

<400> 6

Thr	Ala	Asp	Phe	Asp	Thr	Leu	Lys
1				5			

25

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Flammulina velutipes

30

<400> 7

Tyr	Val	Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Thr	Lys
1				5					10	

35 <210> 8

<211> 18

<212> PRT

<213> Flammulina velutipes

40 <400> 8

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

<210> 9

45 <211> 28

<212> PRT

<213> Flammulina velutipes

<400> 9

ES 2 763 202 T3

Leu Leu Ala Leu Tyr Pro Ser Asp Pro Ser Gln Gly Ser Pro Phe Asp
 1 5 10 15
 Thr Gly Ser Asp Asn Ala Ile Thr Pro Gln Tyr Lys
 20 25

<210> 10

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Flammulina velutipes

<400> 10

Phe Val Ala Thr Leu Asp Pro Asn Gly Asn Thr Gly Ile Ser Trp Pro
 1 5 10 15
 Lys

10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

15 <213> Flammulina velutipes

<400> 11

Ser Ala Ala Leu Leu Gly Asp Leu Leu Phe Gln Thr Ser Arg
 1 5 10

20

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Flammulina velutipes

25

<400> 12

Tyr Leu Ile Asn Glu Leu Ser Gly Lys
 1 5

30 <210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> Flammulina velutipes

35 <400> 13

Trp Leu Pro Thr Ala Ser Asp Ala Glu Ile Asp Arg
 1 5 10

<210> 14

40 <211> 725

<212> PRT

<213> Flammulina velutipes

<220>

45 <223> Lipasa

<400> 14

Met	Thr	Arg	Ala	Pro	Leu	Pro	His	Leu	Ser	His	His	Gly	Pro	Thr	Ser
1				5					10					15	
Glu	Asp	Cys	Leu	Thr	Ile	Asn	Val	Val	Lys	Pro	Ala	Asn	Val	Glu	Glu
			20					25					30		
Gly	Ala	Gln	Leu	Pro	Val	Val	Ala	Val	Ser	Ser	Phe	Glu	Val	Gly	Gly
		35					40					45			
Thr	Ser	Glu	Tyr	Asn	Gly	Thr	Ser	Ile	Val	Ser	Arg	Ser	Leu	Glu	Leu
	50					55					60				
Gln	Glu	Pro	Val	Ile	Tyr	Val	Ser	Phe	Asn	Tyr	Arg	Leu	Asn	Gly	Phe
65					70					75					80
Gly	Phe	Leu	Ala	Ser	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Ala	Gly	Val	Gly	Asn	Leu
				85					90					95	
Gly	Leu	Gln	Asp	Gln	Arg	Leu	Ala	Leu	Lys	Trp	Ile	Gln	Lys	Tyr	Val
			100					105					110		
Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Thr	Lys	Val	Thr	Ile	Trp	Gly	Glu	Ser
		115					120					125			
Ala	Gly	Ala	Glu	Ala	Val	Val	Tyr	His	Met	Val	Ser	Asn	Asp	Gly	Asn
	130					135					140				
Thr	Glu	Gly	Leu	Tyr	Arg	Ala	Ala	Phe	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Gly
145					150					155					160
Ser	Tyr	Gly	Gly	Leu	Glu	Asn	Gly	Gln	Asp	Ala	Tyr	Asp	Gly	Ile	Val
				165					170					175	
Asn	Lys	Thr	Gly	Cys	Ser	Asn	Ala	Ser	Asp	Thr	Leu	Ala	Cys	Leu	Arg
			180						185				190		
Thr	Ala	Asp	Phe	Asp	Thr	Leu	Lys	Ala	Ala	Ile	Asp	Glu	Ala	Glu	Phe

ES 2 763 202 T3

		195				200			205					
Val	Trp	Thr	Pro	Arg	Phe	Asp	Gly	Ala	Leu	Phe	Ser	Asp	Leu	Pro
210						215					220			
Asn	Leu	Ile	Leu	Gln	Gly	Lys	Val	Ala	Asp	Val	Pro	Leu	Ile	Thr
225					230					235				240
Asn	Cys	Gly	Asp	Glu	Gly	Thr	Leu	Tyr	Ser	Ile	Ser	Tyr	Asn	Ile
				245					250					255
Thr	Asp	Ala	Glu	Phe	Lys	Thr	Phe	Leu	Gln	Thr	Arg	Trp	Leu	Pro
			260					265					270	
Ala	Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Asp	Arg	Leu	Leu	Ala	Leu	Tyr	Pro	Ser
		275					280					285		Asp
Pro	Ser	Gln	Gly	Ser	Pro	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser	Asp	Asn	Ala	Ile
		290				295					300			Thr
Pro	Gln	Tyr	Lys	Arg	Ser	Ala	Ala	Leu	Leu	Gly	Asp	Leu	Leu	Phe
305					310					315				Gln
Thr	Ser	Arg	Arg	Tyr	Leu	Ile	Asn	Glu	Leu	Ser	Gly	Lys	Gln	Asp
				325					330					Ile
Tyr	Thr	Tyr	Ile	His	Asn	Arg	Gln	Arg	Arg	Leu	Pro	Val	Leu	Gly
			340					345					350	Ser
Phe	His	Ala	Ser	Asp	Leu	Val	Asn	Val	Tyr	Gly	Ser	Gly	Asp	Met
		355					360					365		Ala
Asp	Tyr	Leu	Ile	Arg	Phe	Val	Ala	Thr	Leu	Asp	Pro	Asn	Gly	Asn
		370				375					380			Thr
Gly	Ile	Ser	Trp	Pro	Lys	Trp	Thr	Ser	Glu	Ala	Pro	Asn	Met	Leu
385					390					395				Ala
Phe	Ser	Asp	Asp	Glu	Ala	Val	Pro	Leu	Ser	Leu	Thr	Glu	Asp	Thr
				405					410					Tyr
Arg	Lys	Glu	Ala	Met	Ala	Ala	Ser	Gly	Met	Thr	Gln	Ser	Cys	Tyr
			420					425					430	Ile
Tyr	Val	Trp	Gln	Arg	Gln	Ile	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Ala	Tyr	Val
		435					440					445		Tyr
Gly	Arg	Tyr	Pro	Asp	Arg	Ser	Ser	Glu	Lys	Val	Thr	Ala	Thr	Arg
		450				455					460			Thr
Gly	Asn	Thr	Val	Ser	Ile	Thr	Val	Thr	Ala	Lys	Gly	Lys	Thr	Gly
465					470					475				Arg
Phe	Ser	Ala	Thr	Leu	Ala	Leu	Pro	Ser	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp	Lys
				485					490					Pro
Val	Pro	Ala	Val	Ile	Val	Ile	Gly	Phe	Ala	Asp	Ser	Thr	Phe	Leu
			500					505					510	Asn
Asn	Gly	Ile	Ala	Gln	Ala	Thr	Phe	Asp	Ala	Asn	Ser	Val	Ala	Ala
		515					520					525		Asp
Ser	Thr	Ser	Lys	Thr	Gly	Ala	Phe	Arg	Asn	Ile	Tyr	Ser	Glu	Asp
		530				535					540			Ala
Gly	Ser	Leu	Leu	Ala	Trp	Gly	Trp	Gly	Ser	His	Arg	Val	Leu	Asp
545					550					555				Ala
Leu	Glu	Leu	Val	Ala	Pro	Glu	Ile	Asp	Ser	Thr	Arg	Val	Gly	Val
				565					570					Met
Gly	Cys	Ser	Arg	Tyr	Gly	Lys	Gly	Ala	Leu	Ala	Ala	Gly	Ile	Phe
			580					585					590	Asp
Asp	Arg	Leu	Val	Glu	Thr	Lys	Gly	Leu	Ala	Pro	Trp	Ser	Arg	Leu
		595					600					605		Phe
Leu	Gly	Gly	Gln	Lys	Arg	Ala	Cys	Lys	Thr	Ile	Ser	Pro	Met	Arg
		610				615					620			Ile
Val	Phe	Pro	Trp	Met	Pro	Thr	Ser	Ser	Pro	Leu	Leu	Leu	Pro	Arg
625					630					635				Ala
Pro	Gln	Phe	Gly	Ile	Lys	Met	Asn	Pro	Glu	Gly	Val	Ala	Gly	Val
				645					650					Thr
Phe	Pro	Ala	Thr	Gln	Ala	Val	Tyr	Lys	Phe	Leu	Gly	Ala	Glu	Ala
			660					665					670	Asn
Ile	Gly	Val	Ala	Leu	Arg	Asn	Ser	Gly	His	Cys	Asp	Pro	Ser	Gly
		675					680					685		Thr
Thr	Asn	Val	Leu	Asp	Phe	Val	Lys	Ser	Val	Leu	Leu	Gly	Ser	Gln
		690				695						700		Arg

Thr	Arg	Asn	Tyr	Thr	Thr	Ile	Ser	Pro	Tyr	Gln	Ala	His	Pro	Glu	Ala
705					710					715					720
Tyr	Pro	Trp	Ala	Ile											
				725											

<210> 15

5 <211> 4305

<212> ADN

<213> Flammulina velutipes

<220>

10 <223> ADN genómica de lipasa

<400> 15

ES 2 763 202 T3

atgactaggg	cgccattacc	acatctttcc	caccagtata	taaaggtaaa	gtgttcaacc	60
tgctatttac	ttccatctct	cacgcgatgc	atcctcagct	tctcgtggct	gctctcactc	120
ttgctggcgc	tgcttctgct	gcaagcatct	ccgcccgtgc	ggcgcccact	gtttacttgg	180
acagtgccac	agttactggg	gttgaaagcg	ggggcgttgc	ccaatttctc	gggataccat	240
tcgctaaatc	gatgtgaggc	ttctacgtcc	tgtcataaat	acgcgtttat	acgaactaaa	300
gtctagtgc	aacgaatcac	ggttacaact	tccagtgcc	gttgacgcgt	attccgggac	360
cttcgaggcg	accgcctttg	ggcccgtttg	cgttcggaag	gaatccgagt	ccctgccgat	420
tgaagttatt	cagcgaattc	ttccacagga	aacgatcgag	tttctcgtca	atgttttagg	480
cttcaatcct	agtgggccga	cttcggaaga	ttgtgaggtt	taggatgttt	ggaggtgggtg	540
gtgaagctaa	catcgggtgc	taggtttgac	gataaacgtc	gtcaagcccc	cgaatgttga	600
agaggggagct	caacttcctg	ttgttgccgg	tagtatgttc	ttccttttgg	gcctgttgga	660
tactgatgtt	gagtttcttc	tactatagtg	gatttatgga	ggtgcgaatt	ggtattgtag	720
ttactttgac	ccgtgcatct	aacccgatgt	tcaggcagct	ttgaagttgg	cgggacctcc	780
gagtaagttg	gtaccgccaa	agcgtcgttg	cctgatacta	aaggaagatg	attctaggtg	840
taacggtacg	agcatcgtat	cgcggtccct	cgagctacag	gaaccagtca	tttatgtgtc	900
ctttaactat	cgtctcaacg	gtacgtttca	ctgcagcaag	tgtacgctgc	gagggcactt	960
gacgatcccc	tcgtaggctt	cggattcctg	gcgagcaaag	aagttaagga	agccggcgta	1020
ggcaacttgg	gcttacagga	tcgtaagtcg	ccacatcgtt	tcttctctgt	ataccaatc	1080
tcaacgattc	acagaacggt	tggccctcaa	gtggatacag	aagtatgttg	gtgcattcgg	1140
cggagatcct	accaaagtaa	caatgtaagt	tggttcagcg	tgtccatggg	cagagacctc	1200
atccgtacat	atgtcagatg	gggagaatct	gcgggagcgg	aggcagttgt	ctaccacatg	1260
gtttcgaacg	atggtaacac	ggagggcctc	taccgagcgg	ctttcgcgca	atcgggctcg	1320
gtcggttcct	atggcgtctc	tgaaaatgga	caagatggta	aggactgctg	ctcatcaatt	1380
aggatgctac	ctaattgttc	tacgcagcct	acgacgggat	cgtcaacaag	accggctgtt	1440

ccaacgcttc	agataccctc	gcttgcttgc	gaaccgccga	tttcgacacc	ttgaaagcgg	1500
ctatcgacga	agcgggaattt	gtatggacgc	cccgatattga	tggtgcactc	tttagcgacc	1560
tccctcagaa	ccttatattg	cagggaaaag	tagcggatgt	ccccctgac	accggtacgt	1620
ggcgtccgag	tgtgttcgtc	ccatcgtaag	catgcttaac	atcgtggcag	gaaactgtgg	1680
cgacgagggg	acactctatt	ccatcagcta	taacattagg	ttgggggtgtg	tctctgtgtc	1740
tctaagcctg	ttctaactgt	gtcgcagtac	cgacgccgag	tttaagacat	tcctacagac	1800
tcgctggctt	cccacagcat	ccgatgcaga	gattgacagg	ctactagctt	tgtacccatc	1860
agacccctcc	caaggctcgc	cattcgacac	tggctctgac	aacgccataa	cgccacagta	1920
caaacgttcc	gccgctttac	taggagatct	actcttccaa	acttctcgga	ggtacctgat	1980
caacgaactg	tccggcaagc	aagatatcta	cacctacagt	aagtcgttca	ggtcgacgag	2040
aactgggact	aacggattca	acgtgtagta	cacaatcgtc	agagaagact	cccgggtcttg	2100
ggatcgcttc	atgcttctga	ccttgtcaat	gtgtacggca	gtggcgatat	ggctgattat	2160
ctcattcggt	tcgtcgccac	actggatcct	aacggaaata	ctgggatttc	ctggccgaaa	2220
tggacgtccg	aagcaccaaa	catgctagca	ttcagcgatg	acgaagccgt	cccactgagt	2280
cttacggagg	atacatatcg	caaggaggcc	atggcggctt	ccggtgaggt	cttgtttgcg	2340
aacccatcgt	gaggttgtct	acctgtatta	gctggtagca	caccgtcgct	ctttgaatcg	2400
aattaatacc	acccttttcg	tttatgcatg	ccaggccacg	aatgcagatt	ttgaattttt	2460
gataaatgtg	gcgcacctat	caatgcatca	atgcaaggcc	aactgtctac	tgaccgttgg	2520
ataggtagat	cccaatcatg	ttacatatat	gtctggcagc	gccgtaagca	tgattctgat	2580
ttttcagctc	ttctctcata	ttctccctaa	gtgttcaaac	gagatattca	aagtctatgg	2640
aagaagaccc	aaagctgcc	ggcagtgag	tccgagtcgg	acgcgaagca	ctagcgggtgt	2700
aaaagcgtga	tcgcgaacca	cggcagttta	tcctctctgc	tgacgaacgt	ttgttcgtct	2760
tcccagacat	tttctgcag	aagagattta	agctggaact	tgtaagctcc	acctcgact	2820
cactctaaca	atgctttaca	caacgttctt	ttcgatgata	ttcttggtac	tcttagcgggt	2880
acatcgctcg	tctgggtcaat	gcgcttcact	tccttctcct	cttcaggtt	acaacgacct	2940
gactgcatcg	atccctctcc	cggatccctt	cacattctac	aacggaacgg	ccctcacctc	3000
tcctgatgat	tgggcgtgtc	gacgcacaga	gattaaggcc	ctcctcgaag	catacgtata	3060
tggccgctac	cccgaccgtt	ctagcgagaa	agtcaccgcc	actcgaacgg	gaaataccgt	3120
ctctatcacc	gtcaccgcga	aaggaaagac	aggtcgattc	tccgccacgt	tagccctccc	3180
ttccgggggt	tccaatgata	aaccggtccc	ggcgggttatt	gttatcggt	ttgccgactc	3240
aacttttctg	aataacggaa	ttgcgcaggc	tacgttcgac	gctaacagtg	tggcggccga	3300
ttctacctcc	aagacaggcg	cgttccgcaa	catctattct	gaggatgctg	gttcactttt	3360

ES 2 763 202 T3

```

agcttgggga tggggatccc atcgtgtcct ggatgcgctc gagttggtcg cgcctgagat 3420
tgattcgaca cgtgtgggtg ttatgggatg tagtcgatac gggaaagggtg ccctcgctgc 3480
tgggattttc gatgacagag tgtgttaaac ccctctctct catagtactt gctgattttt 3540
gttatgtcgt tgctttcccc agatctcgtt gacgatccct atgtccagtg gtgtgttggg 3600
cacttcacca attaggttcc attatgatca aggtcctatt gcacctctat gttgagcaat 3660
cgcagcacta atattgcttc catttagctg gtcgaaacga aaggcttggc tccatggtcg 3720
aggctattcc ttggtggaca aaagcgagct tgcaagacta tatccccgat gagaatcgtc 3780
ttcccggtga tgccaacctc ctaccgctg ctgttgcccc ggtaatttaa aaaaactccc 3840
ctttaaatat tattctgaca gacactcgtg aagcgcgccg cagtttggga tcaaggtgcg 3900
ccacatttac tacttcggga caacatctca attcaattca ggtcaaactg aataccaggt 3960
ttttgtcatc aaaaagagcc ttagtgcaat ctctgactgt tgcggatacg tagatgaacc 4020
cagaggggtg ggcaggcgtt accttccttg ctactcaagc agtatacaag ttccttggcg 4080
ctgaagcaaa tatcggagtt gcactccgta acagtgggca ctgcgatcct tctggaacgt 4140
aggtaattct gcctatattt gaagatctca tactgataga gcatggatag aactaatgta 4200
ttggacttcg tcaagtcagt ccttcttggc tcgcagagga cacgcaacta cacaacgatc 4260
tctccgtatc aggcgcatcc tgaagcctac ccatgggcca tttga 4305

```

<210> 16

5 <211> 2177

<212> ADN

<213> Flammulina velutipes

<220>

10 <223> ADNc de lipasa

<400> 16

ES 2 763 202 T3

atgactaggg cgccattacc acatctttcc caccatgggtc cgacttcgga agattgtttg	60
acgataaacg tcgtcaagcc cgcgaatggt gaagagggag ctcaacttcc tgttggtgcg	120
gtagcagct ttgaagttgg cgggacctcc ggtataacgg tacgagcatc gtatcgcggt	180
ccctcgagct acaggaacca gtcatttatg tgccttttaa ctatcgtctc aacggcttcg	240
gattcctggc gagcaaagaa gttaaggaag ccggcgtagg caacttgggc ttacaggatc	300
aacggttggc cctcaagtgg atacagaagt atgttggtgc attcggcgga gatcctacca	360
aagtaacaat atggggagaa tctgcgggag cggaggcagt tgtctaccac atggtttcga	420
acgatggtaa cacggagggc ctctaccgag cggctttcgc gcaatcgggc tcggtcgggt	480
cctatggcgg tcttgaaaat ggacaagatg cctacgacgg gatcgtcaac aagaccggct	540
gttccaacgc ttcagatacc ctcgcttgct tgcgaaccgc cgatttcgac accttgaaag	600

cggtatcga cgaagcggaa tttgtatgga cgccccgatt tgatggtgca ctcttttagcg	660
acctccctca gaaccttata ttgcagggaa aagtagcgga tgtccccctg atcaccggaa	720
actgtggcga cgaggggaaca ctctattcca tcagctataa cattagtacc gacgccgagt	780
ttaagacatt cctacagact cgctggcttc ccacagcatc cgatgcagag attgacaggc	840
tactagcttt gtacccatca gaccctccc aaggctcgcc attcgacact ggctctgaca	900
acgccataac gccacagtac aaacgttccg ccgctttact aggagatcta ctcttccaaa	960
cttctcggag gtacctgatc aacgaactgt ccggcaagca agatatctac acctacatac	1020
acaatcgtca gagaagactc ccggtcttgg gatcgttcca tgcttctgac cttgtcaatg	1080
tgtacggcag tggcgatatg gctgattatc tcattcgttt cgtcgccaca ctggatccta	1140
acggaaatac tgggatttcc tggccgaaat ggacgtccga agcaccaaac atgctagcat	1200
tcagcgatga cgaagccgtc ccactgagtc ttacggagga tacatatcgc aaggaggcca	1260
tggcggcttc cggtatgacc caatcatgtt acatatatgt ctggcagcgc cagattaagg	1320
ccctcctcga agcatacgta tatggccgct accccgaccg ttctagcgag aaagtcaccg	1380
ccactcgaac gggaaatacc gtctctatca ccgtcaccgc gaaaggaaag acaggtcgat	1440
tctccgccac gttagccctc ccttccgggg cttccaatga taaaccgcgc ccggcgggta	1500
ttgttatcgg atttgccgac tcaacttttc tgaataacgg aattgcgcag gctacgttcg	1560
acgctaacag tgtggcggcc gattctacct ccaagacagg cgcgttcgcgc aacatctatt	1620
ctgaggatgc tggttcactt ttagcttggg gatggggatc ccacgtgtgc ctggatgcgc	1680
tcgagttggt cgcgcctgag attgattcga cacgtgtggg tgttatggga tgtagtcgat	1740
acgggaaagg tgccctcgct gctgggattt tcgatgacag actggtcgaa acgaaaggct	1800
tggctccatg gtcgaggcta ttccttgggt gacaaaagcg agcttgcaag actatatccc	1860
cgatgagaat cgtcttcccg tggatgccaa cctcctcacc gctgctgttg ccccgcgcg	1920
cgcagtttgg gatcaagatg aaccagagg gtgtggcagg cgttaccttc cctgctactc	1980
aagcagtata caagttcctt ggcgctgaag caaatatcgg agttgcactc cgtaacagtg	2040
ggcactgcga tccttctgga acaactaatg tattggactt cgtcaagtca gtccttcttg	2100
gctcgagag gacacgcaac tacacaacga tctctccgta tcaggcgcac cctgaagcct	2160
acccatgggc catttga	2177

<210> 17

<211> 341

5 <212> PRT

<213> Flammulina velutipes

<220>

<223> Fragmento de SEQ ID NO: 14

<400> 17

```

Leu Asn Gly Phe Gly Phe Leu Ala Ser Lys Glu Val Lys Glu Ala Gly
1      5      10      15
Val Gly Asn Leu Gly Leu Gln Asp Gln Arg Leu Ala Leu Lys Trp Ile
20
Gln Lys Tyr Val Gly Ala Phe Gly Gly Asp Pro Thr Lys Val Thr Ile
35      40      45
Trp Gly Glu Ser Ala Gly Ala Glu Ala Val Val Tyr His Met Val Ser
50      55      60
Asn Asp Gly Asn Thr Glu Gly Leu Tyr Arg Ala Ala Phe Ala Gln Ser
65      70      75      80
Gly Ser Val Gly Ser Tyr Gly Gly Leu Glu Asn Gly Gln Asp Ala Tyr
85      90      95
Asp Gly Ile Val Asn Lys Thr Gly Cys Ser Asn Ala Ser Asp Thr Leu
100      105      110
Ala Cys Leu Arg Thr Ala Asp Phe Asp Thr Leu Lys Ala Ala Ile Asp
115      120      125
Glu Ala Glu Phe Val Trp Thr Pro Arg Phe Asp Gly Ala Leu Phe Ser
130      135      140
Asp Leu Pro Gln Asn Leu Ile Leu Gln Gly Lys Val Ala Asp Val Pro
145      150      155      160
Leu Ile Thr Gly Asn Cys Gly Asp Glu Gly Thr Leu Tyr Ser Ile Ser
165      170      175
Tyr Asn Ile Ser Thr Asp Ala Glu Phe Lys Thr Phe Leu Gln Thr Arg
180      185      190
Trp Leu Pro Thr Ala Ser Asp Ala Glu Ile Asp Arg Leu Leu Ala Leu
195      200      205
Tyr Pro Ser Asp Pro Ser Gln Gly Ser Pro Phe Asp Thr Gly Ser Asp
210      215      220
Asn Ala Ile Thr Pro Gln Tyr Lys Arg Ser Ala Ala Leu Leu Gly Asp
225      230      235      240
Leu Leu Phe Gln Thr Ser Arg Arg Tyr Leu Ile Asn Glu Leu Ser Gly
245      250      255
Lys Gln Asp Ile Tyr Thr Tyr Ile His Asn Arg Gln Arg Arg Leu Pro
260      265      270
Val Leu Gly Ser Phe His Ala Ser Asp Leu Val Asn Val Tyr Gly Ser
275      280      285
Gly Asp Met Ala Asp Tyr Leu Ile Arg Phe Val Ala Thr Leu Asp Pro
290      295      300
Asn Gly Asn Thr Gly Ile Ser Trp Pro Lys Trp Thr Ser Glu Ala Pro
305      310      315      320
Asn Met Leu Ala Phe Ser Asp Asp Glu Ala Val Pro Leu Ser Leu Thr
325      330      335
Glu Asp Thr Tyr Arg
340

```

REIVINDICACIONES

1. Uso de una lipasa aislada derivada de un basidiomiceto para la producción de queso.
- 5 2. Procedimiento para la producción de queso, que comprende la acción de una lipasa aislada, derivada de un basidiomiceto sobre un producto base de la producción de queso, preferiblemente sobre la leche.
3. Uso según la reivindicación 1 o procedimiento según la reivindicación 2, donde el queso es un queso blando, queso en lonchas semiblando, queso en lonchas o queso duro,
- 10 donde el queso es preferiblemente un queso en salmuera, p. ej. feta.
4. Uso según la reivindicación 1 o 3 o procedimiento según la reivindicación 2 o 3, donde el basidiomiceto está seleccionado del grupo que comprende *Flammulina spp.*, *Pleurotus spp.*, *Agrocybe spp.*, *Armillaria spp.*, *Auricularia spp.*, *Clitocybe spp.*, *Fistulina spp.*, *Hericium spp.*, *Hypholoma spp.*, *Hypsizygus spp.*, *Kuehneromyces spp.*,
- 15 *Laetiporus spp.*, *Lactarius spp.*, *Lentinula spp.*, *Lentinus spp.*, *Lycoperdon spp.*, *Macrolepiota spp.*, *Phallus spp.*, *Piptoporus spp.*, *Panellus spp.*, o *Polyporus spp.*, preferiblemente seleccionado del grupo que comprende *Flammulina velutipes*, *Pleurotus citrinopileatus*, *Agrocybe aegerita*, *Armillaria bulbosa*, *Armillaria gallica*, *Armillaria melea*, *Auricularia fuscusuccinea*, *Clitocybe geotropa*, *Fistulina hepatica*, *Hericium erinaceus*, *Hericium cirrhatum*, *Hericium coralloides*, *Hypholoma capnoides*, *Hypsizygus tessulatus*, *Kuehneromyces mutabilis*, *Laetiporus sulphureus*, *Lactarius deliciosus*, *Lentinula edodes*, *Lentinus squarrolusus*, *Lycoperdon pyriforme*, *Macrolepiota procera*, *Phallus impudicus*, *Piptoporus betulinus*, *Pleurotus eryngii*, *Pleurotus flabellatus*, *Pleurotus ostreatus*, *Panellus serotinus*, o *Polyporus umbellatus*, en la mayoría de los casos preferiblemente *Flammulina velutipes* o *Pleurotus citrinopileatus*.
- 25 5. Uso según la reivindicación 1 o 3-4 o procedimiento según la reivindicación 2-4, donde la lipasa está aislada de un cultivo de basidiomicetos.
6. Uso según la reivindicación 1 o 3-4 o procedimiento según la reivindicación 2-4, donde la lipasa se produjo usando organismos modificados genéticamente seleccionados del grupo que comprende levaduras y
- 30 bacterias.
7. Uso según la reivindicación 1 o 3-6 o procedimiento según la reivindicación 2-6, donde la producción de queso comprende las etapas siguientes:
- 35 a) facilitación de un producto base de queso que comprende leche de quesería,
- b) coagulación del producto base de queso, donde se origina una gelatina,
- c) corte de la gelatina,
- d) moldeado,
- e) salazón, y
- 40 f) maduración,
- donde un producto base de la producción de queso entra en contacto con una lipasa derivada de un basidiomiceto en una de las etapas a, b, c o d, preferiblemente en la etapa b.
- 45 8. Uso según la reivindicación 1 o 3-7 o procedimiento según la reivindicación 2-7, donde la lipasa genera un aroma en la producción de queso, donde el aroma está caracterizado preferiblemente por la presencia de ácidos grasos de ácido acético, ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico y ácido capríco.
- 50 9. Uso según la reivindicación 1 o 3-8 o procedimiento según la reivindicación 2-8, donde la lipasa se añade en una concentración final de 70 - 285 U/L, referido al caprílato en 3 l de producto base de queso.
10. Uso según la reivindicación 1 o 3-9 o procedimiento según la reivindicación 2-9,
- donde el queso se produce con leche seleccionada del grupo que comprende leche de vaca, leche de oveja, leche de
- 55 cabra, leche de búfala y una leche vegetal, como leche de soja y/o
- donde la leche tiene un contenido de grasa de al menos 1,7 % (v/v), preferiblemente de al menos 3,5 % (v/v).
11. Uso según la reivindicación 1 o 3-10 o procedimiento según la reivindicación 2-10, donde la lipasa se puede producir mediante un procedimiento para la producción de una lipasa derivada de un basidiomiceto a partir de
- 60 un cultivo de basidiomicetos, que comprende las etapas siguientes:
- i. cultivo de un basidiomiceto en un medio, preferiblemente medio de peptona y extracto de malta, que comprende un inductor para el aumento de la secreción de lipasas,
- ii. aislamiento del sobrenadante del cultivo que comprende las lipasas,
- 65 iii. precipitación de proteínas,

- iv. concentración, y
- v. purificación de la lipasa,

donde las etapas iii.-v. se pueden realizar en cualquier orden o simultáneamente.

- 5 12. Lipasa aislada, derivada de un basidiomiceto, preferiblemente *Pleurotus citrinopileatus* o *Flammulina velutipes*, que es capaz de liberar los ácidos grasos libres de ácido acético, ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico y ácido cáprico a partir de triglicéridos.
- 10 13. Lipasa según la reivindicación 12, que comprende una secuencia de aminoácidos, que presenta una identidad de al menos el 80% con una secuencia de SEQ ID NO:2, donde la lipasa esta derivada de un basidiomiceto, p. ej. a partir de *Flammulina velutipes*, donde la lipasa no presenta la SEQ ID NO: 1 o i) está acoplada en una secuencia de aminoácidos, que facilita la purificación y/o ii) se produjo en bacterias o levaduras modificadas genéticamente;
- 15 14. Vector de expresión, que codifica una lipasa según la reivindicación 13 o célula huésped transformada, donde la lipasa no presenta la SEQ ID NO: 1 o i) está acoplada en una secuencia de aminoácidos, que facilita la purificación y/o ii) se produjo en bacterias o levaduras modificadas genéticamente;
- 20 15. Uso según la reivindicación 1 o 3-10 o procedimiento según la reivindicación 2-10, donde la lipasa se puede producir mediante un procedimiento para la producción de una lipasa derivada de basidiomicetos, que comprende las etapas siguientes:
 - i. cultivo de la célula huésped según la reivindicación 14, y
 - ii. aislamiento de la lipasa a partir del cultivo.
- 30 16. Procedimiento para la producción de un producto de suero seleccionado del grupo que comprende suero, lactosa o proteína de suero, en el que se usa una lipasa derivada de un basidiomiceto según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, para la producción de queso, y se separa el suero.
- 35 17. Queso, que comprende ácidos grasos del grupo que se compone de ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido acético y ácido butírico y una lipasa derivada de un basidiomiceto según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, opcionalmente obtenible mediante un procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 2-10.

Fig. 1 A

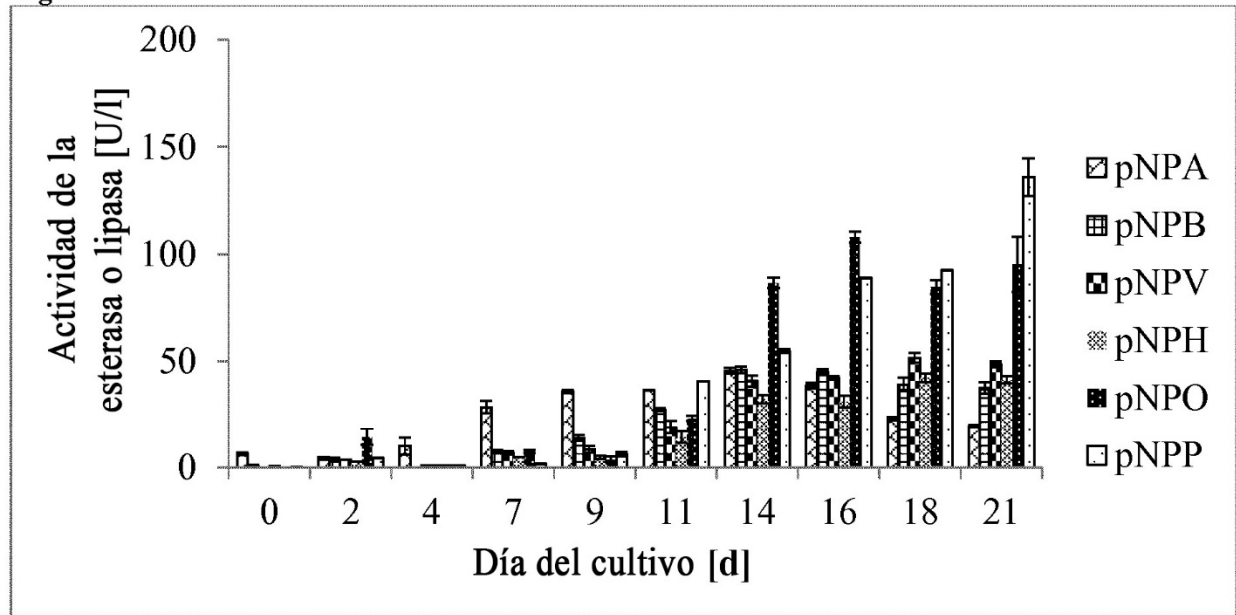


Fig. 1B

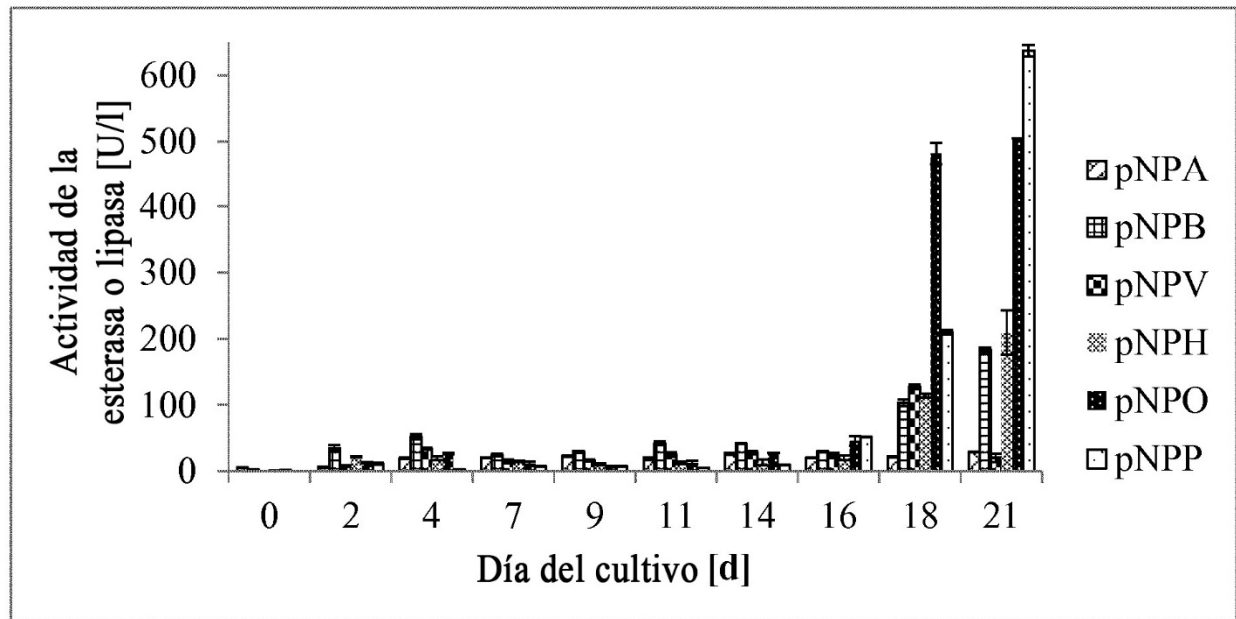


Fig. 1C

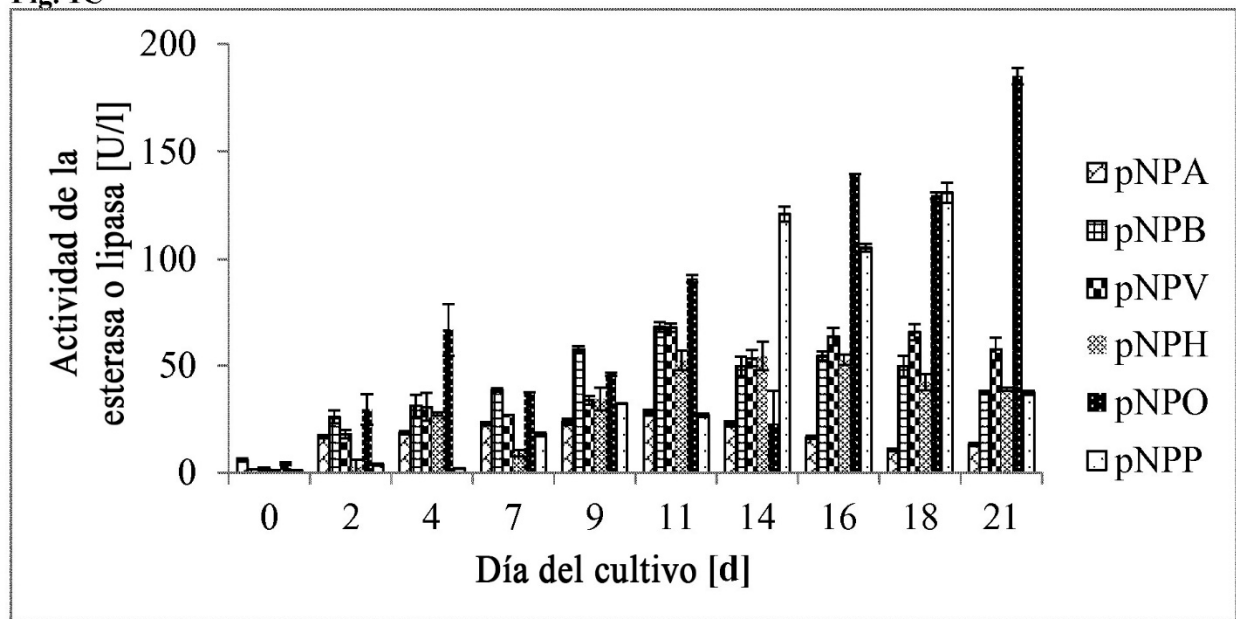
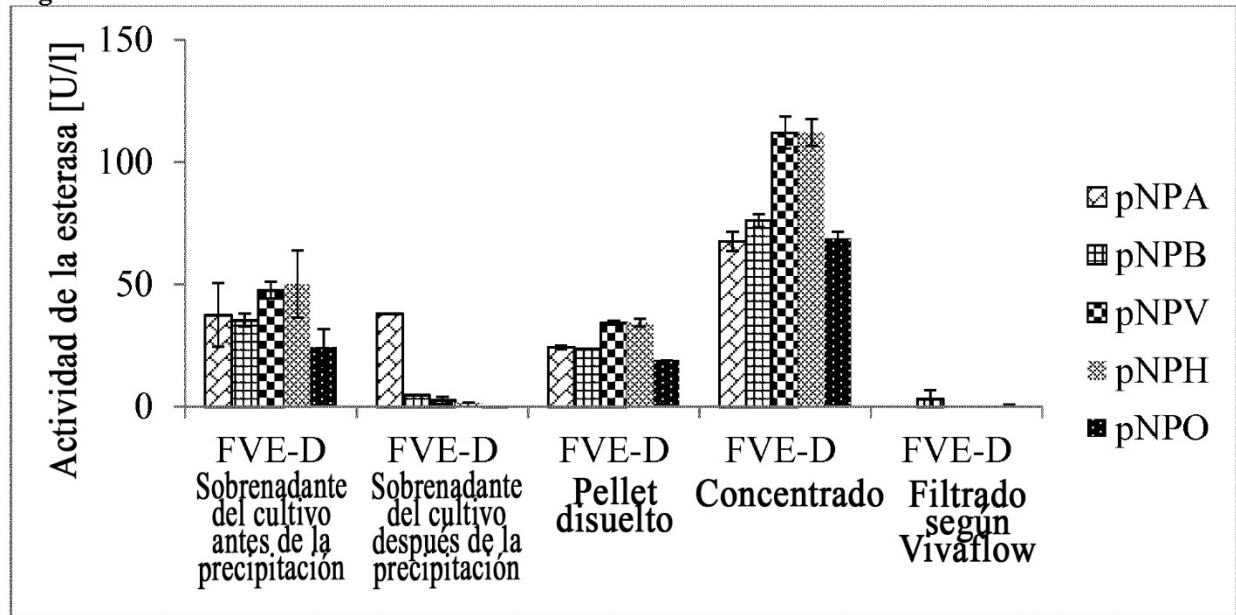


Fig. 2 A



B

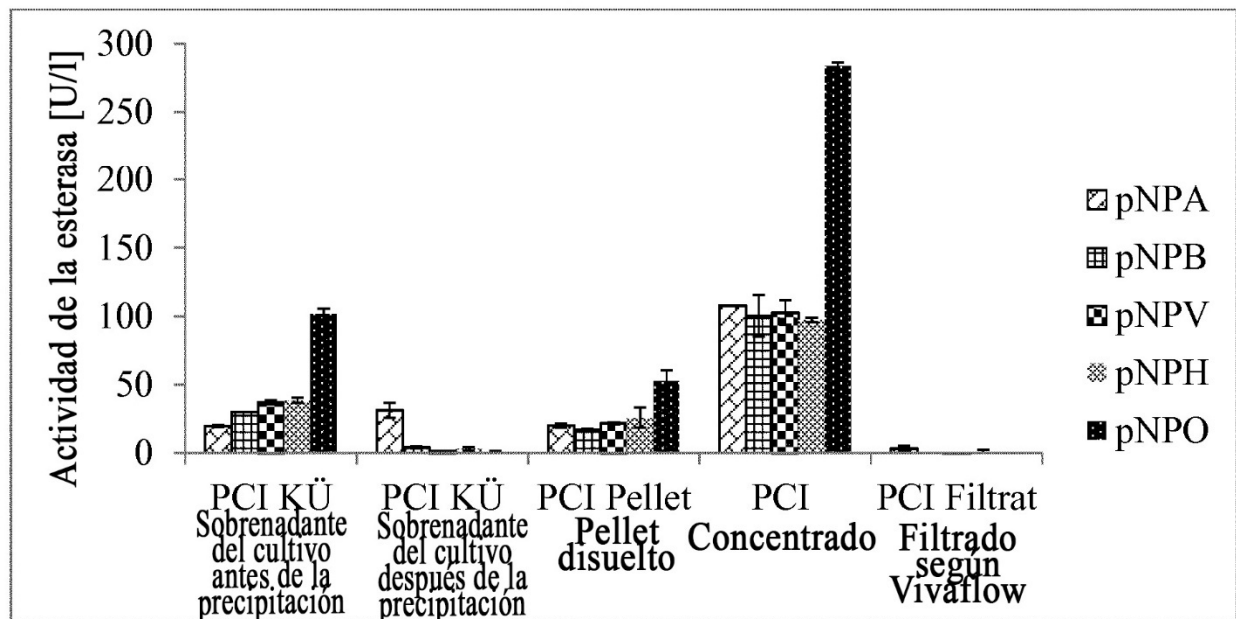
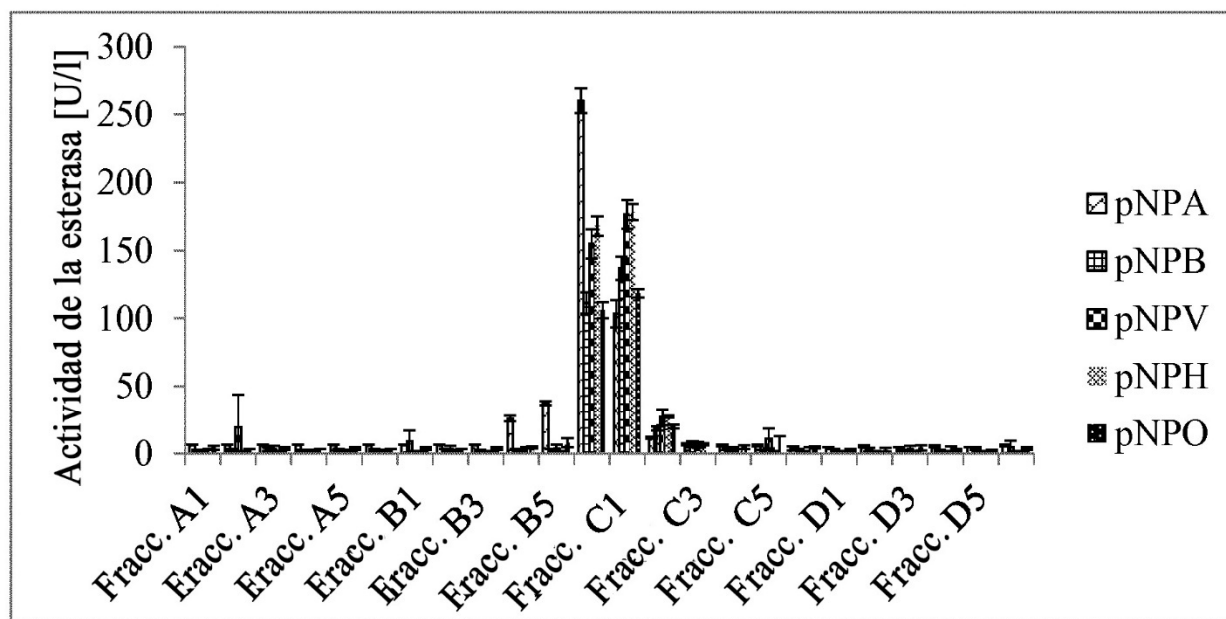


Fig. 3 A



B

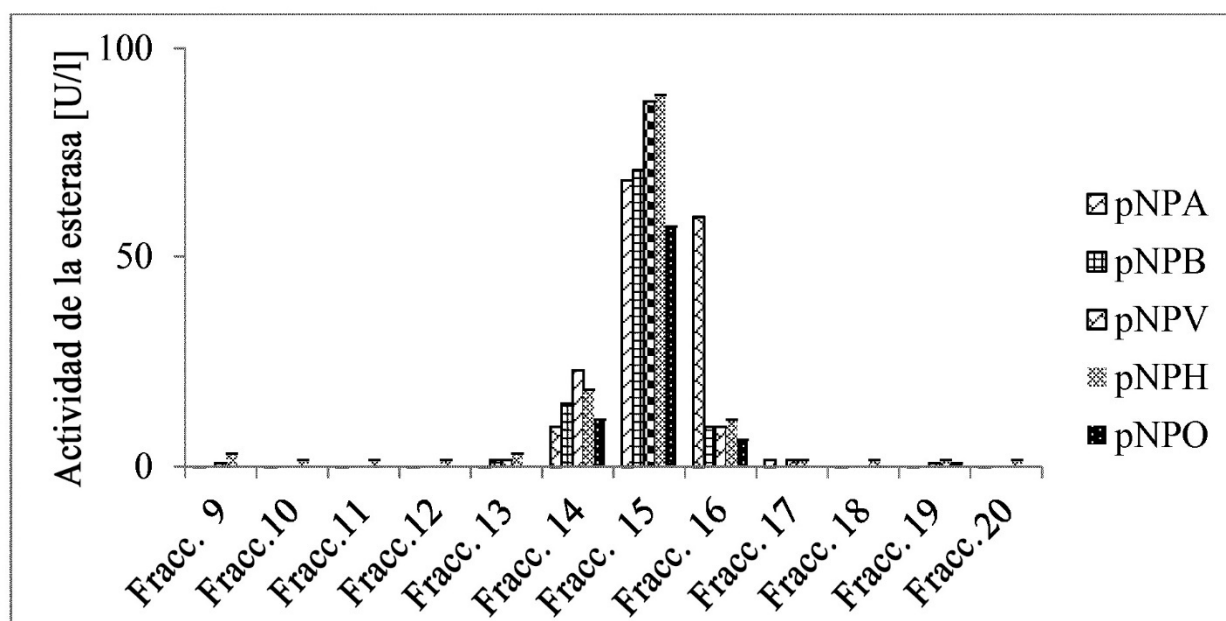
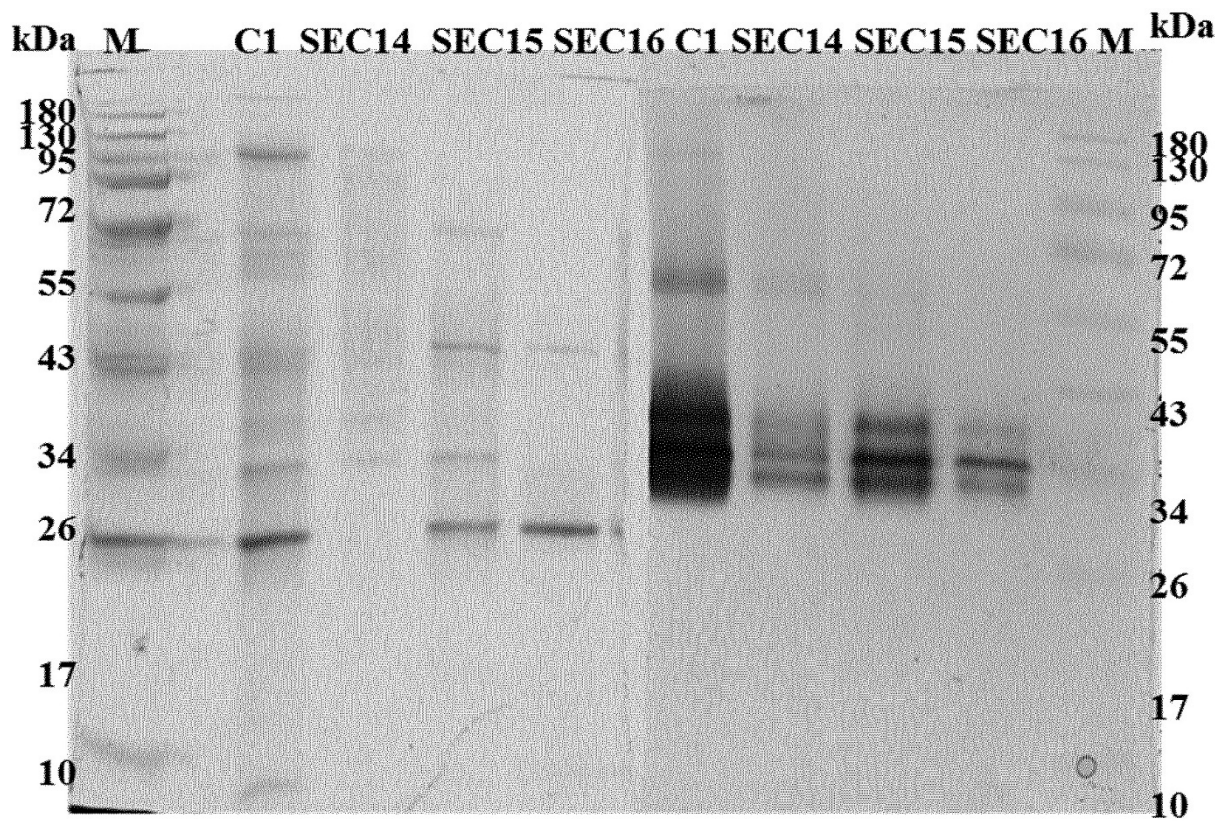


Fig. 4 A



B

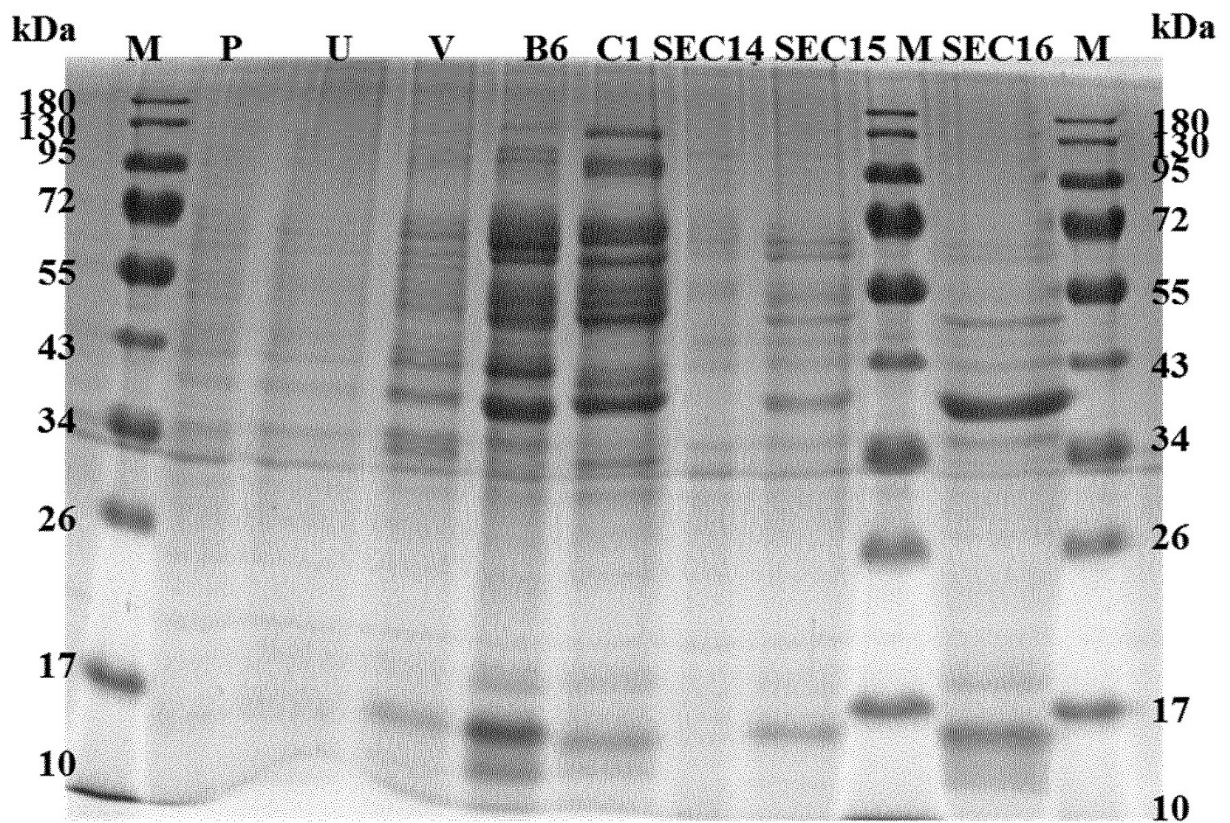
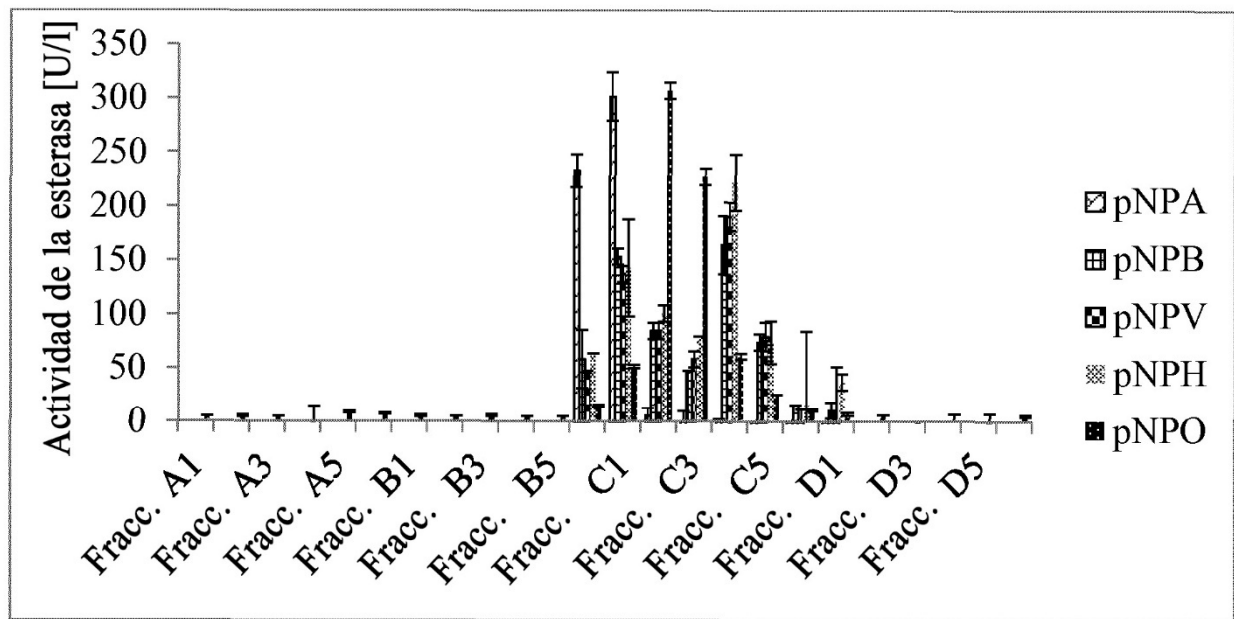


Fig. 5 A



B

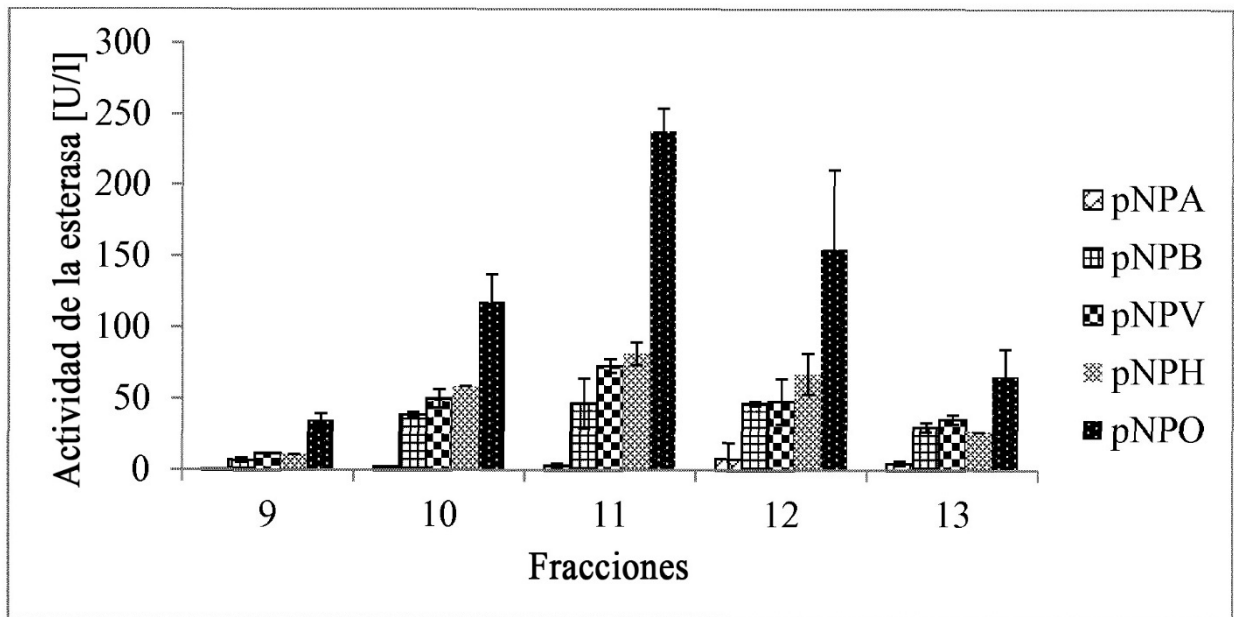
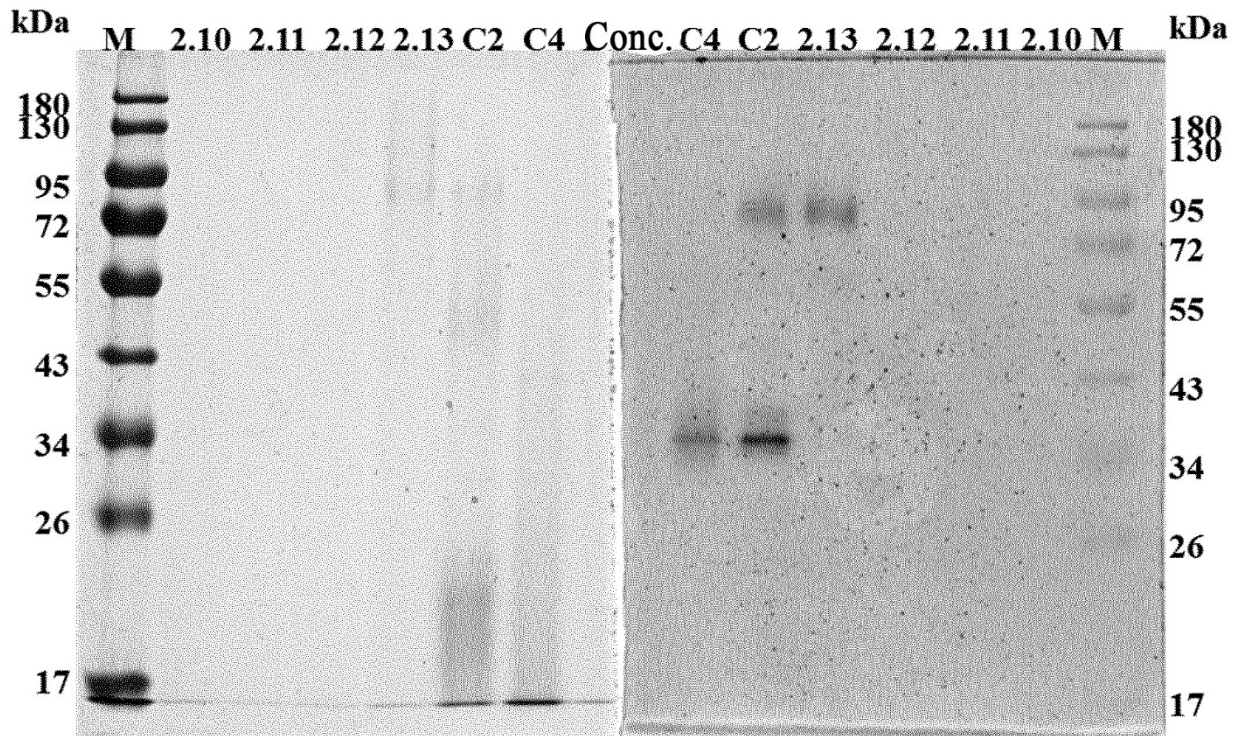


Fig. 6 A



B

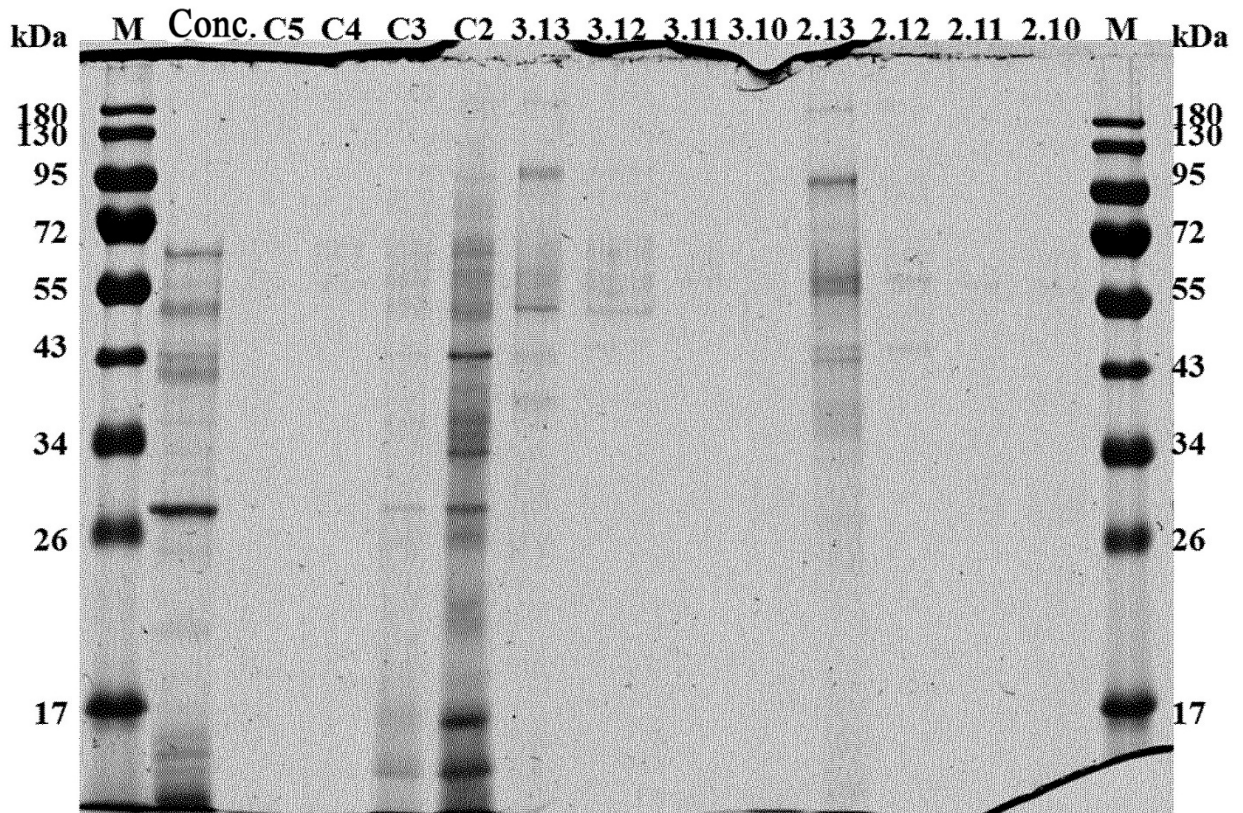


Fig. 7 A

10	20	30	40	50
MTRAPLPHLS	HHGPTSEDCL	TINVVKPANV	EEGAQLPVVA	VSSFEEVGGTS
60	70	80	90	100
EYNGTSIVSR	SLELQEPVIY	VSFNYRLNGF	GFLASKEVKE	AGVGNLGLQD
110	120	130	140	150
<u>QRLALKWIK</u>	<u>YVGAFGGDPT</u>	KVTIWGESAG	AEAVVYHMVS	NDGNTEGLYR
160	170	180	190	200
AAFAQSGSVG	SYGGLENGQD	AYDGIVNKTG	<u>CSNASDTLAC</u>	<u>LRTADFDTLK</u>
210	220	230	240	250
<u>AAIDEAEFVW</u>	<u>TPREFDGALES</u>	<u>DLPQNLIQ</u>	KVADVPLITG	NCGDEGTLYS
260	270	280	290	300
ISYNISTDAE	FKTFLQTRWL	PTASDAEIDR	<u>LLALYPSDPS</u>	<u>QGSFPDGTSD</u>
310	320	330	340	350
<u>NAITPQYKRS</u>	<u>AALLGDILLEQ</u>	<u>TSRRYLINEL</u>	<u>SGKQDIYTYI</u>	HNRQRRLPVL
360	370	380	390	400
GSFHASDLVN	VYGGGDMSDY	LIRFVATLDP	<u>NGNTGISWPK</u>	<u>WTSEAPNMLA</u>
410	420	430	440	450
<u>FSDDEAVPLS</u>	<u>LTEDTYRKEA</u>	MAASGMIQSC	YIYVWQRQIK	TLLEAYVYGR
460	470	480	490	500
YPDRASEKVT	ATRTLNTVSI	TVTAKGKTGR	FSATLALPSR	ASKNKPVPVAV
510	520	530	540	550
IVIGFADSTF	LNNGIAQATF	DANSVAADST	SKTGAFHNIY	SEDIGSLLAW
560	570	580	590	600
GWGSHRVLDA	LELVAPEIDS	TRVGVMGCSR	YGKGALAAGI	FDDRLVETKG
610	620	630	640	650
LAPWSRLFHG	GQKRACKTTY	RMRIVFPWMP	ISLPLLLLRA	LPFGIKMNPE
660	670	680	690	700
GVAGVTFPAT	QMVKFLGAE	ENVGVALRNS	GHCDPSGTNN	VLDFVKSVLL
		710	720	
		GSQRTNYTT	ISPYQAHPEA	YPWAI

Fig. 7 B

```

FVE_gDNA      MTRAPLPHLSHHGPTSEDCLTINVVKPANVEEGAQLPVVAVSSFEVGGTSEYNGTSIVSR 60
FVE_UniProt    MTRAPLPHLSHHGPTSEDCLTINVVKPANVEEGAQLPVVAVSSFEVGGTSEYNGTSIVSR 60
*****

FVE_gDNA      SLELQEPVIYVSFNYRLNGFGFLASKEVKEAGVGNLGLQDQRLALKWIKYVGAFGGDPT 120
FVE_UniProt    SLELQEPVIYVSFNYRLNGFGFLASKEVKEAGVGNLGLQDQRLALKWIKYVGAFGGDPT 120
*****

FVE_gDNA      KVTIWGESAGAEAVVYHMSNDGNTGLYRAAFAQSGSVGSYGGLENGQDAYDGIVNKTG 180
FVE_UniProt    KVTIWGESAGAEAVVYHMSNDGNTGLYRAAFAQSGSVGSYGGLENGQDAYDGIVNKTG 180
*****

FVE_gDNA      CSNASDTLACLRTADFDTLKAAIDEAEFVWTPRFDGALFSDLPQNLILQGVADVPLITG 240
FVE_UniProt    CSNASDTLACLRTADFDTLKAAIDEAEFVWTPRFDGALFSDLPQNLILQGVADVPLITG 240
*****

FVE_gDNA      NCGDEGTLYSISYNISTDAEFKTLQTRWLPTASDAEIDRLLALYPSDPSQGSFPDTGSD 300
FVE_UniProt    NCGDEGTLYSISYNISTDAEFKTLQTRWLPTASDAEIDRLLALYPSDPSQGSFPDTGSD 300
*****

FVE_gDNA      NAITPQYKRSAALLGDLDFQTSRRYLINELSGKQDIYTYIHNRRQLPVLGSPHSDLVN 360
FVE_UniProt    NAITPQYKRSAALLGDLDFQTSRRYLINELSGKQDIYTYIHNRRQLPVLGSPHSDLVN 360
*****

FVE_gDNA      VYGSGDMADYLIRFVATLDPNGNTGISWPKWTSEAPNMLAFSDDEAVPLSLTEDTYRKEA 420
FVE_UniProt    VYGSGDMSDYLRIFVATLDPNGNTGISWPKWTSEAPNMLAFSDDEAVPLSLTEDTYRKEA 420
***.***:*****

FVE_gDNA      MAASGMTQSCYIYVWQRQIKALLEAYVYGRYPDRSSEKVTATRTGNTVSITVTAKGKTGR 480
FVE_UniProt    MAASGMIQSCYIYVWQRQIKTLLLEAYVYGRYPDRASEKVTATRTLNTVSITVTAKGKTGR 480
***** *****:*****:***** *****

FVE_gDNA      FSATLALPSGASNDKFPVPAVIVIGFADSTFLNNGIAQATFDANSVAADSTSKTGAFRNIY 540
FVE_UniProt    FSATLALPSRASKNKPVPAVIVIGFADSTFLNNGIAQATFDANSVAADSTSKTGAFHNIY 540
***** **:*****:*****

FVE_gDNA      SEDAGSLLAWGWGSHRVLDALVELVAPEIDSTRVGVMGCSRYGKGALAAGIFDDRLVETKG 600
FVE_UniProt    SEDIGSLLAWGWGSHRVLDALVELVAPEIDSTRVGVMGCSRYGKGALAAGIFDDRLVETKG 600
*** *****

FVE_gDNA      LAPWSRFLGGQKRACKTISPMRIVFPWMPTSSPLLLPRAPQFGIKMNPEGVAGVTFPAT 660
FVE_UniProt    LAPWSRFLHGGQKRACKTTYRMRIVFPWMPISLPLLLLRALPFGIKMNPEGVAGVTFPAT 660
***** ***** * **** * *****

FVE_gDNA      QAVYKFLGAEANIGVALRNSGHCDPSGTTNVLD FVKSVLLGSQRTNRNYTTISPYQAHPEA 720
FVE_UniProt    QMVYKFLGAEENVGVALRNSGHCDPSGTTNVLD FVKSVLLGSQRTNRNYTTISPYQAHPEA 720
* ***** *:*****.*****

FVE_gDNA      YPWAI 725
FVE_UniProt    YPWAI 725
*****

```

Fig. 8

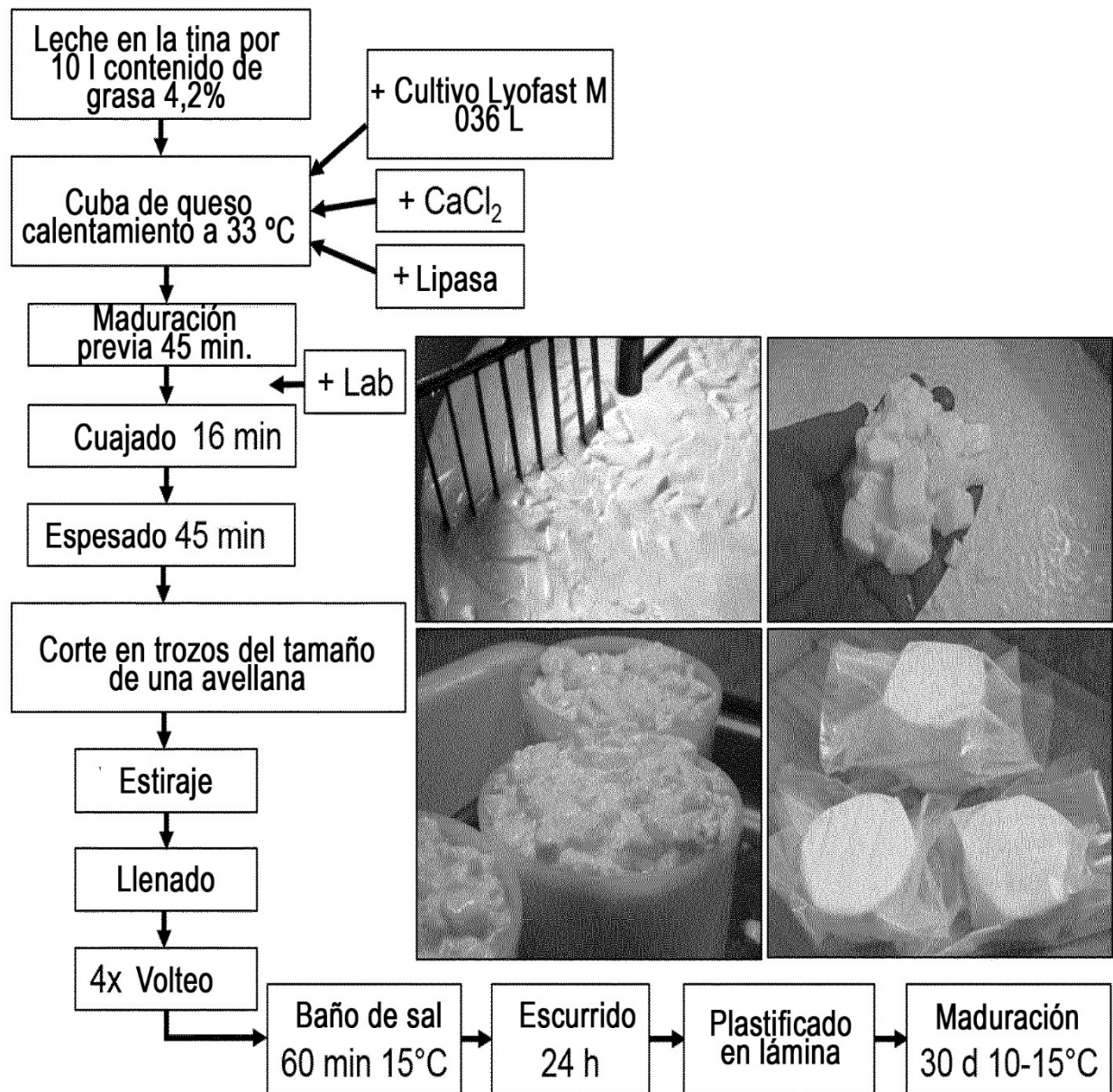


Fig. 9 A

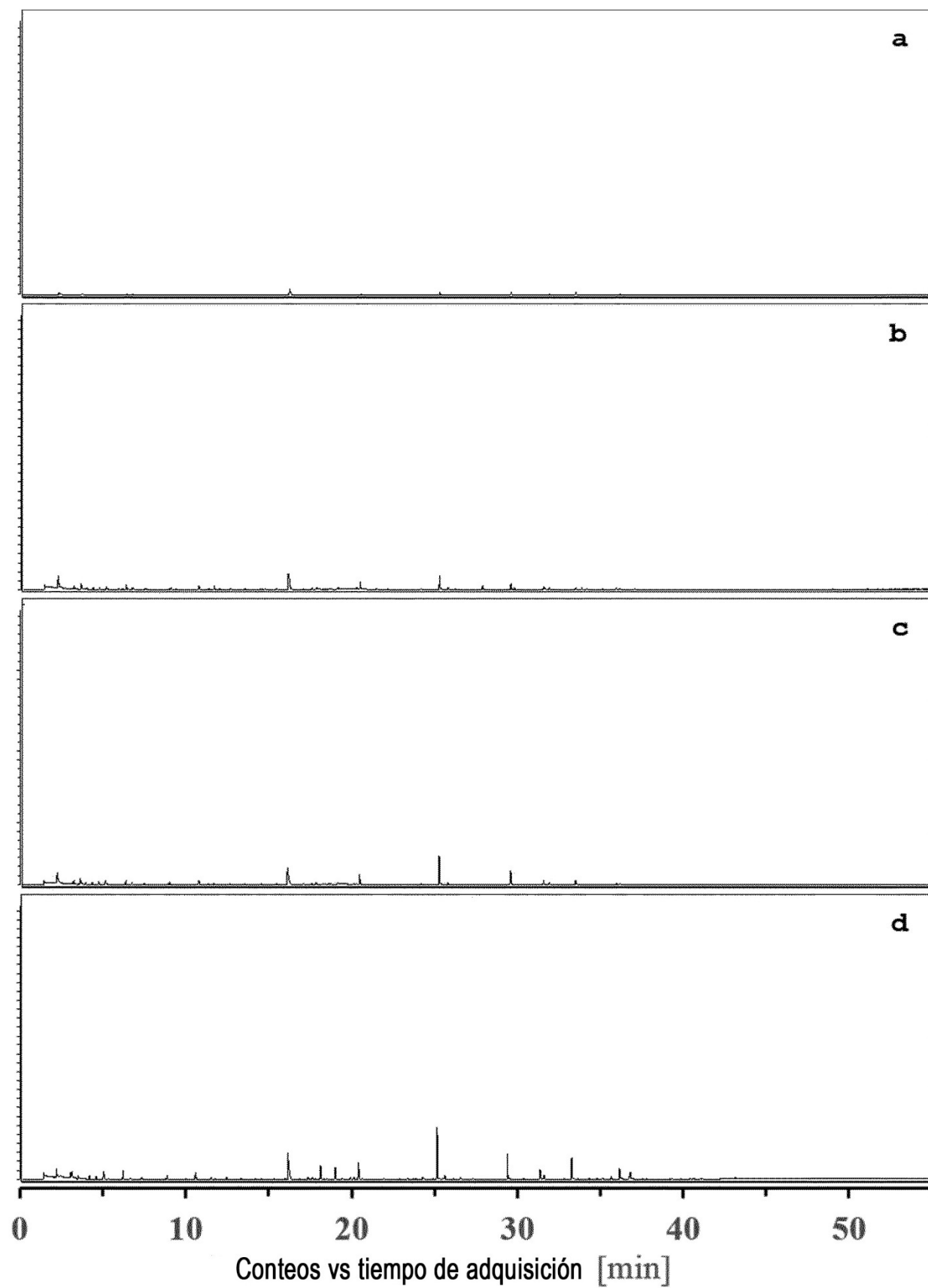


Fig. 9 B

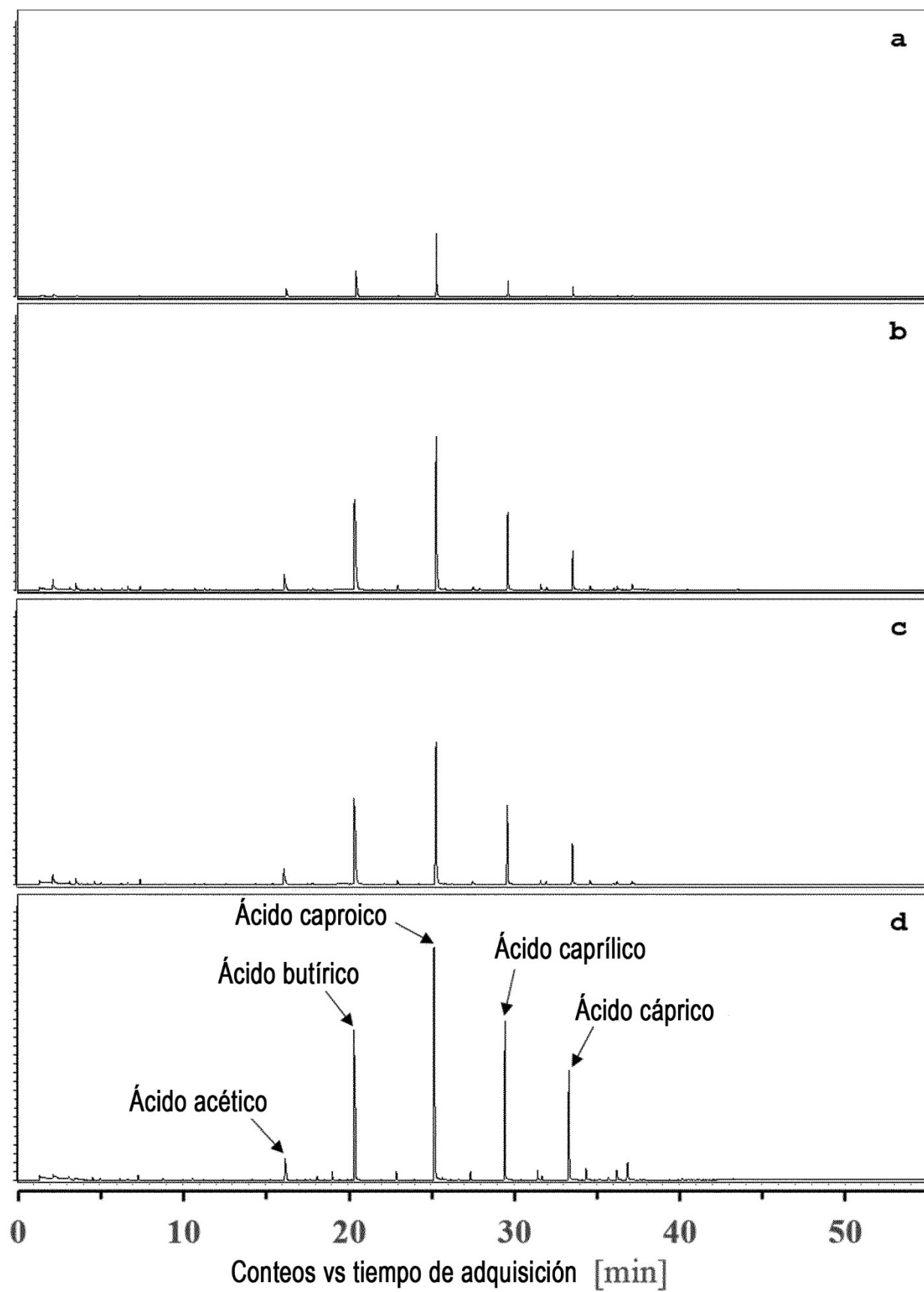


Fig. 9 C

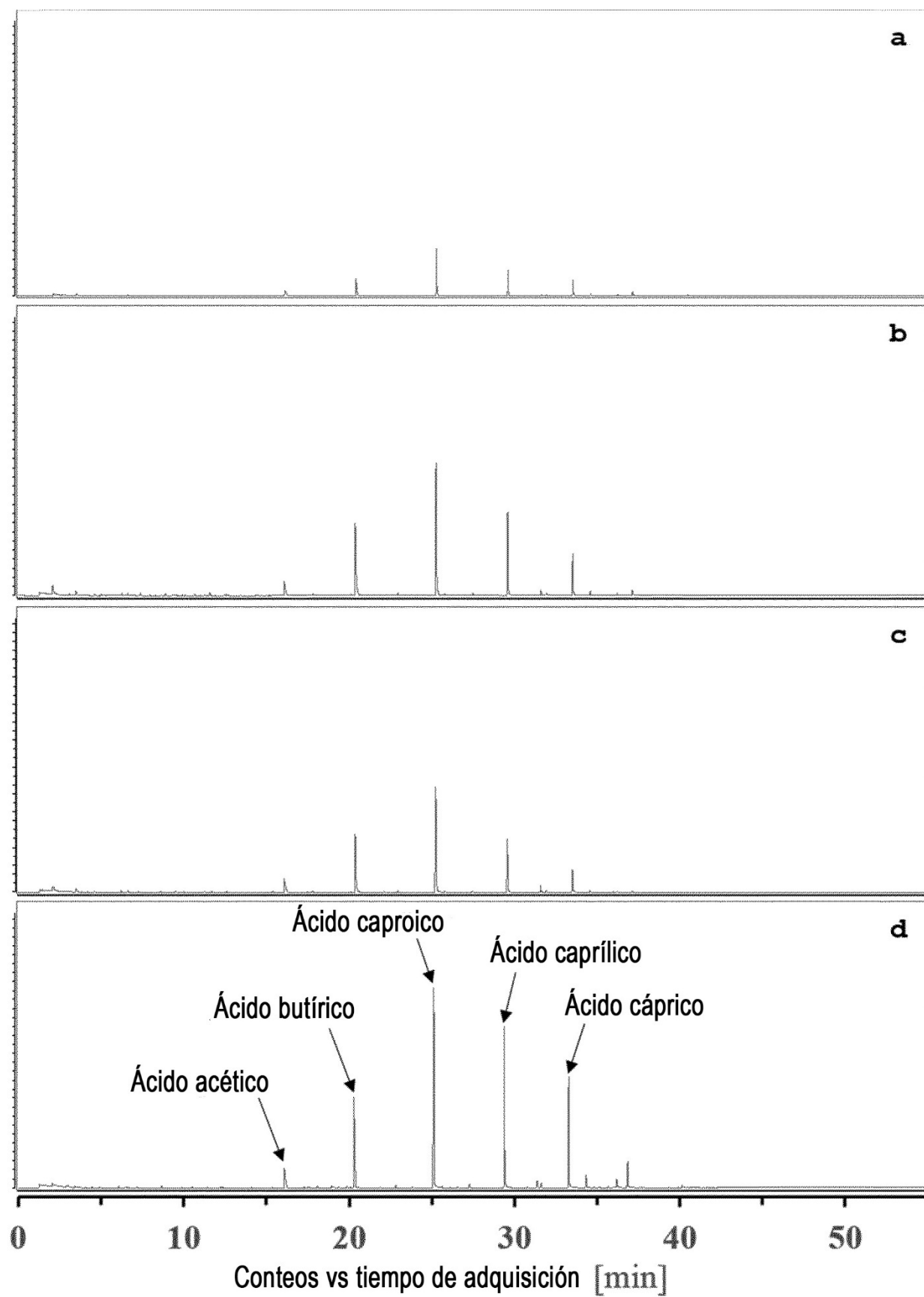


Fig. 9 D

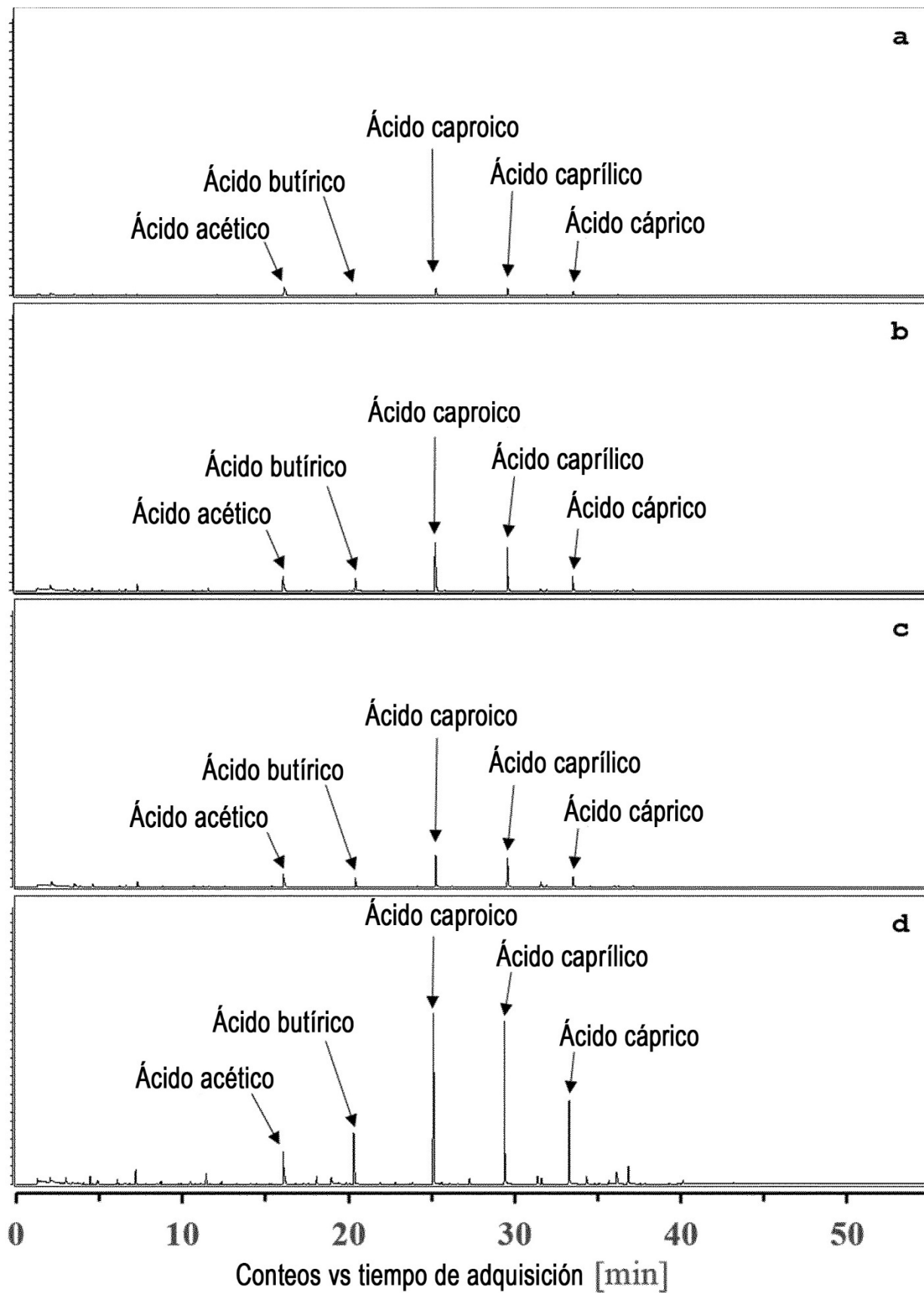


Fig. 9 E

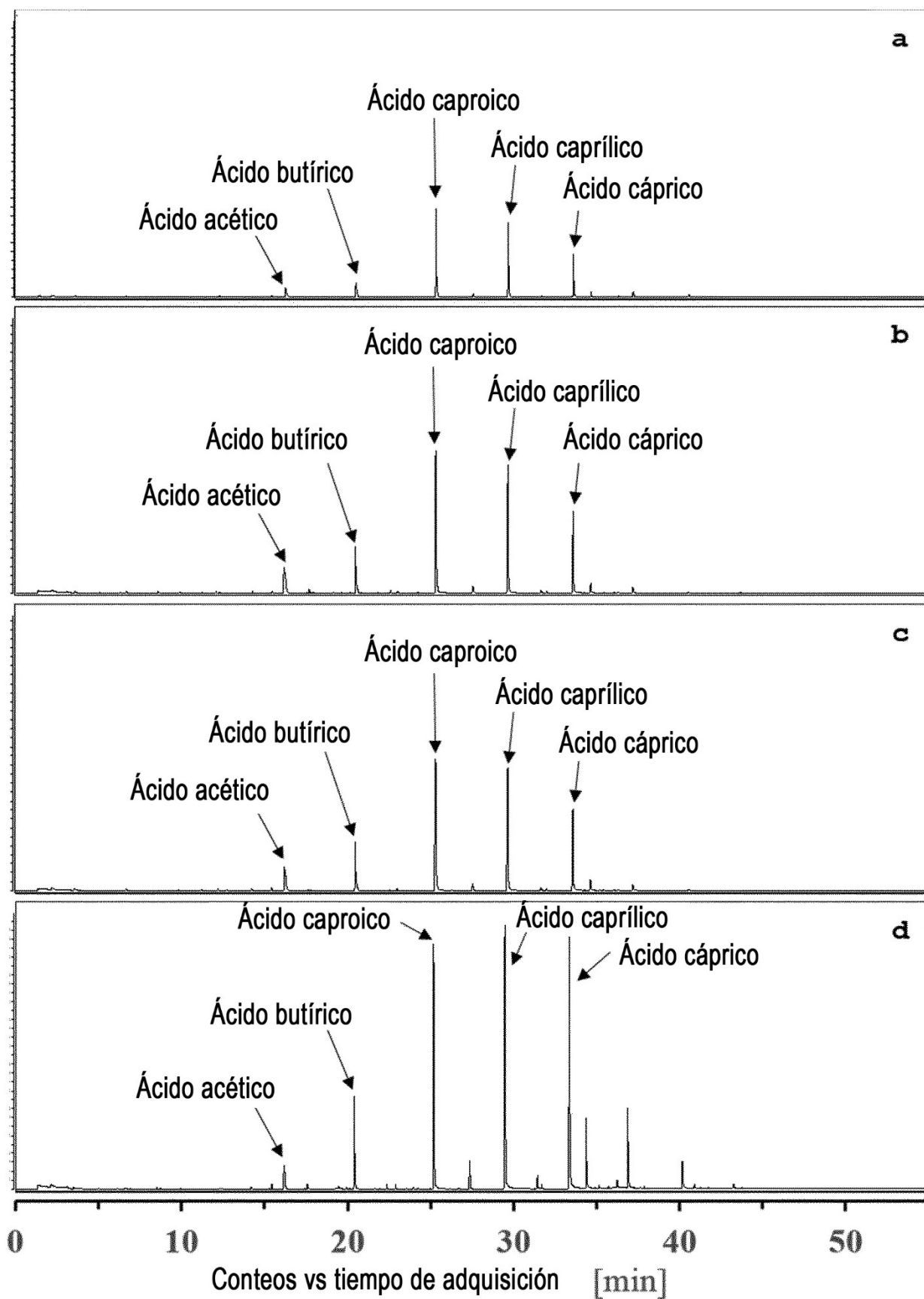
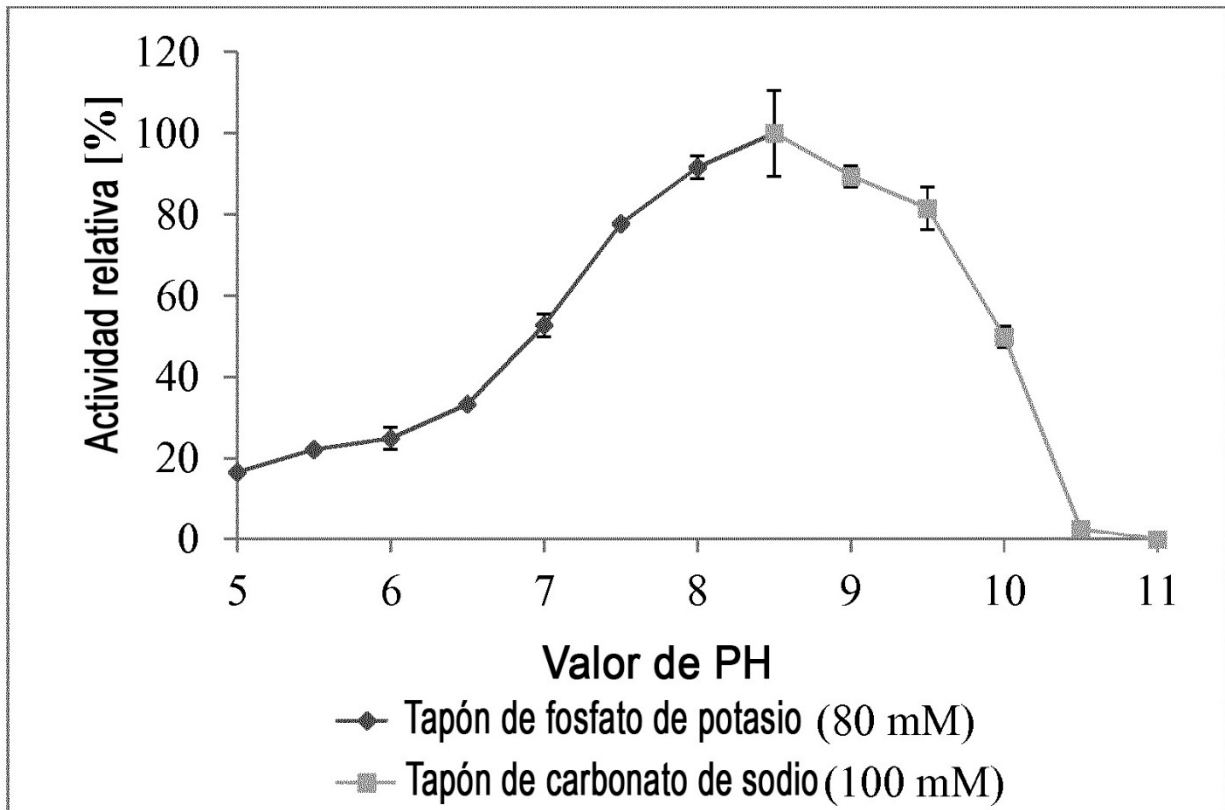


Fig. 10 A



B

