



①9



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

①1 Número de publicación: **2 351 426**

⑤1 Int. Cl.:

A21D 8/04 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

①2

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑨6 Número de solicitud europea: **05718349 .3**

⑨6 Fecha de presentación : **10.03.2005**

⑨7 Número de publicación de la solicitud: **1722636**

⑨7 Fecha de publicación de la solicitud: **22.11.2006**

⑤4 Título: **Enzimas lipolíticas fúngicas.**

③0 Prioridad: **12.03.2004 GB 0405637**
02.04.2004 US 559149 P

④5 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.02.2011

④5 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.02.2011

⑦3 Titular/es: **DANISCO A/S**
Langebrogade 1, P.O. Box 17
1001 Copenhagen K., DK

⑦2 Inventor/es: **Brunstedt, Janne;**
Søe, Jørn, Borch;
Pedersen, Henrik y
Mikkelsen, Jørn, Dalgaard

⑦4 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

Enzimas lipolíticas fúngicas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a nuevas enzimas lipolíticas fúngicas y a uno o más polinucleótidos que codifican una o más enzimas lipolíticas fúngicas nuevas. La invención se refiere además a procedimientos de producción de enzimas lipolíticas fúngicas y a sus utilizaciones. La presente invención se refiere además a la preparación de una sustancia alimenticia mejorada, en particular a la preparación de productos de panadería mejorados. Específicamente, la invención proporciona nuevas enzimas lipolíticas fúngicas, enzimas que pueden proporcionar características mejoradas a los productos alimenticios, incluyendo los productos de panadería.

Antecedentes de la técnica

15 La utilización beneficiosa de las enzimas lipolíticas (E.C.3.1.1.x) en aplicaciones industriales de alimentación y/o piensos se ha conocido hace muchos años.

Por ejemplo, en la patente EP 0 585 988 se reivindica que la adición de lipasa a la masa producía una mejora en el efecto antiendurecimiento. Se sugiere que cuando se añade a la masa una lipasa obtenida a partir de *Rhizopus arrhizus* puede mejorar la calidad del pan resultante cuando se utiliza en combinación con manteca/grasa. El documento WO 94/04035 da a conocer que puede obtenerse una blandura mejorada en el pan añadiendo una lipasa a la masa sin adición de ninguna grasa o aceite adicional a la masa. Castello, P. ESEGP 89-10 de dic. de 1999, Helsinki, demuestra que las lipasas exógenas pueden modificar el volumen del pan.

25 El sustrato para las lipasas en la harina de trigo es el 1,5 al 3% de lípidos de trigo endógenos, que son una mezcla compleja de lípidos polares y apolares. Los lípidos polares pueden dividirse en glucolípidos y fosfolípidos. Estos lípidos están constituidos por glicerol esterificado con dos ácidos grasos y un grupo polar. El grupo polar contribuye a la actividad en superficie de estos lípidos. La escisión enzimática de uno de los ácidos grasos en estos lípidos conduce a lípidos con una actividad superficial mucho mayor. Es bien sabido que los emulsionantes, tales como DATEM, con gran actividad superficial son muy funcionales cuando se añaden a la masa.

35 Las enzimas lipolíticas hidrolizan uno o más de los ácidos grasos procedentes de los lípidos presentes en el alimento lo que puede producir la formación de moléculas de emulsionantes potentes dentro de la sustancia alimenticia lo que proporciona funcionalidad comercialmente valiosa. Las moléculas que contribuyen a la mayoría de las características del emulsionante significativas, son los productos de la hidrólisis parcial, tales como, moléculas de lisofosfolípidos, lisoglucolípidos y de monoglicéridos. Los productos de la hidrólisis de lípidos polares, a saber lisofosfolípidos y lisoglucolípidos, son particularmente ventajosos, en la elaboración del pan, dichos emulsionantes derivados *in situ* pueden proporcionar funcionalidad equivalente como emulsionantes añadidos, tal como DATEM.

40 Sin embargo, se ha descubierto que además la actividad de las enzimas lipolíticas produce acumulación de ácidos grasos libres, lo que puede conducir a funcionalidad perjudicial en la sustancia alimenticia. Esta actividad propia de las enzimas lipolíticas limita su funcionalidad.

45 El efecto negativo sobre el volumen del pan, se explica con frecuencia por sobredosis. La sobredosis puede conducir a una disminución en la elasticidad del gluten, lo que produce una miga que es demasiado rígida y de este modo produce volúmenes reducidos. Además, o alternativamente, dichas lipasas pueden degradar la manteca, el aceite o la grasa de leche añadidos a la masa, causando una pérdida de sabor en la masa y el producto horneado. La sobredosis y la falta de sabor se han atribuido a la acumulación de ácidos grasos libres en la masa, particularmente los ácidos grasos de cadena corta.

55 La presencia de grandes concentraciones de ácidos grasos libres (FFA) en las materias primas o los productos alimenticios es generalmente reconocida como un defecto de calidad y los procesadores de alimentos y clientes incluirán normalmente una concentración de FFA máxima en las especificaciones de alimentos. Los efectos resultantes de las concentraciones en exceso de FFA pueden estar en los defectos organolépticos y/o funcionales.

60 En la patente EP 1 193 314, se descubrió que la utilización de enzimas lipolíticas activas sobre glucolípidos era particularmente beneficiosa en las aplicaciones en la elaboración del pan, ya que los lisoglucolípidos productos de la hidrólisis parcial se descubrió que presentan una funcionalidad del emulsionante muy alta, dando como resultado aparentemente una producción superior a la funcionalidad positiva del emulsionante en comparación con la acumulación perjudicial de ácidos grasos libres. Sin embargo, se descubrió que las enzimas también tienen actividad no selectiva significativa sobre los triglicéridos, lo que da como resultado ácidos grasos libres innecesariamente elevados.

65 Este problema de gran actividad de triglicéridos fue estudiado en el documento WO 02/094123, en el que se descubrió que seleccionando enzimas lipolíticas que eran activas sobre los lípidos polares (glucolípidos y fosfolípidos en una masa) pero sustancialmente inactivas sobre los triglicéridos o los 1-monoglicéridos, podía conseguirse una funcionalidad mejorada.

Una fuente comercialmente preferida de enzimas lipasa, son los hongos filamentosos tales como *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.* Se ha descubierto que las lipasas aisladas de los hongos filamentosos tienen características industrialmente aplicables y además se ha descubierto que son una rutina que se expresa en sistemas de producción heterólogos, tales como en *Aspergillus oryzae*, *Fusarium* y levadura.

Una lipasa procedente de *Fusarium oxysporum* se identificó en la patente EP 0 130 064, y la aplicación de las lipasas de *F. oxysporum* en aplicaciones alimentarias se ha sido sugerida en Hoshino *et al.*, (1992) *Biosci. Biotech. Biochem* 56: 660-664.

La patente EP 0 869 167 describe la clonación y expresión de una lipasa de *Fusarium oxysporum* y su utilización en la cocción. Está descrito que la enzima presenta actividad de fosfolipasa. Esta enzima está comercializada actualmente por Novozymes A/S (Dinamarca) como Lipopan FTM.

El documento WO 02/00852 da a conocer cinco enzimas lipasa y sus polinucleótidos codificadores, aisladas de *F. venenatum*, *F. sulphureum*, *A. berkeleyanum*, *F. culmorum* y *F. solani*. Se describe que las cinco enzimas presentan actividad hidrolizante de triacilglicerol, actividad de fosfolipasa y de galactolipasa. Tres de las enzimas presentan actividad equivalente a la de la enzima *F. oxysporum* dada a conocer en la patente EP 0 869 167: *F. venenatum*, *F. sulphureum* y *F. culmorum*.

Por consiguiente, es evidente que algunas lipasas de *Fusarium*, incluyendo Lipopan FTM, se ha descubierto que tienen actividad secundaria sobre los lípidos polares, incluyendo los fosfolípidos y los glucolípidos. Aunque descrita como una fosfolipasa en la patente EP 0 869 167, la lipasa procedente de *Fusarium oxysporum* presenta gran actividad de lipasa. La enzima además presenta actividad de glucolipasa. Sin embargo, a pesar de la significativa actividad sobre los lípidos polares, la funcionalidad conseguida mediante la utilización de la enzima es limitada debido a la gran actividad de lipasa (es decir, de triglicérido).

Nagao *et al.* (*J. Biochem* 116 (1994) 536-540) describen una lipasa procedente de *F. heterosporum*; enzima que funciona predominantemente como una lipasa (E.C.3.1.1.3) para hidrolizar triglicéridos. Esto es muy diferente de las enzimas según la presente invención.

Se han producido variantes de enzima lipolítica, con sustituciones y fusiones de aminoácidos específicos, algunas de las cuales tienen una actividad aumentada sobre los lípidos polares en comparación con las enzimas originales naturales. El documento WO 01/39602 describe dicha variante, mencionada como SP979, que es una fusión de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* y la lipasa de *Fusarium oxysporum* descrita en la patente EP 0 869 167. Esta variante se ha descubierto que tiene una proporción significativamente alta de actividad sobre fosfolípidos y glucolípidos en comparación con los triglicéridos.

Sin embargo, antes de la presente invención, las enzimas lipolíticas fúngicas naturales, particularmente de *Fusarium spp.*, que tienen una proporción alta de actividad sobre los fosfolípidos polares en comparación con los triglicéridos, no habían sido dadas a conocer.

Sumario de la invención

En un aspecto amplio la presente invención se refiere a una enzima lipolítica fúngica que tiene una proporción mayor de actividad sobre los lípidos polares (fosfolípidos y/o glucolípidos) en comparación con los triglicéridos. En particular una proporción mayor de actividad sobre los glucolípidos en comparación con los triglicéridos.

En un aspecto aún más amplio la presente invención se refiere a una enzima lipolítica fúngica que tiene una proporción mayor de actividad sobre los lípidos polares (fosfolípidos y/o glucolípidos) en comparación con los triglicéridos. En particular una proporción mayor de actividad sobre los glucolípidos en comparación con los triglicéridos.

En un aspecto aún más amplio, la presente invención se refiere a un ácido nucleico que codifica una nueva enzima lipolítica fúngica, tal se da a conocer en la presente memoria.

En un aspecto amplio, la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una sustancia alimenticia, preferentemente un sustancia alimenticia a base de huevo, comprendiendo el procedimiento la adición de una enzima lipolítica fúngica de la presente invención a uno o más ingredientes de la sustancia alimenticia.

La presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de una masa, comprendiendo el procedimiento la adición de una enzima lipolítica fúngica de la presente invención a uno o más ingredientes de la masa y mezclado para formar una masa.

Otro aspecto amplio de la presente invención se refiere a un procedimiento de preparación de un producto horneado a partir de una masa, comprendiendo el procedimiento la adición de una enzima lipolítica fúngica de la presente invención a la masa.

Se proporciona además un procedimiento de preparación de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención, comprendiendo el procedimiento la transformación de una célula hospedadora con un ácido nucleico recom-

binante que comprende una codificación de la secuencia nucleotídica para la enzima lipolítica fúngica, pudiendo la célula hospedadora de expresar la secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de la enzima lipolítica fúngica, cultivando la célula hospedadora transformada en condiciones en las que se expresa el ácido nucleico y recogiendo la enzima lipolítica fúngica.

En otro amplio aspecto, la invención proporciona una enzima lipolítica que conserva actividad a bajas temperaturas, es decir, es una enzima lipolítica a baja temperatura.

Los aspectos de la presente invención se presentan en las reivindicaciones y en la exposición siguiente.

Otros aspectos que hacen referencia a las secuencias nucleotídicas que pueden utilizarse en la presente invención incluyen: un montaje que comprende las secuencias de la presente invención; un vector que comprende las secuencias para su utilización en la presente invención; un plásmido que comprende las secuencias de utilización en la presente invención; una célula transformada que comprende las secuencias para su utilización en la presente invención; un tejido transformado que comprende las secuencias para su utilización en la presente invención; un órgano transformado que comprende las secuencias para su utilización en la presente invención; un hospedador transformado que comprende las secuencias para su utilización en la presente invención; un organismo transformado que comprende las secuencias para su utilización en la presente invención. La presente invención, incluye además procedimientos de expresión de la secuencia nucleotídica para su utilización en la presente invención utilizando los mismos, tal como la expresión en una célula hospedadora; incluyendo procedimientos para transferir la misma. La presente invención, incluye además, procedimientos de aislamiento de la secuencia nucleotídica, tal como el aislamiento de una célula hospedadora.

Otros aspectos que hacen referencia a las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención incluyen: un montaje que codifica las secuencias de aminoácidos de la presente invención; un vector que codifica las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; un plásmido que codifica las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; una célula transformada que expresa las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; un tejido transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; un órgano transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; un hospedador transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención; un organismo transformado que expresa las secuencias de aminoácidos para su utilización en la presente invención. La presente invención, incluye además procedimientos de purificación de la secuencia de aminoácidos para su utilización en la presente invención utilizando los mismos, tal como la expresión en una célula hospedadora; incluyendo procedimientos para transferir la misma y a continuación purificando dicha secuencia.

Para facilidad de referencia, éstos y más aspectos de la presente invención se exponen a continuación bajo encabezamientos del apartado apropiado. Sin embargo, lo dado a conocer en cada apartado, no está necesariamente limitado a cada apartado específico.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a una enzima lipolítica fúngica natural que tiene una relación mayor de actividad sobre lípidos polares en comparación con los triglicéridos.

En un aspecto, la presente invención proporciona una enzima lipolítica fúngica que comprende una secuencia de aminoácidos como la representada en SEC. ID. n° 1, SEC. ID. n° 2, SEC. ID. n° 4 o SEC. ID. n° 6, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad con éstas y en la que la enzima tiene una proporción mayor de actividad sobre lípidos polares en comparación con los triglicéridos.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una enzima lipolítica fúngica que comprende una secuencia de aminoácidos como la mostrada en SEC. ID. n° 1, SEC. ID. n° 2, SEC. ID. n° 4 o SEC. ID. n° 6, o una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90% de identidad con éstas.

La SEC. ID. n° 1 es representada en la figura 37, la SEC. ID. n° 2 es representada en la figura 38, la SEC. ID. n° 4 es representada en la figura 40 y la SEC. ID. n° 6 es representada en la figura 42.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona un ácido nucleico que codifica una enzima lipolítica fúngica, ácido nucleico que se selecciona de entre el grupo constituido por:

- un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica representada en la SEC. ID. n° 3, la SEC. ID. n° 5 o la SEC. ID. n° 7;
- un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia nucleotídica de la SEC. ID. n° 3, la SEC. ID. n° 5 o la SEC. ID. n° 7; por degeneración del código genético; y
- un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que tiene por lo menos 90% de identidad con la SEC. ID. n° 3, la SEC. ID. n° 5 o la SEC. ID. n° 7.

ES 2 351 426 T3

La SEC. ID. n° 3 es representada en la figura 39; la SEC. ID. n° 5 es representada en la figura 41 y la SEC. ID. n° 7 es representada en la figura 43.

En otro aspecto la presente invención proporciona la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención para la preparación de una sustancia alimenticia, tal como, por ejemplo una masa, un producto horneado, un huevo, un producto a base de huevo, un producto de pasta, un producto de queso, un producto de tortilla, un producto de pienso para animales, un aceite vegetal o un producto comestible. De manera ventajosa, la adición de una enzima de la presente invención a la sustancia alimenticia puede conducir a una emulsificación mejorada con menor acumulación de ácidos grasos libres.

En un aspecto adicional la presente invención proporciona la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención en la preparación de una masa y/o de un producto horneado, que comprende la adición de dicha enzima lipolítica a la masa y (opcionalmente) la cocción de la masa para preparar un producto horneado para uno o más de los siguientes: reducción de la pegajosidad de la masa; mejora de la manejabilidad de la masa; reducción de la formación de ampollas durante la cocción del producto cocido; mejora del volumen y/o de la blandura del pan; alargamiento de la vida media del producto horneado y/o de la masa; mejora del efecto antiendurecimiento del producto horneado y/o de la masa; mejora de la estructura de la miga del producto horneado; reducción de la heterogeneidad del poro del producto horneado; mejora de la homogeneidad del poro del producto horneado; reducción del tamaño medio del poro del producto horneado; mejora del índice de gluten de la masa; mejora del sabor y/o del olor del producto horneado; mejora del color de la corteza del producto horneado.

De manera ventajosa, la enzima según la presente invención, puede tener actividad mayor que las enzimas lipolíticas convencionales a un pH bajo y de este modo puede ser aconsejada de manera más ventajosa para su utilización en un medio de la masa ácido de pH bajo que las enzimas lipolíticas convencionales.

En otro aspecto de la presente invención se suministra un procedimiento de elaboración de una miga y/o de un producto horneado que comprende añadir una enzima lipolítica fúngica según la presente invención a una masa y (opcionalmente) cocer la masa para hacer el producto horneado.

En un aspecto adicional de la presente invención se suministra la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención para la preparación de productos a base de huevo destinados a mejorar la textura, reducir el tamaño medio de partícula, reducir la distribución media de partículas, mejorando la estabilidad al calor, mejorando el comportamiento en microondas y/o la estabilidad.

En otro aspecto de la presente invención, se suministra un procedimiento de tratamiento del huevo o de un producto a base de huevo, procedimiento que comprende añadir una enzima lipolítica fúngica según la presente invención a un huevo o a un producto a base de huevo.

En otro aspecto de la presente invención, se suministra un procedimiento de preparación de pastas, o de una masa para pasta o de un producto a base de pasta, procedimiento que comprende añadir una enzima lipolítica fúngica según la presente invención a la pasta, a la masa para pasta o al producto a base de pasta.

En un aspecto de la presente invención, se suministra una utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención para la preparación de una pasta o de un producto a base de pasta, para una o más de entre la mejora de color/amarillez, la estabilización de las características del color, la reducción del brillo, la reducción del contenido en grasa, la mejora de la textura y el bocado (masticabilidad), reducción de la actividad del agua, reducción de la rotura, aumento de la firmeza del núcleo y mejora de la conservación de la forma durante el tratamiento.

En otro aspecto de la invención, se suministra un procedimiento de elaboración de una tortilla o de la masa de la tortilla, procedimiento que comprende añadir una enzima lipolítica fúngica según la presente invención a la tortilla o a la masa de la tortilla.

Un aspecto adicional de la presente invención, suministra la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención para la elaboración de una tortilla o una masa de la tortilla para mejorar la laminabilidad de una tortilla aumentando la elasticidad de una tortilla, mejorando las propiedades de antiendurecimiento de la tortilla y/o de la masa de la tortilla, mejorando la blandura y/o, reduciendo la falta de sabor en la tortilla y/o en la masa de la tortilla.

La funcionalidad de la enzima lipolítica en la tortilla y/o en las pastas puede mejorarse mediante la combinación con emulsionantes tales como DATEM.

En otro aspecto de la invención, se suministra un procedimiento de tratamiento de la leche, de la leche para queso, del queso o de un producto a base de queso, procedimiento que comprende añadir una enzima lipolítica fúngica según la presente invención al queso o al producto a base de queso.

La presente invención suministra además todavía la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención en la preparación de un queso o de un producto a base de queso para uno o más de entre mejorador de sabor, de textura y/o de estabilidad, disminuyendo el efecto de falta de aceitado en el queso y/o para aumentar el rendimiento del queso en la producción de queso.

ES 2 351 426 T3

En otro aspecto de la invención, se suministra un procedimiento de tratamiento de pienso para animales, procedimiento que comprende añadir una enzima lipolítica fúngica según la presente invención al pienso para animales.

5 La presente invención proporciona además la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención para la preparación de pienso para animales para mejorar uno o más de entre: la utilización del alimento y/o la eficacia de la conversión, la ganancia de peso corporal, la digestibilidad por absorción de nitrógeno, la capacidad de metabolización de la materia seca y la sensación en el paladar.

10 En un aspecto adicional de la presente invención, se suministra la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención en un procedimiento de preparación de un lisofosfolípido, por ejemplo lisolecitina mediante el tratamiento de un fosfolípidos (por ejemplo, lecitina) con la enzima para producir el producto de la hidrólisis parcial, es decir el liso fosfolípido.

15 En un aspecto de la presente invención, se suministra un procedimiento de preparación de un lisofosfolípido, por ejemplo lisolecitina, procedimiento que comprende tratar un fosfolípido (por ejemplo, lecitina) con la enzima lipolítica fúngica según la presente invención.

20 En un aspecto adicional de la presente invención, se suministra la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención en un procedimiento de preparación de un lisoglucolípido (por ejemplo digalactosil monoglicérido (DGMG) o monogalactosil monoglicérido (MGMG)) mediante tratamiento de un glucolípido (p.ej., digalactosil diglicérido (DGDG) o monogalactosil diglicérido (MGDG)) con la enzima lipolítica según la presente invención para producir el producto de hidrólisis parcial, es decir, el lisoglucolípido.

25 En un aspecto adicional todavía se suministra un procedimiento de preparación de un lisoglucolípido (por ejemplo digalactosil monoglicérido (DGMG) o monogalactosil monoglicérido (MGMG)), procedimiento que comprende el tratamiento de un glucolípido (p.ej., digalactosil diglicérido (DGDG) o monogalactosil diglicérido (MGDG)) con la enzima lipolítica según la presente invención.

30 La presente invención suministra además un procedimiento de desengomado enzimático de aceites vegetales o comestibles, que comprende el tratamiento del aceite comestible o vegetal con la enzima lipolítica fúngica según la presente invención a fin de hidrolizar una mayor parte de los lípidos polares (por ejemplo, fosfolípidos y/o glucolípidos).

35 Para evitar dudas, cualquier experto en la materia estaría enterado de la metodología adecuada para llevar a cabo el tratamiento enzimático de aceites comestibles (por ejemplo, véase la patente EP 0 869 167). El procedimiento conocido puede utilizarse adecuadamente cuando se lleva a cabo la presente invención, con la condición de que la enzima conocida esté sustituida por la enzima según la presente invención.

40 En un aspecto adicional la presente invención suministra la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención para la preparación de un aceite vegetal o un aceite comestible destinado a reducir la cantidad de fosfolípido en el aceite vegetal o en el aceite comestible mientras se mantiene el contenido en triglicéridos del aceite y/o se evita o se reduce la acumulación de ácidos grasos libres.

45 Todavía en otro aspecto la presente invención suministra la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención en un procedimiento que comprende el tratamiento de un fosfolípido a fin de hidrolizar grupos acilo graso.

50 En otro aspecto la presente invención suministra la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención en un procedimiento para reducir el contenido de un fosfolípido en un aceite comestible, que comprende el tratamiento del aceite con la enzima lipolítica fúngica según la presente invención con el fin de hidrolizar una mayor parte del fosfolípido, y separar una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado procedente del aceite.

55 En un aspecto adicional la invención proporciona una enzima lipolítica que conserva actividad a bajas temperaturas es decir una enzima lipolítica a baja temperatura. Los aspectos adicionales de la invención incluyen la utilización de una enzima lipolítica a baja temperatura en los procedimientos y utilizaciones descritos en la presente memoria, es decir, de la enzima lipolítica fúngica de la presente invención.

60 Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención, tiene una proporción mayor de actividad sobre los lípidos polares (por ejemplo, glucolípidos y/o fosfolípidos) que sobre los triglicéridos.

Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención, tiene una proporción mayor de actividad sobre los fosfolípidos que sobre los triglicéridos.

65 Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención, tiene una proporción mayor de actividad sobre los glucolípidos que sobre los triglicéridos.

Apropiadamente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención, puede tener una proporción mayor de actividad sobre glucolípidos y fosfolípidos que sobre triglicéridos.

Más preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención, tiene una proporción mayor de actividad sobre digalactosil diglicérido (DGDG) que sobre los triglicéridos.

Preferentemente la enzima lipolítica fúngica según la presente invención hidroliza DGDG o MGDG a DGMG o MGMG, respectivamente.

La expresión “mayor relación de actividad sobre lípidos polares” tal como se menciona en la presente memoria, hace referencia a que la enzima lipolítica fúngica según la presente invención, tiene una relación de actividad de hidrolización de lípido polar:triglicérido que es mayor en comparación con una enzima comercial Lipopan FTM (Novozymes A/S, Dinamarca).

La expresión “lípidos polares” tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a fosfolípidos y/o glucolípidos. Preferentemente, la expresión “lípidos polares” tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia tanto a fosfolípidos como a glucolípidos.

Las expresiones “relación mayor de actividad en glucolípidos” y “relación mayor de actividad de fosfolípidos” tal como se menciona en la presente memoria, hacen referencia a que la enzima lipolítica fúngica según la presente invención tiene una relación de actividad hidrolizante de glucolípido:triglicérido, o una relación de actividad hidrolizante de fosfolípido:triglicérido, respectivamente, que es mayor que la correspondiente relación conseguida con la enzima comercial Lipopan FTM (Novozymes A/S Dinamarca).

Preferentemente, la enzima lipolítica según la presente invención puede tener una relación de actividad hidrolizante lípido polar:triglicérido de por lo menos 4. Apropiadamente, la relación de actividad hidrolizante lípido polar:triglicérido puede ser superior a 5. Apropiadamente, la relación de actividad hidrolizante lípido polar:triglicérido puede ser superior a 8, preferentemente superior a 9, más preferentemente superior a 10 y aún más preferentemente superior a 15.

Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención puede tener una relación de actividad hidrolizante lípido polar:triglicérido de por lo menos 4. Apropiadamente, la relación de actividad hidrolizante lípido polar:triglicérido puede ser superior a 5. Apropiadamente, la relación de actividad hidrolizante lípido polar:triglicérido puede ser superior a 8, preferentemente superior a 9, más preferentemente superior a 10 y aún más preferentemente superior a 15.

Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención puede tener una relación de actividad hidrolizante glucolípido:triglicérido de por lo menos 1,5, preferentemente por lo menos de 1,8, preferentemente de por lo menos 2, preferentemente de por lo menos 3 y preferentemente de por lo menos 4. Apropiadamente, la relación de actividad hidrolizante glucolípido:triglicérido puede ser superior a 4. Apropiadamente, la relación de actividad hidrolizante glucolípido:triglicérido puede ser superior a 5.

En la presente memoria se da a conocer una enzima lipolítica fúngica con una actividad hidrolizante lípido polar:triglicérido de por lo menos 4. Apropiadamente, la relación de actividad hidrolizante lípido polar:triglicérido puede ser superior a 5. Apropiadamente, la relación de actividad hidrolizante lípido polar:triglicérido puede ser superior a 8, preferentemente superior a 9, más preferentemente superior a 10 y aún más preferentemente superior a 15.

En la presente memoria se da a conocer una enzima lipolítica fúngica con una actividad hidrolizante fosfolípido:triglicérido de por lo menos 4. Apropiadamente, la relación de actividad hidrolizante lípido polar:triglicérido puede ser superior a 5. Apropiadamente, la relación de actividad hidrolizante lípido polar:triglicérido puede ser superior a 8, preferentemente superior a 9, más preferentemente superior a 10 y aún más preferentemente superior a 15.

En la presente memoria se da a conocer una enzima lipolítica fúngica con una actividad hidrolizante glucolípido:triglicérido de por lo menos 1,5, preferentemente por lo menos de 1,8, preferentemente de por lo menos 2, preferentemente de por lo menos 3, preferentemente de por lo menos 4, preferentemente superior a 5, preferentemente superior a 5, preferentemente superior a 10 y preferentemente superior a 15.

Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención tiene por lo menos 1,5 veces más actividad frente a la actividad de lípidos polares (por ejemplo, fosfolipasa A2 (E.C.3.1.1.4) y/o a la actividad de fosfolipasa A1 (E.C.3.1.1.32) y/o a la actividad de glucolipasa (E.C.3.1.1.26)) en comparación con la actividad de triglicérido lipasa (E.C.3.1.1.3), más preferentemente por lo menos 2 veces, más preferentemente por lo menos 3 veces, más preferentemente por lo menos 4 veces.

Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención tiene por lo menos 1,5 veces más actividad glucolipasa, (E.C.3.1.1.26) en comparación con la actividad de triglicérido lipasa (E.C.3.1.1.3), más preferentemente por lo menos 2 veces, más preferentemente por lo menos 3 veces, más preferentemente por lo menos 4 veces.

Preferentemente a la dosis que proporciona el volumen óptimo de pan utilizando el ensayo de minicocción detallado en el Ejemplo 3, la relación de hidrólisis de DGDG a triglicérido (TG) es por lo menos 1,7%, preferentemente por lo menos 1,8%, preferentemente por lo menos 2%, preferentemente por lo menos 3%, preferentemente por lo menos 4%, preferentemente por lo menos 5%, preferentemente por lo menos 10%, preferentemente por lo menos 20%, preferentemente por lo menos 40% y preferentemente por lo menos 50%.

ES 2 351 426 T3

La expresión “actividad de glucolipasa” tal como se utiliza en la presente memoria, comprende “actividad de galactolipasa”.

La actividad de glucolipasa, la actividad de fosfolipasa y la actividad de triacilglicérido lipasa de una enzima puede determinarse utilizando los análisis presentados a continuación en la presente memoria.

Determinación de la actividad de galactolipasa (análisis de actividad de glucolipasa)

Sustrato

Se disolvieron 0,6% de digalactosildiglicérido (Sigma D 4651), 0,4% de Triton-X-100 (Sigma X-100) y CaCl_2 5 mM en tampón HEPES 0,05 M pH 7.

Procedimiento analítico

Se añadieron 400 μl de sustrato a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se colocaron en un termomezclador Eppendorf a 37°C durante 5 minutos. En el momento $t=0$ min., se añadieron 50 μl de solución enzimática. Además se analizó un blanco con agua en lugar de la enzima. La muestra se mezcló a razón de 10 x 100 rpm en un termomezclador Eppendorf a 37°C durante 10 minutos. En el momento $t=10$ min. el tubo Eppendorf se colocó en otro termomezclador a 99°C durante 10 minutos para interrumpir la reacción.

El ácido graso libre en las mezclas se analizó utilizando un kit NEFA C de WAKO GmbH.

Se calculó la actividad enzimática GLU a pH 7 en micromoles de ácido graso producido por minuto en condiciones analíticas.

Determinación de la actividad de fosfolipasa (análisis de la actividad de fosfolipasa)

Se midió la actividad de fosfolipasa utilizando dos métodos diferentes que dan resultados comparables. Uno de estos métodos puede utilizarse para determinar la actividad de fosfolipasa según la presente invención. Preferentemente, el análisis de PLU se utiliza para determinar la actividad de fosfolipasa de cualquier enzima.

“Análisis PLU” para la determinación de la actividad de fosfolipasa

Sustrato

Se disolvieron 0,6% de L- α -fosfatidilcolina al 95% vegetal (Avanti n° 441601), 0,4% de Triton-X-100 (Sigma X-100) y CaCl_2 5 mM en tampón HEPES 0,05 M pH 7.

Procedimiento analítico

Se añadieron 400 μl de sustrato a un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se colocaron en un termomezclador Eppendorf a 37°C durante 5 minutos. En el momento $t=0$ min., se añadieron 50 μl de solución enzimática. Además se analizó un blanco con agua en lugar de la enzima. La muestra se mezcló a razón de 10 x 100 rpm en un termomezclador Eppendorf a 37°C durante 10 minutos. En el momento $t=10$ min. el tubo Eppendorf se colocó en otro termomezclador a 99°C durante 10 minutos para interrumpir la reacción.

El ácido graso libre en las mezclas se analizó utilizando un kit NEFA C de WAKO GmbH.

Se calculó la actividad enzimática PLU-7 a pH 7 en micromoles de ácido graso producido por minuto en condiciones analíticas.

“Análisis TYPU” para la determinación de la actividad de fosfolipasa

1 TIPU (siglas en inglés de Unidad de Valoración de Fosfolipasa), se define como la cantidad de enzima, que libera 1 μmol de ácido graso libre por minuto en las condiciones analíticas.

Las fosfolipasas A1 y A2 catalizan la conversión de lecitina en lisolecitina con liberación del ácido graso libre en la posición 1 y 2, respectivamente. La actividad de fosfolipasa puede determinarse por valoración continua de los ácidos grasos liberados de la lecitina durante la enzimación, ya que el consumo de álcali es igual a la cantidad de ácido graso liberado.

Sustrato

Se dispersaron en aprox. 200 ml de agua desmineralizada durante la agitación magnética: lecitina al 4%, Triton-X 100 al 4% y CaCl_2 6 mM: 12 g de lecitina en polvo (Avanti Polar Lipids n° 44160) y 12 g de Triton-X 100 (Merck 108643). Se añadieron 3,0 ml de CaCl_2 0,6 M (p.a. Merck 1.02382). El volumen se ajustó a 300 ml con agua desmineralizada y se homogeneizó la emulsión utilizando un Ultra Thurax. El sustrato se preparó reciente cada día.

ES 2 351 426 T3

Procedimiento analítico

Se preparó una solución enzimática para proporcionar una pendiente en la curva de valoración entre 0,06 y 0,18 ml/min con adición de 300 µl de enzima.

Se incluye una muestra de referencia de actividad conocida.

Se disolvieron las muestras en agua desmineralizada y se agitaron durante 15 min. a 300 rpm. Se termostataron a 37,0°C durante 10 a 15 minutos, 25,00 ml de sustrato, antes el pH se ajustó a 7,0 con NaOH 0,05 M. Se añadieron 300 µl de solución enzimática al sustrato y se llevó a cabo la valoración continua con NaOH 0,05 M utilizando un valorador pH-Stat (Phm 290, Mettler Toledo). Se realizan dos determinaciones de actividad en cada pesada. Después de 8 minutos se interrumpe la valoración y se calcula la pendiente de la curva de valoración entre 5 y 7 minutos. El límite de detección es de 3 TIPU/ml de solución enzimática.

Cálculos

Se calculó la actividad de fosfolipasa (TIPU/g de enzima) de la siguiente manera:

$$\text{TIPU/g} = \frac{\alpha \cdot N \cdot 10^6 \frac{\mu\text{mol}}{\text{mol}} \cdot 10^{-3} \frac{\text{l}}{\text{ml}} \cdot V_1}{m \cdot V_2} = \frac{\alpha \cdot N \cdot 10^3 \cdot V_1}{m \cdot V_2}$$

en la que:

α es la pendiente de la curva de valoración entre 5 y 7 minutos de tiempo de reacción (ml/min)

N es la normalidad de la NaOH utilizada (mol/l)

V1 es el volumen en el que está disuelta la enzima (ml)

m es la cantidad de enzima añadida a V1 (g)

V2 es el volumen de la solución enzimática añadida al sustrato (ml)

Determinación de la actividad de triacilglicérido lipasa: análisis basado en triglicérido (tributirina) como sustrato (LIPU)

La actividad de lipasa basada en tributirina se mide según el Food Chemical Codex, cuarta edición, National Academy Press, 1996, pág. 803, en las modificaciones que la muestra está disuelta en agua desionizada en lugar de tampón de glicina, y el punto de consigna del pH stat es 5,5 en lugar de 7.

1 LIPU se define como la cantidad de enzima que puede liberar 1 mol de ácido butírico por minuto en condiciones analíticas.

Basándose en los análisis de actividad en galactolípido (GLU), fosfolípido (PLU) y triglicérido (LIPU) es posible calcular las relaciones PLU/LIPU y GLU/LIPU.

El análisis de Lipopan FTM y una enzima lipolítica según la presente invención procedente de *Fusarium heterosporum* (muestra 209) (véase el Ejemplo 3) proporcionó los resultados siguientes.

Las relaciones de actividad relativa para Lipopan FTM y la muestra 209 son

		Lipopan F	Muestra 209
Fosfolípido/triglicérido	PLU/LIPU	3	9
Galactolípido/triglicérido	GLU/LIPU	1	4

Apropiadamente la terminología “sinergia” o “efecto sinérgico” tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a que la combinación produce un efecto mejor que cuando se utiliza cada componente (es decir, enzima) por separado. La sinergia puede determinarse preparando un producto, por ejemplo, una masa y/o un producto horneado, con adición de cada componente (es decir, enzima) por separado y en combinación, y comparando los efectos.

La expresión “enzima lipolítica fúngica” tal como se utiliza en la presente memoria hace referencia a que la fuente natural de la enzima es un hongo. Para evitar dudas, sin embargo, esta expresión puede incluir una enzima fúngica que

se aísla de un hongo, la que se expresa en un hospedador fúngico (ya sea el hongo natural o no natural) o la que se expresa en un hospedador no fúngico (por ejemplo, en una bacteria o levadura por ejemplo).

Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención es una enzima natural.

El término “natural” tal como se utiliza en la presente memoria hace referencia a una enzima presente en la naturaleza. Es decir, una enzima expresada a partir del código genético endógeno y aislada de sus organismo hospedador endógeno y/o una enzima producida de manera heterogénea que no se ha mutado (es decir, no contiene eliminaciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos) en comparación con la secuencia de la proteína madura (después de episodios de escisión a la vez y después de la traducción) producida de manera endógena. Las proteínas naturales de la presente invención pueden ser codificadas por polinucleótidos optimizados en el codón para expresión heteróloga, y pueden comprender además un péptido señal no endógeno seleccionado para la expresión en este hospedador.

La expresión “péptido señal no endógeno” tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a un péptido señal presente de manera no natural en la cadena polipeptídica incipiente de la enzima lipolítica antes de la escisión simultánea a la traducción. En la enzima lipolítica según la presente invención, parte o la totalidad del péptido señal no endógeno, por ejemplo un propéptido puede permanecer unido al polipéptido maduro, esto está incluido en el término “natural” tal como se utiliza en la presente memoria.

Como se mencionó anteriormente, el término “natural” tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una enzima presente en la naturaleza. Sin embargo, esto no excluye la utilización de un polipéptido sintético o sintetizado químicamente que comprende la misma secuencia polipeptídica que la enzima lipolítica madura natural.

El término “variante” tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a una proteína expresada a partir de un código genético no endógeno que da como resultado una o más alteraciones de aminoácidos (es decir eliminaciones, adiciones o sustituciones de aminoácidos) en comparación con la secuencia natural en la secuencia de la proteína madura.

Preferentemente la enzima lipolítica fúngica según la presente invención es una enzima lipolítica que conserva actividad a baja temperatura, es decir es una enzima lipolítica a baja temperatura.

La expresión “enzima lipolítica a baja temperatura” hace referencia a una enzima que tiene actividad significativa entre 5 y 15°C, preferentemente una enzima que tiene actividad significativa a 10°C.

En una forma de realización la enzima lipolítica a baja temperatura según la presente invención no es una enzima lipolítica que comprende el motivo GDSX de la secuencia de aminoácidos descrito en el documento WO 2004/064987 en el que X es 1 o más de los siguientes restos de aminoácido: L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

Una enzima lipolítica a baja temperatura según la presente invención puede ser una enzima que tenga una actividad relativa de por lo menos 5%, preferentemente por lo menos 7%, más preferentemente por lo menos 10%, en el sustrato de lecitina a 10°C a un pH dentro del 20% del pH óptimo de la enzima lipolítica, determinado por la determinación de ácidos grasos libres por el método NEFA C (véase el Ejemplo 5, realizado a pH 7). El Ejemplo 6 proporciona un método de determinación del pH óptimo para una enzima lipolítica.

Una enzima lipolítica a baja temperatura según la presente invención puede ser una enzima que tiene una actividad relativa de por lo menos 10%, preferentemente por lo menos 15%, más preferentemente por lo menos 20%, más preferentemente por lo menos 25% y aún más preferentemente por lo menos 30% en sustrato de lecitina a 20°C, a un pH dentro del 20% del pH óptimo de la enzima lipolítica, determinado por la determinación de ácidos grasos libres por el método NEFA C (véase el Ejemplo 5, realizado a pH 7). El Ejemplo 6 proporciona un método de determinación del pH óptimo para una enzima lipolítica.

Una enzima lipolítica a baja temperatura según la presente invención puede presentar además actividad significativa de lecitina de yema de huevo a 5°C, caracterizada porque es capaz de liberar por lo menos 1%, preferentemente por lo menos 1,5%, más preferentemente por lo menos 2% de ácido graso libre después de un tiempo de reacción de 480 minutos a una dosis enzimática equivalente a 20 U/g de yema de huevo, utilizando el ensayo descrito en el Ejemplo 9 e ilustrado en las figuras 24 y 25.

Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención puede obtenerse (preferentemente se obtiene) de un hongo filamentoso. Más preferentemente, la enzima lipolítica fúngica puede obtenerse (preferentemente se obtiene) de *Fusarium* spp. Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención puede obtenerse (preferentemente se obtiene) de *Fusarium heterosporum* o *Fusarium semitectum*. Apropiadamente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención puede obtenerse (preferentemente se obtiene) de *Fusarium heterosporum* (CBS 782.83) o *Fusarium semitectum* (IBT 9507).

Por lo tanto en un aspecto, preferentemente la enzima lipolítica fúngica según la presente invención es una enzima lipolítica fúngica filamentosa, preferentemente una enzima lipolítica natural fúngica filamentosa.

Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos 90%, preferentemente por lo menos 95%, preferentemente por lo menos 98%, preferentemente por lo menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC.ID. n° 1 o SEC.ID. n° 2, SEC.ID. n° 4 o SEC.ID. n° 6.

Preferentemente, el ácido nucleico que codifica la enzima lipolítica fúngica según la presente invención comprende una secuencia de nucleótidos que tiene por lo menos 90%, preferentemente por lo menos 95%, preferentemente por lo menos 98%, preferentemente por lo menos 99% de identidad con la secuencia de aminoácidos mostrada como SEC.ID. N° 3, SEC.ID. n° 5 o SEC.ID. n° 7.

Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención no es una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de *Thermomyces* o parte de la misma fusionada con una secuencia de aminoácidos procedente de una proteína de *Fusarium* o parte de la misma. En particular, preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención no es una proteína de fusión que comprende una secuencia de aminoácidos de una proteína de *Thermomyces lanuginosa* o una parte de la misma fusionada con una secuencia de aminoácidos procedente de una proteína de *Fusarium oxysporum* o parte de la misma.

Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención no se obtiene a partir de *Thermomyces lanuginosa* y/o no es una variante de una enzima obtenida a partir de *Thermomyces lanuginosa*.

Preferentemente, la enzima lipolítica fúngica según la presente invención se aísla de un caldo de cultivo de fermentación de *Fusarium heterosporum* CBS 782.83 o de *Fusarium semitectum* (IBT 9507).

Apropiadamente, la enzima puede purificarse por cromatografía líquida.

La secuencia de aminoácidos de la enzima lipolítica fúngica purificada puede determinarse por degradación de Edman y análisis MALDI-TOF.

Una enzima lipolítica parcialmente purificada procedente de CBS 782.83 de *Fusarium heterosporum* se ha ensayado en ensayos de cocción a miniescala y en ensayos de cocción a escala piloto con muy buenos resultados.

Los efectos de cocción de enzima lipolítica fúngica procedente de CBS 782.83 de *F. heterosporum* se observó que eran superiores a los de Lipopan FTM y esto se correlacionó con un aumento de la relación de actividad en lípidos polares. En particular glucolípidos, tales como digalactosil diglicérido (DGDG), en comparación con triglicéridos.

Además, se ha ensayado la actividad de la enzima lipolítica procedente de IBT 9507 de *Fusarium semitectum* en los lípidos de harina en suspensión de la masa con muy buenos resultados.

La enzima lipolítica procedente de IBT 9507 de *F. semitectum* se demostró que tiene actividad significativa sobre galactolípidos en una masa y relativamente menos actividad sobre triglicéridos en comparación con Lipopan FTM.

Apropiadamente, la expresión “sustancia alimenticia” utilizada en la presente memoria, hace referencia a una sustancia que es adecuada para consumo humano y/o animal.

Apropiadamente, la expresión “sustancia alimenticia” utilizada en la presente memoria, hace referencia a una sustancia alimenticia en una forma que está lista para el consumo. Alternativamente o además, sin embargo, la expresión sustancia alimenticia utilizada en la presente memoria puede significar uno o más materiales alimenticios que se utilizan en la preparación de una sustancia alimenticia. Únicamente a título de ejemplo, la expresión sustancia alimenticia comprende tanto artículos horneados producidos a partir de la masa así como la masa utilizada en la preparación de dichos artículos horneados.

En un aspecto preferido la presente invención proporciona una sustancia alimenticia tal como se definió anteriormente en el que la sustancia alimenticia se selecciona de entre uno o más de los siguientes: huevos, productos a base de huevo, comprendiendo de manera no limitativa a mayonesa, aliños para ensalada, salsas, helados, huevo en polvo, yema de huevo modificada y productos preparados a partir de éstos; artículos horneados, incluyendo panes, pasteles, productos dulces de masa, masas laminadas, mantequillas líquidas, panes dulces, roscos, galletas, galletas saladas y dulces; pasteles, incluyendo chocolate, bombones, caramelos, turrón, chicles, incluyendo chicles sin azúcar y edulcorados con azúcar, goma de mascar, goma de mascar blanda, goma de mascar y budines; productos congelados, incluyendo sorbetes, preferentemente productos lácteos congelados, incluyendo helados y leche helada; productos lácteos, incluyendo queso, mantequilla, leche, crema de café, crema batida, natillas, bebidas lácteas y yogures; mousse, cremas vegetales batidas; aceites comestibles y grasas, productos batidos aireados y no aireados, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite, margarina, manteca y incluyendo productos para untar bajos en grasa y muy bajos en grasa; aliños, mayonesa, salsas para mojar, salsas a base de crema, sopas a base de crema, bebidas, emulsiones de especia y salsas.

En un aspecto, la sustancia alimenticia según la presente invención puede ser un producto de masa o un producto horneado, tal como un pan, un producto frito, un aperitivo, pasteles, tortas, pastelitos de chocolate y nueces (brownies), pastas de té, pasta, pastas instantáneas, tortillas, artículos de aperitivo tales como galletas saladas, galletas de harina de trigo entero (graham crackers), galletas saladas en forma de ocho (pretzels) y patatas fritas y pastas.

En otro aspecto, la sustancia alimenticia según la presente invención puede ser un pienso para animales.

En un aspecto preferentemente la sustancia alimenticia se selecciona de entre uno o más de los siguientes: huevos, productos a base de huevo, incluyendo mayonesa, aliños para ensalada, salsas, helados, huevo en polvo, yema de huevo modificada y productos preparados a partir de éstos.

En algunas de las aplicaciones mencionadas en la presente memoria, particularmente las aplicaciones alimenticias tales como aplicaciones de panadería, la enzima lipolítica según la presente invención puede utilizarse con uno o más emulsionantes convencionales, incluyendo por ejemplo monoglicéridos, ésteres del ácido diacetiltartárico de mono- y diglicéridos de ácidos grasos, estearoil lactilato sódico (SSL) y lecitinas.

La enzima lipolítica según la presente invención resulta especialmente preferida en recetas para pan con grasa añadida; esto se considera que es debido a la baja actividad de la enzima lipolítica según la presente invención en triglicéridos que produce una acumulación de ácido graso libre reducida y, con respecto a los triglicéridos de cadena corta, reducidos o para evitar la falta de olor.

En el presente contexto la expresión “grasa añadida” se utiliza para indicar que no se añaden lípidos ni grasa a la masa de harina.

Además o alternativamente, la enzima según la presente invención puede utilizarse con una u otras más enzimas de calidad alimenticia adecuadas. De este modo, está comprendido en el alcance de la presente invención que, además de la enzima lipolítica de la presente invención puede añadirse por lo menos una enzima más al producto horneado y/o a la masa. Dichas enzimas adicionales incluyen las enzimas que degradan el almidón tales como las endo- o exoamilasas, las pululanastas, las enzimas desramificadoras, las hemicelulosas incluyendo xilanasas, celulasas, oxidorreductasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, piranosa oxidasa, sulfhidril oxidasa o una carbohidrato oxidasa tal como la que oxida la maltosa, por ejemplo hexosa oxidasa (HOX), lipasas, fosfolipasas y hexosa oxidasa, proteasas y aciltransferasas (tales como las descritas, por ejemplo, en el documento WO 04/064987).

Resulta particularmente preferido que la enzima lipolítica de la invención se utilice junto con las alfa amilasas en la producción de artículos alimenticios. En particular, la amilasa puede ser una amilasa no maltógena, tal como un polipéptido con actividad de hexoamilasa no maltógena, en particular, actividad de glucano 1,4 alfa-maltotetrahidrolasa (E.C 3.2.1.60) (como se describe en el documento WO 05/003339). Una amilasa no maltógena adecuada está disponible en el comercio como Powersoft™ (disponible en Danisco, A/S Dinamarca). Pueden utilizarse también amilasas maltógenas tales como Novamyl™ (Novozymes A/S, Dinamarca). En una forma de realización, la utilización combinada de alfa amilasas y la enzima lipolítica de la invención pueden utilizarse en una masa, y/o la producción de un producto horneado, tales como pan, pasteles, rosquillas, rosquillas de pastel o baguetes. La combinación de alfa amilasas y la enzima lipolítica de la invención se considera también preferida para su utilización en los procedimientos de producción de tortillas, tales como las tortillas de trigo y/o de maíz.

En otra forma de realización preferida, la enzima lipolítica según la presente invención puede utilizarse en combinación con una xilanasa en la producción de productos alimenticios. GRINDAMYL™ y POWERBake 7000 son ejemplos de enzimas xilanasa disponibles en el comercio disponibles en Danisco A/S. Otros ejemplos de enzimas xilanasa pueden encontrarse en los documentos WO 03/020923 y WO 01/42433.

Preferentemente, la enzima lipolítica según la presente invención puede utilizarse en combinación con una xilanasa y una alfa amilasa. Apropiadamente la alfa amilasa puede ser una alfa amilasa maltógena o no maltógena (tal como GRINDAMYL™ o POWERSoft, disponibles en el comercio en Danisco A/S) o una combinación de las mismas.

La enzima lipolítica de la invención puede utilizarse también preferentemente en combinación con una enzima oxidante, tal como una enzima que oxida la maltosa (MOX), por ejemplo hexosa oxidasa (HOX). Los procedimientos adecuados se describen en el documento WO 03/099016. Las enzimas de oxidación a la maltosa disponibles en el comercio GRINDAMYL™ o SUREBake están disponibles en Danisco A/S.

Opcionalmente en los procedimientos de preparación de una masa, un producto horneado, tortilla, pasteles, pastas instantáneas/aperitivos fritos o un producto lácteo tal como queso puede utilizarse una alfa-amilasa, tal como una hexoamilasa no maltógena y/o unas amilasas maltógenas, y/o una enzima oxidante de la maltosa (MOX) en combinación con la enzima según la presente invención.

La enzima lipolítica según la presente invención está incluida por lo general en la sustancia alimenticia o en otra composición por los procedimientos conocidos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen la adición de la enzima lipolítica directamente al producto alimenticio o composición, la adición de la enzima lipolítica en combinación con un estabilizante y/o vehículo, la adición de una mezcla que comprende la enzima lipolítica y un estabilizante y/o vehículo.

Los estabilizantes adecuados para su utilización en la presente invención comprenden de manera no limitativa a sales inorgánicas (tales como NaCl, sulfato amónico), sorbitol, emulsionantes y detergentes (tales como Tween 20, Tween 80, Panodan AB100, sin triglicéridos, poligliceroléster, monooleato de sorbitán) aceites (tales como aceite de colza, aceite de semillas de girasol y aceite de soja), pectina, trehalosa y glicerol.

Los vehículos adecuados para su utilización en la presente invención comprenden de manera no limitativa almidón, trigo molido, harina de trigo, NaCl y citrato.

El índice de gluten puede medirse por medio de un Glutomatic 2200 de Perten Instruments (Suecia). Para medir el índice de gluten: inmediatamente después del tratamiento de protección, pueden pesarse 15 g de masa y colocarse en el Glutomatic y lavarse con 500 ml de solución al 2% de NaCl durante 10 min. La masa lavada se puede transferir a continuación a una centrifugadora 2015 de Índice de Gluten y pesar las dos fracciones de gluten y calcular el índice de gluten según la ecuación siguiente:

$$\text{Índice de gluten} = (\text{peso de gluten que queda en el tamiz} \times 100) / \text{peso total de gluten}$$

Preferentemente, el índice de gluten en la masa aumenta por lo menos el 5%, en comparación con una masa sin adición de polipéptido, el índice de gluten puede determinarse mediante un aparato Glutomatic 2200 mencionado anteriormente.

Los aspectos más preferidos se presentan en las reivindicaciones adjuntas y en la descripción y los ejemplos siguientes.

Ventajas

Sorprendente e inesperadamente, se ha descubierto que las enzimas lipolíticas fúngicas según la presente invención tienen una relación mucho mayor de actividad sobre los lípidos polares (fosfolípidos y/o glucolípidos):triglicéridos, en comparación con las enzimas lipolíticas identificadas anteriormente (particularmente Lipopan FTM de los hongos. Esto es particularmente sorprendente porque antes de la presente invención ninguna de las enzimas lipolíticas naturales conocidas procedentes de hongos presentaba esta actividad. Aunque la investigación se ha realizado para investigar variantes de enzimas lipolíticas (es decir, las que se han expuesto a mutagenia no naturales y/o se han alterado de alguna otra manera), no se había previsto que una enzima natural procedente de hongos pudiera haber poseído estas características muy beneficiosas.

Se ha descubierto que las enzimas identificadas presentan funcionalidad superior cuando se utilizan en aplicaciones de cocción. La utilización de la enzima lipolítica fúngica según la presente invención produce de manera ventajosa propiedades significativamente mejoradas para la masa y/o los productos horneados en comparación con otras enzimas lipolíticas procedentes de hongos, particularmente Lipopan FTM.

Ventajosamente la enzima lipolítica que conserva actividad a temperaturas más bajas, es decir, una enzima lipolítica a baja temperatura, puedes ser idónea para su utilización en aplicaciones a baja temperatura, eliminando así la necesidad de calentar un sustrato. Esto puede ser de particular ventaja en las aplicaciones tal como el tratamiento enzimático de la yema de huevo, el desengomado enzimático de aceites comestibles y en el tratamiento de la leche o de los productos lácteos, por ejemplo el tratamiento de la leche para queso antes de la elaboración del queso. Una ventaja adicional de la utilización de una enzima lipolítica a baja temperatura puede encontrarse en los artículos alimenticios y/o los piensos para animales, en los que, la conservación de actividad significativa a bajas temperaturas de operación permite que se realice el tratamiento enzimático con riesgo reducido de contaminación microbiana, particularmente bacteriana. Además, cuando la estabilidad de la enzima es mayor a temperaturas más bajas; esto permite la dosis eficaz de la enzima y la vida de operación eficaz más prolongada de la enzima en aplicaciones industriales.

Efectos técnicos

Para los productos horneados, tales como por ejemplo, el pan, bollos cocidos al vapor y pan de molde blanco de EE.UU., la adición de una enzima lipolítica de la presente invención puede producir uno o más de los siguientes efectos: volumen y blandura del pan mejorados, periodo de conservación prolongado y/o un efecto antiendurecimiento, estructura de la miga mejorada, heterogeneidad reducida del poro, tamaño medio del poro reducido, aumento del índice del gluten, mejora del sabor y/u olor y mejora del color de la corteza.

De manera ventajosa, la enzima de la presente invención puede utilizarse para reemplazar emulsionantes en artículos alimenticios, tales como la masa y/o los productos horneados.

La enzima lipolítica según la presente invención puede presentar sinergia con emulsionantes tales como DATEM, SSL, CSL, monoglicéridos, polisorbatos y Tween. De este modo, la enzima lipolítica de la presente invención puede utilizarse en combinación con uno o más emulsionantes. De manera ventajosa, la utilización de la enzima lipolítica según la presente invención en combinación con uno o más emulsionantes puede reducir la cantidad global de emulsionante utilizado en comparación con la cantidad necesaria cuando no se utiliza ninguna enzima según la presente invención.

La enzima lipolítica según la presente invención puede presentar también sinergia con hidrocoloides, goma guar, xantano y pectina, y con agentes oxidantes de maltosa tal compuesto la hexosa oxidasa.

ES 2 351 426 T3

Para las rosquillas, las rosquillas de pastel, roscos, canapés y panecillos dulces, por ejemplo, la utilización de una enzima lipolítica de la presente invención puede producir un efecto sinérgico cuando se utiliza en combinación con una o más alfa-amilasas, alfa-amilasa maltógena y alfa-amilasa no maltógena.

5 Para pasteles, bizcochos y tartas de cumpleaños, por ejemplo, la utilización de la enzima lipolítica de la presente invención puede producir un efecto sinérgico cuando se utiliza en combinación con uno o más hidrocoloides tales como goma guar, y/o uno o más emulsionantes tal como DATEM.

10 Para galletas, por ejemplo, la utilización de la enzima lipolítica según la presente invención proporciona propiedades mejoradas de laminabilidad y manipulación, particularmente en frío (laminabilidad en frío).

15 De manera ventajosa, en la mayonesa y otros productos a base de huevo, por ejemplo, la utilización de la enzima lipolítica según la presente invención puede conducir a una textura mejorada, un tamaño de partícula medio reducido y/o una distribución de partícula media reducida, una estabilidad al calor mejorada, un funcionamiento en microondas mejorado y/o estabilidad.

En los pasteles, la utilización de la presente invención conduce de manera ventajosa a propiedades mejoradas de volumen, blandura y de conservación y de periodos de caducidad.

20 Para pastas y productos en pasta, por ejemplo, pastas instantáneas, por ejemplo, la enzima lipolítica de la presente invención puede proporcionar una o más de las características siguientes: color/amarillez mejorada, características de color más estables, brillo reducido, contenido en grasa reducido, textura y mordedura (masticabilidad) mejoradas, actividad en agua reducida, rotura reducida, aumento de la consistencia del núcleo y conservación de la forma mejorada durante el tratamiento.

25 Preferentemente, la enzima lipolítica de la presente invención puede utilizarse para reducir el contenido en grasas de una pasta o de un producto de pasta, por ejemplo, una pasta instantánea.

30 En las tortillas, por ejemplo, la utilización de la enzima según la presente invención puede producir uno o más de los siguientes efectos: laminabilidad reducida de la tortilla, por ejemplo por aumento de la flexibilidad, propiedades antiendurecimiento mejoradas, mejora de la blandura y/o reducción de la falta de sabor.

35 Ventajosamente, la laminabilidad y/o la flexibilidad mejoradas puede conducir a una probabilidad reducida de la división de la tortilla al darla vuelta.

En los productos de queso y/o a base de queso, por ejemplo, la utilización de la enzima según la presente invención puede producir uno o más de los siguientes efectos: un sabor, textura y/o estabilidad mejorados, una disminución del efecto de pérdida de grasa en el queso y/o un aumento del rendimiento del queso.

40 La expresión “efecto de pérdida de grasa” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere al aceite libre liberado cuando se derrite el queso.

45 La enzima lipolítica según la presente invención puede utilizarse para producir un queso con poca grasa. De manera ventajosa, la enzima de la presente invención puede estabilizar la grasa en la leche y/o puede aumentar el sabor.

Una ventaja de la presente invención es que la enzima funciona (y de hecho tiene una gran funcionalidad) a baja temperatura. Esto puede presentar numerosas ventajas dependiendo de la utilización a la que se aplique la enzima. Por ejemplo, en la elaboración del queso esta funcionalidad puede reducir el riesgo de contaminación microbiana y el crecimiento microbiano durante el tratamiento enzimático. La razón de esto puede ser que el queso puede permanecer enfriado durante el tratamiento enzimático. De este modo, la enzima lipolítica de la presente invención puede ser particularmente adecuada para la maduración del queso a baja temperatura para mejorar el sabor.

55 En piensos para animales, por ejemplo, la enzima según la presente invención de manera ventajosa puede producir uno o más de los efectos siguientes: aumento de eficacia de utilización/conversión del pienso en el animal, aumento de la ganancia de peso corporal del animal, mejor digestibilidad del pienso, mejor absorción de nitrógeno por el animal, por ejemplo, del pienso, aumento de capacidad de metabolización de la materia seca del pienso y mejor sensación en el paladar del pienso.

60 En el desengomado de un aceite comestible, tal como un aceite vegetal, la enzima lipolítica de la presente invención presenta una gran actividad a baja temperatura. Esto puede reducir de manera ventajosa el requisito de calentar el aceite antes del tratamiento enzimático o durante el mismo. Esto presenta el efecto ventajoso de reducir la cantidad de energía necesaria para efectuar el tratamiento. La enzima según la presente invención puede mejorar la selectividad de reducción de los fosfolípidos en comparación con los triglicéridos. La enzima según la presente invención en un aceite comestible (tal como un aceite vegetal) puede tener actividad hidrolítica reducida sobre los triglicéridos en comparación con los fosfolípidos. Esto puede conducir a disminuir los triglicéridos que se hidrolizan (en comparación con una enzima convencional/fosfolipasa) y esto puede conducir a reducciones menores en el rendimiento del aceite y/o una acumulación reducida de ácido graso en el aceite (en comparación con una enzima lipolítica convencional/fosfolipasa).

Utilizaciones

La enzima según la presente invención tiene muchas aplicaciones.

5 En particular, las enzimas lipolíticas fúngicas según la presente invención pueden ser útiles en la preparación de una sustancia alimenticia.

Por ejemplo, las enzimas lipolíticas fúngicas según la presente invención pueden ser particularmente útiles en el tratamiento del huevo o de productos a base de huevo.

10

Las fosfolipasas, particularmente la fosfolipasa A2 (E.C.3.1.1.4), se ha utilizado durante muchos años en el tratamiento del huevo o de productos a base de huevo (ver la patente US nº 4.034.124 y Dutihl & Groger, 1981, *J. Sci. Food. Agric.*, 32, 451-458, por ejemplo). La actividad de la fosfolipasa durante el tratamiento del huevo o de los productos a base de huevo produce la acumulación de lisolecitina polar, que puede actuar como emulsionante.

15

El tratamiento del huevo o de los productos a base de huevo con una enzima lipolítica fúngica según la presente invención puede mejorar la estabilidad, la estabilidad térmica bajo tratamiento térmico, tal como la pasteurización y producir sustancial espesamiento. Los productos a base de huevo pueden comprender de manera no limitativa a pasteles, mayonesa, aliños para ensaladas, salsas, helados y similares.

20

Las enzimas lipolíticas fúngicas según la presente invención son particularmente útiles en la preparación de productos horneados, tales como los preparados a partir de una masa, incluyendo panes, pasteles, productos dulces de masa, masas laminadas, batidos líquidos, panecillos dulces, roscos, galletas, galletas saladas y dulces.

25

Las enzimas lipolíticas fúngicas según la presente invención pueden utilizarse además en aditivos mejoradores del pan, por ejemplo, composiciones de masa, aditivos para la masa, acondicionadores para la masa, premezclas y preparaciones similares añadidas convencionalmente a la harina y/o a la masa durante los tratamientos para la preparación del pan u otros productos horneados para proporcionar propiedades mejoradas al pan u otros productos horneados.

30

De este modo, la presente invención se refiere además a una composición para mejorar el pan y/o a una composición para mejorar la masa que comprende una enzima lipolítica fúngica según la presente invención; y además a una masa o a un producto horneado que comprende dicha composición para mejorar el pan y/o para mejorar la masa.

35

La composición para mejorar el pan y/o la composición para mejorar la masa pueden comprender, además de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención, otras sustancias, sustancias que se utilizan convencionalmente en la cocción para mejorar las propiedades de la masa y/o los productos horneados.

40

La composición para mejorar el pan y/o la composición para mejorar la masa puede comprender uno o más agentes de cocción convencionales, tal como uno o más de los constituyentes siguientes:

Leche en polvo, gluten, un emulsionante, grasa granulada, un oxidante, un aminoácido, un azúcar, una sal, harina o almidón.

45

Los ejemplos de emulsionantes adecuados: monoglicéridos, ésteres de ácido diacetil tartárico, de monodiglicéridos de ácidos grasos, ésteres de azúcar, estearoil-lactilato sódico (SSL) y lecitinas.

50

La composición para mejorar el pan y/o la masa puede comprender además otra enzima, tal como una u otras enzimas más adecuadas de calidad alimenticia, incluyendo las enzimas degradadoras del almidón tales como las endo- o exoamilasas, pululanases, enzimas desramificadoras, hemicelulasas incluyendo xilanasas, celulasas, oxidorreductasas, por ejemplo, glucosa-oxidasa, piranosa-oxidasa, sulfhidril-oxidasa o una carbohidrato-oxidasa, tal como la que oxida la maltosa, por ejemplo la hexosa-oxidasa (HOX), lipasas, fosfolipasas y hexosa-oxidasa, proteasas y aciltransferasas (tales como las descritas en el documento WO 04/064987 por ejemplo).

60

La expresión “propiedades mejoradas” tal como se utiliza en la presente memoria, hace referencia a cualquier propiedad que pueda mejorarse por la acción de las enzimas lipolíticas fúngicas de la presente invención. En particular, la utilización de una enzima lipolítica fúngica según la presente invención, produce una o más de las siguientes características: aumento de volumen del producto horneado; estructura mejorada de la miga del producto horneado; propiedades de antiendurecimiento en el producto horneado; aumento de la resistencia, aumento de la estabilidad, disminución de la pegajosidad y/o mejor maquinabilidad de la masa.

Las propiedades mejoradas se evalúan por comparación con una masa y/o un producto horneado preparado sin adición de la enzima lipolítica según la presente invención.

65

La expresión “producto horneado” tal como se utiliza en la presente memoria, incluye un producto horneado preparado a partir de una masa. Los ejemplos de productos horneados, (ya sean de tipo blanco, claro u oscuro) que pueden ser producidos de manera ventajosa por la presente invención, incluyen uno o más de los siguientes: pan (incluyendo pan blanco, de harina integral y de centeno), por lo general en forma de barras de pan, bollos o pan tostado, pan francés de tipo baguette, pan de pita, tortillas, tacos, pasteles, crepes, bizcochos, pan crujiente, pasta italiana, pastas y similares.

ES 2 351 426 T3

La masa según la presente invención puede ser un pan fermentado o una masa que va a someterse a fermentación. La masa puede estar fermentada de varias maneras tales como por adición de bicarbonato sódico o similar o por adición de un cultivo de levadura adecuado, tal como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero).

La presente invención se refiere además a la utilización de enzimas lipolíticas fúngicas según la presente invención para producir una masa para pasta italiana, preparada preferentemente a partir de harina de trigo duro o una harina de calidad comparable.

Las enzimas lipolíticas fúngicas según la presente invención son adecuadas para su utilización en el desengomado enzimático de aceites vegetales o comestibles. En el tratamiento de aceite vegetal o comestible, el aceite vegetal o comestible se trata con una enzima lipolítica fúngica según la presente invención a fin de hidrolizar una mayor parte de los lípidos polares (por ejemplo, fosfolípido y/o glucolípido). Preferentemente, los grupos acilo graso se hidrolizan en los lípidos polares. El procedimiento de desengomado por lo general da como resultado la reducción del contenido de los lípidos polares, particularmente de los fosfolípidos, en un aceite comestible debido a la hidrólisis de una mayor parte (es decir, más del 50%) del lípido polar, por ejemplo, glucolípido y/o fosfolípido. Por lo general, la fase acuosa que contiene el lípido polar hidrolizado (por ejemplo, fosfolípido y/o glucolípido) se separa del aceite. Apropiadamente, el aceite comestible o vegetal puede tener inicialmente (pretratamiento con la enzima según la presente invención) un contenido en fósforo de 50 a 250 ppm.

Además, la presente invención se refiere a la utilización de una enzima lipolítica según la presente invención para el tratamiento de productos del queso.

La enzima lipolítica según la presente invención es además particularmente adecuada para su utilización en la preparación de un pienso para animales.

Como apreciará el experto en la materia, el término "desengomado" tal como se utiliza en la presente memoria hace referencia al refinado del aceite convirtiendo los fosfátidos (tales como lecitina, fosfolípidos y aceite ocluido) en fosfátidos hidratables. El aceite que se ha desengomado es más fluido y de este modo tiene mejores propiedades de manipulación que el aceite que no ha sido desengomado.

La tabla siguiente se proporciona únicamente como orientación general y como un resumen de la cantidad de dosis para una enzima lipolítica según la presente invención que puede ser necesaria en diferentes aplicaciones. La tabla proporciona además orientación respecto del nivel de dosis de una enzima lipolítica según la presente invención cuando se utiliza en combinación, por ejemplo, con un emulsionante. Desde luego, como resulta evidente para el experto en la materia, la optimización de la dosis de enzima, la temperatura de reacción y el tiempo de reacción pueden determinarse fácilmente, utilizando experimentación rutinaria, para cualquier aplicación dada.

Aplicación	Dosis "óptima", TIPU/kg de harina	Dosis óptima en combinación con emulsionante	Intervalo de dosis TIPU/kg de harina
Panecillos crujientes	400	120	300-800
Pan tostado de masa convencional	400	120	300-800
Fermentación prolongada de masa convencional	120		75-250
Procedimiento Tweedy de mezclado a alta velocidad		120	300-800
Bizcocho US y pan de masa sobre DATEM		120	75-400
Tortilla de trigo	700	Contiene emulsionantes	400-2500
Pasteles-bizcochos	2000	Contiene emulsionantes para pastel	1000-4000
Masa retardada (24 horas)	120	Contiene emulsionantes	75-250
Panecillos al vapor	200		150-500
Pastas fritas instantáneas			200-10000

Aislada

En un aspecto, preferentemente la secuencia está en forma aislada. El término “aislada” hace referencia a que la secuencia está por lo menos sustancialmente exenta de por lo menos otro componente con el que la secuencia está naturalmente asociada en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza.

Purificada

En un aspecto, preferentemente la secuencia está en forma purificada. El término “purificada” hace referencia a que la secuencia está en un estado relativamente puro, por ejemplo, por lo menos aproximadamente 90% puro, o por lo menos aproximadamente 95% puro o por lo menos aproximadamente 98% puro.

Secuencia nucleotídica

El alcance de la presente invención incluye secuencias nucleotídicas que codifican enzimas que tienen las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

La expresión “secuencia nucleotídica” utilizada en la presente memoria se refiere a una secuencia oligonucleotídica o a una secuencia polinucleotídica y a las variantes, homólogos, fragmentos y derivados de las mismas (tales como sus fracciones). La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico, sintético o recombinante, la cual puede ser bicatenaria o monocatenaria representando la cadena transcrita o complementaria.

La expresión “secuencia nucleotídica” en relación con la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferentemente hace referencia al ADN, más preferentemente a la secuencia de ADNc que codifica en la presente invención.

En una forma de realización preferida la secuencia nucleotídica cuando se refiere al alcance de por sí y cuando está incluida en el alcance de la presente invención no incluye la secuencia nucleotídica natural según la presente invención en su medio natural y cuando está unida a su(s) secuencia(s) asociada(s) de forma natural que está(n) además en su(s) medio(s) natural(es). Por facilidad de referencia, se denominará esta forma de realización preferida “secuencia nucleotídica artificial”. A este respecto, la expresión “secuencia nucleotídica natural” hace referencia a una secuencia nucleotídica completa que está en su medio natural y cuando se une operativamente a un activador completo con el que está asociada de forma natural, activador que también está en su medio natural. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos comprendida por el alcance de la presente invención puede estar aislada y/o purificada tras la expresión de una secuencia nucleotídica en su organismo natural. Preferentemente, sin embargo, la secuencia de aminoácidos comprendida por el alcance de la presente invención puede ser expresada por una secuencia nucleotídica en su organismo natural pero en la que la secuencia nucleotídica no está bajo el control del activador con el que está asociada de forma natural dentro de este organismo.

Preparación de la secuencia nucleotídica

Por lo general, la secuencia nucleotídica comprendida en el alcance de la presente invención se prepara utilizando técnicas de ADN recombinante (es decir ADN recombinante). Sin embargo, en una forma de realización alternativa de la invención la secuencia nucleotídica podía sintetizarse, en su totalidad o en parte utilizando procedimientos químicos bien conocidos en la técnica (véase Caruthers MH, *et al.*, (1980) *Nuc. Acids Res. Symp. Ser.* 215-23 y Horn T., *et al.*, (1980), *Nuc. Acids Res. Symp. Ser.*, 225-232).

Una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que tiene las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede identificarse, aislarse y/o purificarse a partir de cualquier célula u organismo que produzca dicha enzima. Varios procedimientos son bien conocidos en la técnica para la identificación, aislamiento y/o purificación de secuencias nucleotídicas. A título de ejemplo, pueden utilizarse técnicas de ampliación por RCP para preparar más de una secuencia una vez se ha identificado, aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

A título de ejemplo adicional, un ADN genómico y/o un banco de ADNc puede construirse utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero procedente del organismo que produce la enzima. Si la secuencia de aminoácidos de la enzima o una parte de la secuencia de aminoácidos de la enzima es conocida, pueden sintetizarse sondas de oligonucleótido marcadas y utilizarse para identificar clones que codifican la enzima procedentes de un banco genómico preparado a partir del organismo. Alternativamente, una sonda oligonucleotídica marcada que contiene secuencias homólogas a las de otro gen de la enzima conocido podrían utilizarse para identificar clones que codifican la enzima. En este último caso, se utilizan las condiciones de hibridación y de lavado de menor severidad.

Alternativamente, los clones que identifican la enzima podrían identificarse insertando fragmentos de ADN genómico en un factor de expresión, tal como un plásmido, una bacteria transformadora negativa a la enzima con el banco de ADN genómico resultante y a continuación colocando en placas de agar-agar las bacterias transformadas que contienen un sustrato para la enzima (por ejemplo, maltosa para una enzima que produce glucosidasa maltasa), permitiendo así identificar los clones que expresan la enzima.

Todavía en otra alternativa, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima puede prepararse por síntesis por los métodos convencionales probados, por ejemplo, el método de la fosforoamidita descrito por Beaucage S.L. *et al.*, (1981) *Tetrahedron Letters* 22, págs. 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.*, (1984) *EMBO J.* 3. págs. 801-805. En el procedimiento de la fosforoamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico y sintético mixto, de origen sintético y de ADNc mixto, o de origen genómico y de ADNc mixto, preparada ligando los fragmentos de origen de ADNc sintético, genómico o de ADN (según proceda) de acuerdo con las técnicas convencionales. Cada fragmento ligado corresponde a varias partes de la secuencia nucleotídica completa. La secuencia de ADN puede prepararse también por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) utilizando cebadores específicos, tal como se describe en la patente US nº 4.683.202 o en Saiki R.K. *et al.*, (*Science* (1988) 239, págs. 487-491).

Debido a la degeneración en el código genético, pueden producirse fácilmente secuencias nucleotídicas en las que se ha cambiado la utilización del codón del triplete, para alguno o todos los aminoácidos codificados por la secuencia nucleotídica original produciendo con ello una secuencia nucleotídica con baja homología con la secuencia nucleotídica original pero que codifica la misma, o una variante, secuencia de aminoácidos como la codificada por la secuencia nucleotídica original. Por ejemplo, para la mayoría de los aminoácidos la degeneración del código genético está en la tercera posición en el codón del triplete (posición oscilante) (para referencia véase Stryer, Lubert, *Biochemistry*, Tercera edición, Freeman Press, ISBN 0-7167-1920-7) por consiguiente, una secuencia nucleotídica en la que todos los codones del triplete han “oscilado” en la tercera posición sería aproximadamente 66% idéntica a la secuencia nucleotídica original, sin embargo, la secuencia nucleotídica mencionada codificaría la misma, o una variante, secuencia de aminoácidos primaria como la secuencia nucleotídica original.

Por consiguiente, la presente invención se refiere además a cualquier secuencia nucleotídica que tenga la utilización del codón triplete alternativa para por lo menos un aminoácido que codifica el codón triplete, pero que codifica la misma, o una variante, secuencia polipeptídica como la secuencia polipeptídica codificada por la secuencia nucleotídica original.

Además, los organismos específicos por lo general tienen un sesgo en cuanto a que se utilizan codones triplete para codificar aminoácidos. Las tablas de utilización de codón preferidas resultan fácilmente disponibles y pueden utilizarse para preparar genes optimizados del codón. Dichas técnicas de optimización del codón se utilizan de manera rutinaria para optimizar la expresión de transgenes en un hospedador heterólogo.

35 *Secuencias de aminoácidos*

El alcance de la presente invención comprende además secuencias de aminoácidos de enzimas con propiedades específicas como las definidas en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término polipéptido y/o del término proteína. En algunos casos, la expresión “secuencia de aminoácidos” es sinónima del término péptido. En algunos casos, la expresión “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “enzima”.

La secuencia de aminoácidos puede prepararse o aislarse a partir de una fuente adecuada, o puede construirse por síntesis o puede prepararse mediante la utilización de técnicas de ADN recombinante.

La enzima comprendida en la presente invención puede utilizarse junto con otras enzimas. Por lo tanto la presente invención comprende asimismo una combinación de enzimas en la que la combinación comprende la enzima de la presente invención y otra enzima que puede ser otra enzima según la presente invención.

Preferentemente la secuencia de aminoácidos cuando se refiere al alcance de la presente invención y cuando está comprendida por el alcance de por sí de la presente invención no es una enzima natural. A este respecto, la expresión “enzima natural” hace referencia a una enzima completa que está en su medio natural y cuando ha sido expresada por su secuencia nucleotídica natural.

55 *Identidad/homología*

La presente invención comprende además la utilización de homólogos de cualquier secuencia de aminoácidos de una enzima o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifica dicha enzima.

En la presente memoria, el término “homólogo” hace referencia a una entidad que tiene cierta homología con las secuencias de aminoácidos y las secuencias nucleotídicas. En la presente memoria, el término “homología” puede ser equivalente a “identidad”. Estos términos se utilizarán indistintamente en la presente memoria.

En el presente contexto, una secuencia de aminoácidos homóloga se considera que incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser por lo menos 92% idéntica, preferentemente por lo menos 95, 96, 97, 98 ó 99% idéntica a la secuencia. Por lo general, los homólogos comprenderán los mismos puntos activos, por ejemplo, como la presente secuencia de aminoácidos. Aunque la homología puede considerarse además desde el punto de vista de similitud (es

decir, restos de aminoácidos con propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar homología en términos de identidad de secuencia.

Preferentemente, una secuencia de aminoácidos homóloga según la presente invención es la que tiene por lo menos 90% de identidad, más preferentemente por lo menos 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad, en una zona de por lo menos 30, más preferentemente 40, aminoácidos contiguos.

En el presente contexto, una secuencia nucleotídica homóloga se considera que incluye una secuencia nucleotídica que puede ser por lo menos 92% idéntica, preferentemente por lo menos 95, 96, 97, 98 ó 99% idéntica a una secuencia nucleotídica que codifica una enzima de la presente invención (la presente secuencia). Por lo general, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican los puntos activos, etc. como la presente secuencia. Aunque la homología puede considerarse también desde el punto de vista de similitud (es decir los restos de aminoácidos con propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología desde el punto de vista de la identidad de secuencia.

Preferentemente, una secuencia nucleotídica homóloga según la presente invención es la que tiene por lo menos 90% de identidad, más preferentemente por lo menos 95, 96, 97, 98 ó 99% de identidad, en una zona de por lo menos 30, más preferentemente 40, más preferentemente 60 nucleótidos contiguos.

Para las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos, pueden realizarse comparaciones de homología a simple vista, o más frecuentemente con ayuda de los programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos comercializados pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse en secuencias contiguas, es decir una secuencia está alineada con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un resto cada vez. Esto se denomina "alineación no solapada". Por lo general, dichas alineaciones no solapadas se realizan solamente en un número de restos relativamente pequeño.

Aunque éste es un procedimiento muy sencillo y lógico, no puede tener en consideración que, por ejemplo, en un par idéntico de otro modo de secuencias, una inserción o eliminación dará lugar a que los siguientes restos de aminoácido se coloquen fuera de la alineación, dando como resultado de este modo potencialmente una gran reducción en el % de homología cuando se lleva a cabo una alineación global. En consecuencia, la mayoría de los procedimientos para comparación de secuencias se diseñan para producir las alineaciones óptimas que tienen en consideración posibles inserciones y eliminaciones sin penalizar indebidamente la puntuación global de la homología. Esto se consigue insertando "huecos" en la alineación de la secuencia para tratar de maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan penalizaciones por "hueco" a cada hueco que se produce en la alineación de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, una alineación de la secuencia con tan pocos huecos como sea posible (reflejando mayor relevancia entre las dos secuencias comparadas), conseguirá una puntuación mayor que una con muchos huecos. Se utilizan por lo general "costes por hueco afín" que cargan un coste relativamente alto por existencia de un hueco y una penalidad más pequeña por cada resto posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos más frecuentemente utilizado. Las penalizaciones altas por hueco producirán desde luego alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayor parte de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, resulta preferido utilizar los valores por defecto al utilizar dicho programa informático para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, al utilizar el paquete GCG Wisconsin Bestfit la penalización por hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada ampliación.

El cálculo del % máximo de homología por consiguiente requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, tomando en consideración las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicha alineación es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Devereux *et al.*, 1984, *Nuc. Acids Research* 12 pág. 387). Ejemplos de otro programa informático que puede realizar comparaciones de frecuencias incluyen de manera no limitativa, el paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed., capítulo 18), FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 403-410) y la serie GENEWORKS de herramientas de comparación. Se dispone tanto de BLAST como FASTA para la investigación fuera de línea y en línea (véase Ausubel *et al.*, 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, págs. 7-58 a 7-60).

Sin embargo, para algunas aplicaciones se prefiere utilizar el programa GCG Bestfit. Se dispone asimismo de una nueva herramienta denominada BLAST 2 Secuencias para comparar las proteínas y las secuencias de nucleótidos (véase FEMS *Microbiol. Lett.*, 1999, 174(2): 247-50; *FEMS Microbiol. Lett.*, 1999, 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

Aunque el tanto por ciento de homología final puede medirse desde el punto de vista de identidad, el propio procedimiento de alineación no está basado por lo general en una comparación del par todo o nada. En su lugar, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntuaciones a cada comparación de pares basada en la similitud química o en la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada frecuentemente es la matriz BLOSUM62, la matriz por defecto para la serie de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin generalmente utilizan los valores públicos por defecto y una tabla de comparación de símbolos habituales si se suministra

ES 2 351 426 T3

(véase el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones resulta preferido utilizar los valores públicos para el paquete GCG o en el caso de otro programa informático, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Alternativamente, puede calcularse el porcentaje de homologías utilizando la característica de la alineación múltiple en DNASIS™ (Hitachi Software), basado en un algoritmo basado en CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), *Gene* 73(1), 237-244).

Una vez el programa informático ha producido una alineación óptima, es posible calcular el % de homología, preferentemente el % de identidad de secuencias. El programa informático por lo general realiza esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

Las secuencias pueden presentar también eliminaciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio imperceptible y dan como resultado una sustancia funcionalmente equivalente. Pueden hacerse sustituciones deliberadas de aminoácidos basándose en la similitud en las propiedades de aminoácidos (tal como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos) y por consiguiente es útil agrupar los aminoácidos en grupos funcionales. Los aminoácidos pueden agruparse basándose en las propiedades de su cadena lateral sola. Sin embargo, es más útil incluir los datos de la mutación también. Las series de aminoácidos derivadas de este modo es probable que se conserven por razones estructurales. Estas series pueden describirse en forma de diagrama de Venn (Livingstone C.D. y Barton G.J. (1993) "Protein sequence alignments; a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation" *Comput. Appl Biosci.* 9: 745-456) (Taylor W.R. (1986) "The classification of amino acid conservation" *J. Theor. Biol.* 119: 205-218). Pueden realizarse sustituciones conservadoras, por ejemplo según la Tabla a continuación que describe un agrupamiento de aminoácidos en el diagrama de Venn generalmente aceptado.

CONJUNTO		SUBCONJUNTO	
Hidrófobo	FWYHKMILVAGC	Aromático	FWYH
		Alifático	ILV
Polar	WYHKREDCSTNQ	Cargado	HKRED
		Con cargas positivas	HKR
		Con cargas negativas	ED
Pequeño	VCAGSPTND	Diminuto	AGS

La presente invención comprende además la sustitución homóloga (sustitución y reemplazamiento se utilizan ambas en la presente memoria para significar el intercambio de un resto de aminoácidos existente, por un resto alternativo) que puede ocurrir es decir sustitución semejante por semejante, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución no homóloga puede ocurrir también es decir de una clase de resto a otra o alternativamente que implica la inclusión de aminoácidos artificiales tales como ornitina (en adelante denominada Z), ácido diaminobutírico ornitina (en lo sucesivo denominado B), norleucina ornitina (en lo sucesivo denominado O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazamientos pueden hacerse también mediante aminoácidos artificiales.

Las secuencias variantes de aminoácidos pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre cualesquiera dos restos de aminoácidos de la secuencia incluyendo los grupos alquilo tales como los grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos, tales como los restos de glicina o β -alanina. Una forma adicional de variación, que implica la presencia de uno o más restos de aminoácidos en forma peptóide, podrá ser apreciada por los expertos en la materia. Para evitar dudas, "la forma peptóide" se utiliza para referirse a restos variantes de aminoácido en los que el grupo sustituyente carbono- α está en el átomo de nitrógeno del resto en lugar de en el carbono- α . Los procedimientos para preparar péptidos en forma peptóide son conocidos en la técnica, por ejemplo Simon, R.J. *et al.*, PNAS (1992), 89(20), 9367-9371 y Horwell DC., *Trends Biotechnol.* (1995), 13(4), 132-134.

Las secuencias nucleotídicas para su utilización para la presente invención pueden incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. Numerosos tipos diferentes de modificación para oligonucleótidos son conocidos en la técnica. Éstos incluyen ejes centrales de fosfonato de metilo y de fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o poliglicina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. En aras de la presente invención, debe sobreentenderse que las secuencias nucleotídicas descritas en la presente pueden ser modificadas por cualquier procedimiento disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden realizarse para aumentar la actividad *in vivo* o la duración de la vida de las secuencias nucleotídicas de la presente invención.

La presente invención comprende también la utilización de secuencias nucleotídicas que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria o cualquier derivado, fragmento o sus derivados. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de la misma entonces esta frecuencia puede utilizarse como sonda para identificar secuencias de codificación similares en otros organismos, etc.

Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias de la presente invención pero que están comprendidos dentro del alcance de la invención pueden obtenerse de numerosas maneras. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria pueden obtenerse por ejemplo, sondando bancos de ADN preparados de una variedad de individuos, por ejemplo individuos de diferentes poblaciones. Además, pueden obtenerse otros homólogos y dichos homólogos y sus fragmentos en general serán capaces de hibridar selectivamente a las secuencias mostradas en el listado de secuencias en la presente memoria. Dichas secuencias pueden obtenerse sondando bancos de ADNc preparados de bancos de ADN genómicos de otras especies, y sondando dichos bancos con las sondas que comprenden toda o parte de alguna de las secuencias en el listado de secuencias adjunto en condiciones del medio para alta severidad. Similares consideraciones se aplican para obtener especies homólogas y variantes alelas de las secuencias polipeptídicas o nucleotídicas de la invención.

Las variantes y los homólogos de cepas/especies pueden obtenerse también utilizando RCP degenerada que utilizará los cebadores diseñados para las secuencias dianas dentro de las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos procedentes de varias variantes/homólogos. Las alineaciones de secuencias pueden realizarse utilizando el programa informático conocido en la técnica. Por ejemplo se utiliza extensamente el programa GCG Wisconsin PileUp.

Los cebadores utilizados en la RCP degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se utilizarán en condiciones de severidad inferiores a las utilizadas para clonar secuencias con cebadores de una sola secuencia frente a secuencias conocidas.

Alternativamente, dichos polinucleótidos pueden obtenerse por mutagenia dirigida a zonas específicas de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se necesitan cambios de la secuencia de codón imperceptible para optimizar las preferencias de codón para una célula hospedadora específica en la que se están expresando secuencias polinucleotídicas. Otros cambios de secuencia pueden desearse para introducir las secuencias de reconocimiento de la enzima de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Los polinucleótidos (secuencias nucleotídicas) de la invención pueden utilizarse para producir un cebador, por ejemplo, un cebador para RCP, un cebador para una reacción de ampliación alternativa, una sonda por ejemplo, marcada con un marcador revelador por medios convencionales utilizando marcadores radioactivos o no radioactivos, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán por lo menos 15, preferentemente por lo menos 20, por ejemplo por lo menos 25, 30 ó 40 nucleótidos de longitud, y están también comprendidos por la expresión polinucleótidos de la invención tal como se utiliza en la presente memoria.

Los polinucleótidos tales como los polinucleótidos y sondas de ADN según la invención se pueden producir de manera recombinante, por síntesis, o por cualquier medio disponible por los expertos en la materia. Además pueden clonarse por técnicas convencionales.

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

Los polinucleótidos mayores se producirán generalmente utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación de RCP (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores pueden diseñarse para que contengan secuencias de reconocimiento adecuadas de la enzima de restricción, de modo que el ADN ampliado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

Biológicamente activa

Preferentemente, las secuencias de la variante, etc., son por lo menos tan biológicamente activas como las secuencias presentadas en la presente memoria.

Tal como se utiliza en la presente memoria, "biólogicamente activa" se refiere a una secuencia que tiene una función estructural similar (pero no necesariamente en el mismo grado) y/o función reguladora similar (pero no necesariamente en el mismo grado) y/o función bioquímica similar (pero no necesariamente en el mismo grado) de la secuencia natural.

Hibridación

La presente invención comprende además secuencias que son complementarias con las secuencias de ácido nucleico de la presente invención o secuencias que pueden hibridarse ya sea con las secuencias de la presente invención o con secuencias que son complementarias de éstas.

El término “hibridación” tal como se utiliza en la presente memoria incluirá “el procedimiento mediante el que una cadena de ácido nucleico se une a una cadena complementaria por emparejamiento de bases” así como el procedimiento de ampliación tal como se realiza en las tecnologías de la reacción en cadena de la polimerasa (RCP).

La presente invención comprende además la utilización de secuencias nucleotídicas que son capaces de hibridar las secuencias que son complementarias de las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o sus derivados.

El término “variante” comprende además, secuencias que son complementarias de las secuencias que son capaces de hibridar a las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

Preferentemente, el término “variante” comprende secuencias que son complementarias de las secuencias que son capaces de hibridar en condiciones severas (por ejemplo, 50°C y 0,2 x SSC {1 x SSC = NaCl 0,15 M, citrato Na₃ 0,015 M pH 7,0}) para las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

Más preferentemente, el término “variante” comprende secuencias que son complementarias de las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones severas (por ejemplo, 65°C y 0,1 x SSC {1 x SSC = NaCl 0,15 M, citrato Na₃ 0,015 M pH 7,0}) para las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria.

La presente invención se refiere además a secuencias nucleotídicas que pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas de la presente invención (incluyendo las secuencias complementarias de las presentadas en la presente memoria).

La presente invención se refiere además a secuencias nucleotídicas que son complementarias de las secuencias que pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas de la presente invención (incluyendo las secuencias complementarias de las presentadas en la presente memoria).

Además dentro del alcance de la presente invención están incluidas las secuencias polinucleotídicas que son capaces de hibridar las secuencias nucleotídicas presentadas en la presente memoria en condiciones de severidad intermedia a máxima.

En un aspecto preferido, la presente invención comprende las secuencias nucleotídicas que pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas de la presente invención, o el complemento de las mismas, en condiciones severas (por ejemplo, 50°C y 0,2 x SSC).

En un aspecto más preferido, la presente invención comprende las secuencias nucleotídicas que pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas de la presente invención, o el complemento de las mismas, en condiciones severas (por ejemplo, 65°C y 0,1 x SSC).

Recombinante

En un aspecto la secuencia para su utilización en la presente invención, es una secuencia recombinante, es decir, una secuencia que se ha preparado utilizando técnicas de ADN recombinante.

Estas técnicas de ADN recombinante están dentro de la capacidad de cualquier experto en la materia. Dichas técnicas están explicadas en la bibliografía, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Tomos 1 a 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sintética

En un aspecto la secuencia para su utilización en la presente invención es una secuencia sintética, es decir, una secuencia que se ha preparado por síntesis química *in vitro* o enzimática. Comprende de manera no limitativa las secuencias realizadas con uso óptimo del codón para organismos hospedadores, tal como las levaduras metilotrópicas *Pichia* y *Hansenula*.

Expresión de enzimas

La secuencia nucleotídica para su utilización en la presente invención puede incorporarse en un vector recombinante replicable. El vector puede utilizarse para replicar y expresar la secuencia nucleotídica, en forma enzimática, en y/o desde una célula hospedadora compatible.

La expresión puede controlarse utilizando secuencias de control por ejemplo, secuencias reguladoras.

La enzima producida por una célula hospedadora recombinante por la expresión de la secuencia nucleotídica puede ser segregada o puede estar contenida dentro de la célula en función de la secuencia y/o del vector utilizado. Las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de la sustancia que codifica las secuencias a través de una membrana de célula procariótica o eucariótica específica.

Vector de expresión

La expresión “vector de expresión” hace referencia a un montaje capaz de expresión *in vivo* o *in vitro*.

5 Preferentemente, el vector de expresión está incorporado en el genoma de un organismo hospedador adecuado. La expresión incorporado comprende preferentemente la incorporación estable en el genoma.

La secuencia nucleotídica de la presente invención puede estar presente en un vector en el que la secuencia nucleotídica está unida operativamente a las secuencias reguladoras capaces de proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica por un organismo hospedador adecuado.

Los vectores para su utilización en la presente invención pueden transformarse en una célula hospedadora adecuada tal como se describe a continuación para proporcionar la expresión de un polipéptido de la presente invención.

15 La elección del vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido o vector de fago con frecuencia dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir.

Los vectores para su utilización en la presente invención pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables tales como un gen que proporciona resistencia a antibióticos, por ejemplo, resistencia a la ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección puede realizarse por transformación conjunta (tal como se describe en el documento WO 91/17243).

Los vectores pueden utilizarse *in vitro*, por ejemplo para la producción de ARN o utilizarse para transfectar, transformar, transducir o infectar una célula hospedadora.

25 Por lo tanto, en una forma de realización adicional, la invención proporciona un procedimiento de preparación de secuencias nucleotídicas de la presente invención introduciendo una secuencia nucleotídica de la presente invención en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible y cultivando la célula hospedadora en condiciones que producen la replicación del vector.

30 El vector puede comprender además una secuencia nucleotídica que permite al vector replicarse en la célula hospedadora en cuestión. Los ejemplos de dichas secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pLJ702.

35 Secuencias reguladoras

En algunas aplicaciones, la secuencia nucleotídica para su utilización en la presente invención está operativamente unida a una secuencia reguladora que es capaz de proporcionar la secuencia nucleotídica, tal como mediante la célula hospedadora seleccionada. A título de ejemplo, la presente invención comprende un vector que comprende la secuencia nucleotídica de la presente invención operativamente unida a dicha secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.

45 La expresión “operativamente unida” se refiere a una yuxtaposición en la que los componentes descritos está en una relación que les permite funcionar de la manera deseada. Una secuencia reguladora “operativamente unida” a una secuencia de codificación está ligada de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de referencia.

La expresión “secuencias reguladoras” incluye activadores y potenciadores y/o otras señales de regulación de la expresión.

50 El término “activador” se utiliza en el sentido normal de la técnica, por ejemplo, una secuencia de fijación de la ARN polimerasa.

La expresión aumentada de la secuencia nucleotídica que codifica la enzima de la presente invención puede conseguirse también mediante la selección de zonas reguladoras heterólogas, por ejemplo, activador, zonas principal y terminadora de la secreción.

60 Preferentemente, la secuencia nucleotídica según la presente invención está operativamente unida por lo menos a un activador.

Los ejemplos de activadores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia nucleotídica en un hospedador bacteriano, fúngico o de levadura son bien conocidos en la técnica.

Montajes

65 El término “montaje” (que es sinónimo de términos tales como “conjugado”, “casete” e “híbrido”) incluye una secuencia nucleotídica para su utilización según la presente invención directa o indirectamente unida a un activador.

Un ejemplo de un acoplamiento indirecto es el aporte de un grupo espaciador adecuado tal como una secuencia intrónica tal como el intrón Sh1 o el intrón ADH intermedia el activador y la secuencia nucleotídica de la presente invención. Lo mismo es cierto para el término “fusionado” en relación con la presente invención que incluye el acoplamiento directo o indirecto. En algunos casos, los términos no comprenden la combinación natural de la secuencia nucleotídica que codifica la proteína normalmente asociada con el activador del gen natural y cuando ambos están en su medio natural.

El montaje puede contener o expresar incluso un marcador, lo que permite la selección del montaje genético.

Para algunas aplicaciones, preferentemente el montaje de la presente invención comprende por lo menos la secuencia nucleotídica de la presente invención unida operativamente a un activador.

Células hospedadoras

La expresión “célula hospedadora”, en relación con la presente invención incluye cualquier célula que comprenda la secuencia nucleotídica o un vector de expresión tal como se describió anteriormente y que se utiliza en la producción recombinante de una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

De este modo, una forma de realización adicional de la presente invención proporciona células hospedadoras transformadas o transfectadas con una secuencia nucleotídica que expresa la enzima de la presente invención. Las células se seleccionarán para que sean compatibles con dicho vector y pueden ser por ejemplo células procarióticas (por ejemplo bacterianas), fúngicas, levaduras o vegetales. Preferentemente, las células hospedadoras no son células humanas.

Los ejemplos de organismos hospedadores bacterianos adecuados son las especies bacterianas gram positivas o gram negativas.

Dependiendo de la naturaleza de la secuencia nucleotídica que codifica la enzima de la presente invención, y/o la conveniencia de procesar más la proteína expresada, pueden preferirse hospedadores eucarióticos tales como levaduras u otros hongos. En general, las células de levadura resultan preferidas en detrimento de las células de hongos porque son más fáciles de manipular, sin embargo algunas proteínas se segregan poco en la célula de la levadura, o en algunos casos no se tratan apropiadamente (por ejemplo, hiperglucosilación en levaduras). En estos casos, debería seleccionarse un organismo hospedador fúngico diferente.

La utilización de células hospedadoras adecuadas (tales como células de hospedadores de levaduras, de hongos y de vegetales) pueden proporcionar modificaciones tras la traducción (por ejemplo, miristoilación, glucosilación, truncamiento, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) ya que puede ser necesario proporcionar actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinante de la presente invención.

La célula hospedadora puede ser una cepa con insuficiente proteasa o sin proteasa.

El genotipo de la célula hospedadora puede modificarse para mejorar la expresión.

Los ejemplos de modificaciones de célula hospedadora incluyen la insuficiencia de proteasa, el enriquecimiento de los ARNt raros y la modificación del potencial reductor en el citoplasma para aumentar la formación del enlace disulfuro.

Por ejemplo, la célula hospedadora *E. coli* puede sobreexpresar los ARNt raros para mejorar la expresión de las proteínas heterólogas ilustradas, descritas en Kane (*Curr. Opin. Biotechnol.* (1995), 6, 494-500 “Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *E. coli*”). La célula hospedadora puede ser insuficiente en numerosas enzimas reductoras favoreciendo de este modo la formación de enlaces disulfuro estables tal como se ilustra/describe en Bessette (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (1999), 96, 13703-13708. “Efficient folding of proteins with multiple disulphide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm”).

Organismo

El término “organismo” en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que pueda comprender la secuencia nucleotídica que codifica la enzima según la presente invención y/o los productos obtenidos a partir de la misma, y/o en la que un activador puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica según la presente invención cuando está presente en el organismo.

Los organismos adecuados pueden incluir un procariota, una levadura, hongo o una planta.

La expresión “organismo transgénico” en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprenda la secuencia nucleotídica que codifica la enzima según la presente invención y/o los productos obtenidos a partir de la misma y/o en la que un activador puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica según la presente invención en el organismo. Preferentemente la secuencia nucleotídica está incorporada en el genoma del organismo.

La expresión “organismo transgénico” no comprende las secuencias de codificación nucleotídicas naturales en su medio natural cuando están bajo el control de su activador natural que está también en su medio natural.

Por consiguiente, el organismo transgénico de la presente invención incluye un organismo que comprende alguna de, o las combinaciones de, la secuencia nucleotídica que codifica la enzima según la presente invención, montajes según la presente invención, células según la presente invención, vectores según la presente invención, plásmidos según la presente invención, células según la presente invención, tejidos según la presente invención o los productos de los mismos.

Por ejemplo el organismo transgénico puede contener además la secuencia nucleotídica que codifica la enzima de la presente invención bajo el control de un activador heterólogo.

Transformación de las células/organismos hospedadores

Como se indicó al principio, el organismo hospedador puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Los ejemplos de hospedadores procarióticos incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

Lo dado a conocer en la transformación de hospedadores procarióticos está muy documentado en la técnica, por ejemplo véase Sambrook *et al.*, (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press). Si se utiliza un hospedador procariótico, entonces la secuencia nucleotídica puede ser necesario que esté modificada adecuadamente antes de la transformación, tal como por eliminación de intrones.

Las células de hongos filamentosos pueden transformarse utilizando varios procedimientos conocidos en la técnica, tales como los procedimientos que conllevan la formación del protoplasto y la transformación de los protoplastos seguidas de la regeneración de la pared celular de una manera conocida. La utilización de *Aspergillus* como microorganismo hospedador esta descrita en la patente EP 0 238 023.

Otro organismo hospedador puede ser una planta. Un estudio de las técnicas generales utilizadas para transformar plantas puede encontrarse en los artículos de Potrykus (*Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* [1991], 42: 205-225) y Christou (Agro-Food-Industry Hi-Tech, marzo/abril de 1994, 17-27). Las enseñanzas adicionales sobre la transformación de la planta pueden encontrarse en el documento EP A-0449375.

Las enseñanzas generales sobre la transformación de hongos, levaduras y plantas se presentan en los apartados siguientes.

Hongo transformado

Un organismo hospedador puede ser un hongo, tal como un hongo filamentosos. Los ejemplos de dichos hospedadores adecuados incluyen cualquier miembro que pertenece a los géneros *Thermomyces*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Neurospora*, *Trichoderma* y similares.

Las enseñanzas sobre transformación de hongos filamentosos se estudian en el documento US-A-5742665 que explica que las técnicas convencionales para la transformación de hongos filamentosos y el cultivo de hongos son bien conocidas en la materia. Un extenso estudio de las técnicas aplicadas a *N. crassa* se encuentra, por ejemplo en Davis y de Serres, *Methods Enzymol.* (1971) 17A:79-143.

Más enseñanzas sobre la transformación de hongos filamentosos se estudian en el documento US-A-5674707.

En un aspecto, el organismo hospedador puede ser del género *Aspergillus*, tal como *Aspergillus niger*.

Un *Aspergillus* transgénico según la presente invención puede prepararse, siguiendo, por ejemplo, las enseñanzas de Turner, G. 1994 (Vectors for genetic manipulation. En: Martinelli S.D., Kinghorn J.R. (editores) *Aspergillus: 50 years on. Progress in industrial microbiology*. Vol.29. Elsevier Amsterdam 1994. págs. 641-666).

La expresión génica en hongos filamentosos ha sido estudiada en Punt *et al.*, (2002) *Trends Biotechnol.* Mayo de 2002. 20(5): 200-6. Archer & Peberdy *Crit. Rev. Biotechnol.* (1997) 17(4): 273-306.

Levadura transformada

En otra forma de realización, el organismo transgénico puede ser una levadura.

Un estudio de los principios de expresión génica heteróloga en levadura se proporciona, por ejemplo, en *Methods Mol. Biol.* (1995), 49:341-54, y *Curr. Opin. Biotechnol.* (1997) Oct; 8(5): 554-60.

A este respecto, la levadura (tal como la especie *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* (véase *FEMS Microbiol. Rev.* (2000 24(1): 45-66)) puede utilizarse como vehículo para la expresión génica heteróloga.

Un estudio de los principios de la expresión génica heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y de la secreción de los productos génicos es proporcionado por E. Hinchcliffe, E. Kenny (1993), "Yeast as a vehicle for the expression of heterologous genes", *Yeasts*, Vol. 5. Anthony H. Rose y J. Stuart Harrison, editores, 2ª edición. Academic Press Ltd.).

Para la transformación de levaduras, se han desarrollado varios protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse un *Saccharomyces* transgénico según la presente invención siguiendo las enseñanzas de Hinnen *et al.*, (1978, Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75, 1929); Beggs, J. D. (1978, Nature, Londres, 275, 104); e Ito, H. *et al.*, (1983, *J. Bacteriology* 153, 163-168).

Las células de levadura transformadas pueden seleccionarse utilizando varios marcadores selectivos, tales como los marcadores auxótrofos, marcadores con resistencia a antibióticos dominante.

Plantas/células vegetales transformadas

Un organismo hospedador adecuado para la presente invención puede ser una planta. Un estudio de las técnicas generales puede encontrarse en los artículos de Potrykus (*Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* [1991], 42: 205-225) y Christou (Agro-Food-industry Hi-Tech, marzo/abril de 1994, 17-27).

Cultivo y producción

Las células hospedadoras transformadas con las secuencias nucleotídicas de la presente invención pueden cultivarse en condiciones que conduzcan a la producción de la enzima codificada y que faciliten la recuperación de la enzima y de las células y/o del medio de cultivo.

El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para el cultivo de las células hospedadoras en cuestión y obteniendo la expresión de la enzima.

La proteína producida por una célula recombinante puede expresarse en la superficie de la célula.

La enzima puede segregarse de células hospedadoras y puede recuperarse convenientemente del medio de cultivo utilizando procedimientos bien conocidos.

Secreción

A menudo, es deseable que el hospedador de expresión segregue la enzima en el medio de cultivo de donde puede recuperarse la enzima más fácilmente. Según la presente invención, la secuencia principal de secreción puede seleccionarse basándose en el hospedador de expresión deseado. Las secuencias de señal híbridas pueden utilizarse también en el contexto de la presente invención.

Los ejemplos típicos de secuencias principales de secreción heterólogas son las que se originan a partir del gen de amiloglicosidasa fúngica (AG) (*glaA*, ambas versiones de aminoácidos 18 y 24, por ejemplo, de *Aspergillus*), el gen del factor a (levaduras por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen de α -amilasa (*Bacillus*).

A título de ejemplo, la secreción de las proteínas heterólogas en *E. coli* se estudia en *Methods Enzymol.* (1990), 182: 132-43.

Detección

Una variedad de protocolos para detectar y medir la expresión de la secuencia de aminoácidos se conocen en la técnica. Los ejemplos incluyen el ensayo de inmunosorbente con enzima ligada (ELISA), radioinmunoanálisis (RIA) y clasificación de células activadas fluorescentes (FACS).

Una extensa variedad de marcadores y de técnicas de conjugación son conocidas por los expertos en la materia y pueden utilizarse en varios análisis de ácido nucleicos y aminoácidos.

Numerosas compañías, tales como Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ), Promega, Medison, Wi) y US Biochemical Corp. (Cleveland, OH) suministran kits comerciales y protocolos para estos procedimientos.

Las moléculas indicadoras o marcadores adecuados incluyen los radionúclidos, enzimas, agentes fluorescentes, quimioluminiscentes o cromógenos, así como sustratos, cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Las patentes que dan a conocer la utilización de dichos marcadores incluyen los documentos US-A-3.817.837, US-A-3.850.752, US-A-3.939.350, US-A-3.996.345, US-A-4.227.437, US-A-4.275.149 y US-A-4.366.241.

Además, las inmunoglobulinas recombinantes pueden producirse como se muestra en el documento US-A-4.816.567.

Proteínas de fusión

La secuencia de aminoácidos para su utilización según la presente invención puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo para ayudar a extracción y purificación. Ejemplos de acompañantes de la proteína de fusión incluyen la glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de fijación del ADN y/o de activación de la transcripción) y (β -galactosidasa). Puede ser conveniente además incluir una secuencia de escisión proteolítica en-

tre el acompañante de la proteína de fusión y la consecuencia proteica de interés que permita la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión.

Preferentemente, la proteína de fusión no impedirá la actividad de la secuencia proteica.

Los sistemas de expresión de la fusión génica, en *E. coli* han sido estudiados en *Curr. Opin. Biotechnol.* (1995), 6 (5): 501-6.

En otra forma de realización de la invención, la secuencia de aminoácidos puede estar ligada a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para el cribado de bancos de péptidos por agentes capaces de afectar la actividad de la sustancia, puede ser útil codificar una sustancia híbrida que expresa un epíteto heterólogo que es reconocido por un anticuerpo disponible en el mercado.

Aplicación a gran escala

En una forma de realización preferida de la presente invención, la secuencia de aminoácidos se utiliza para aplicaciones a gran escala.

Preferentemente la secuencia de aminoácidos es producida en una cantidad entre 1 g por litro y aproximadamente 2 g por litro del volumen del cultivo celular total después del cultivo del organismo hospedador.

Preferentemente la secuencia de aminoácidos es producida en una cantidad entre 100 mg por litro y aproximadamente 900 mg por litro del volumen del cultivo celular total después del cultivo del organismo hospedador.

Preferentemente la secuencia de aminoácidos es producida en una cantidad entre 250 mg por litro y aproximadamente 500 mg por litro del volumen del cultivo celular total después del cultivo del organismo hospedador.

Alimento

La composición de la presente invención puede utilizarse como (o en la preparación de) un alimento. Aquí, el término "alimento" se utiliza en sentido amplio y comprende alimento para personas así como alimento para animales (es decir, pienso). En un aspecto preferido, el alimento es para consumo humano.

El alimento puede estar en forma de solución o en forma sólida, dependiendo de la utilización y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Ingrediente alimenticio

La composición de la presente invención puede utilizarse como ingrediente alimenticio.

Tal como se utiliza en la presente memoria la expresión "ingrediente alimenticio" incluye una formulación, que se añade o puede añadirse a alimentos funcionales o a artículos alimenticios e incluye formulaciones que pueden utilizarse a bajas concentraciones en una amplia variedad de productos que requieren, por ejemplo, acidificación o emulsificación.

El ingrediente alimenticio puede estar en forma de una solución o en forma sólida, dependiendo de la utilización y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Productos alimenticios

La composición de la presente invención puede utilizarse en la preparación de productos alimenticios tales como uno o más de los siguientes: productos de pastelería, productos lácteos, productos de aves de corral, productos de pescado y productos de panadería.

La presente invención proporciona además un procedimiento de preparación de un alimento o de un ingrediente alimenticio, comprendiendo el procedimiento la mezcla de una enzima lipolítica según la presente invención con otro ingrediente alimenticio.

Ejemplos

La presente invención se describirá a continuación, únicamente a título de ejemplo, haciendo referencia a las figuras siguientes:

La figura 1 representa las características de la actividad de lipasa (indicadas por áreas con trama, marcadas como grupo B) y proteína (línea de trazos) obtenida después de la cromatografía IEC.

La figura 2 representa la enzima lipolítica fúngica purificada (bandas 3 a 5) aplicada a un gel (NU-PAGE, 4-12%, tampón Mes, preparado según describe el fabricante Novex, EE.UU.), que se tiñó a continuación con commassie.

ES 2 351 426 T3

La figura 3 representa el cromatograma nº 61.

La figura 4 representa la SDS-PAGE de las fracciones procedentes de la columna de butil-Sefarosa (P: Grupo nº 172-174 100 U/ml diluidas 1:10; Std = serie proteica patrón).

La figura 5 representa experimentos de minicocción con 1) Chr. nº 61 frac. 9. 2) Grupo nº 172- nº 174. 3) Chr. nº 61 frac.14. 4) Referencia. 5) Lipasa nº 3044.

La figura 6 representa el análisis por GLC de lípidos de la masa de digalactosildiglicérido (DGDG) y digalactosilmonoglicérido (DGMG) procedentes de BS8948-2.

La figura 7 representa la alineación de las secuencias de aminoácidos de todos los péptidos de CBS a la lipasa de la cepa japonesa de *F. heterosporum* (Nagao *et al.*1994). Aminoácidos idénticos y similares (bien conservados) están marcados bajo la alineación con * y, respectivamente.

La figura 8 representa una secuencia nucleotídica y la secuencia de aminoácidos traducida del gen sintético de la enzima lipolítica de *F. heterosporum* (CBS 782.83) fusionado a la secuencia señal alfa sintética. La secuencia de aminoácidos se presenta por encima de la secuencia nucleotídica. Los nucleótidos que contienen las secuencias *Eco* RI y *Bam* HI de la enzima de restricción están subrayados y los codones de inicio y terminación de la traducción están subrayados dos veces. Una cabeza de flecha marca la posición de la secuencia señal alfa y el gen de la enzima lipolítica. Las flechas indican los cebadores utilizados para el ensamblado del gen.

La figura 9 representa una representación esquemática del vector de expresión pB14 de *Hansenula* que contiene el gen sintético de la enzima lipolítica de *F. heterosporum* (CBS 782.83) (LIPASA) fusionado a una secuencia señal alfa sintética (alfa ss.). URA3, gen de orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa para la complementación del uracilo para la selección en *Hansenula*, HARS, secuencia de replicación autónoma para la replicación en *Hansenula*, FMD-P, activador de FMD para la expresión en *Hansenula*.

La figura 10 representa la actividad de fosfolipasa de los clones seleccionados de *Hansenula polimorfa* que contienen el gen de la enzima lipolítica *F. heterosporum* sintético. Se utilizó lecitina como sustrato y se determinó el ácido graso utilizando el kit NEFA (Roche).

La figura 11 representa un minipan horneado con dosis aumentada (PLU) de muestra 205 de fosfolipasa y Lipopan FTM.

La figura 12 representa el análisis por GLC de lípidos de la masa. DGDG = digalactosildiglicérido. DGMG = digalactosilmonoglicérido. Sum = DGDG+DGMG (Ejemplo 3).

La figura 13 representa un cromatograma por HPTLC de A) Referencias: 1. Lípido de harina fraccionado. 2. DGDG hidrolizado. 3. DGDG. B) Lípidos extraídos de la masa. 4. Referencia, 5. 2000 PLU-7/kg muestra 205 y 6. 40 ppm de Lipopan FTM.

La figura 14 representa análisis de GLC del isómero digalactosil-monoglicérido en la masa tratado con una enzima lipolítica procedente de *Fusarium heterosporum*.

La figura 15 representa actividad de la enzima lipolítica procedente de *Fusarium heterosporum* determinada en 10 minutos de enzimación de sustrato de lecitina, pH 7,0, a varias temperaturas y determinación posterior de ácidos grasos libres por el método de NEFA C.

La figura 16 representa actividad de la enzima lipolítica procedente de *Fusarium heterosporum* determinada después de 30 minutos de incubación en tampón de fosfato 50 mM a 3 TIPU/ml y varias temperaturas (tampón fosfato 50 mM, pH 7,0) durante 10 minutos de enzimación en sustrato de lecitina (sin CaCl₂) a 37°C y pH 7,0 y determinación posterior de ácidos grasos libres por el método NEFA C.

La figura 17 representa actividad de la enzima lipolítica procedente de *Fusarium heterosporum* determinada después de 10 minutos de incubación en sustrato de lecitina (sin CaCl₂) a 37°C y a varios pH (tampón fosfato 50 mM) y determinación posterior de ácidos grasos libres por el método NEFA C.

La figura 18 representa actividad de la enzima lipolítica procedente de *Fusarium heterosporum* determinada después de 30 minutos de incubación en tampón de fosfato 50 mM a 3 TIPU/ml y varios pH (tampón fosfato 50 mM) durante 10 minutos de enzimación en sustrato de lecitina (sin CaCl₂) a 37°C y pH 7,0 y determinación posterior de ácidos grasos libres por el método NEFA C.

Las figuras 19a y 19b representan la determinación del peso molecular, determinado por SDS-PAGE, de una enzima lipolítica procedente de *Fusarium heterosporum*.

La figura 20 representa la temperatura óptima para una enzima lipolítica según la presente invención. La reacción enzimática se realizó a varias temperaturas.

ES 2 351 426 T3

La figura 21 representa la cantidad de lecitina en la yema de huevo modificada con enzima en función del tiempo de reacción a A: 30°C, B: 40°C y C: 50°C. La cantidad de lecitina se analizó por LC/MS-MS y se expresa en porcentaje de yema de huevo.

5 La figura 22 representa la cantidad de lisolecitina en la yema de huevo modificada con enzima en función del tiempo de reacción a A: 30°C, B: 40°C y C: 50°C. La cantidad de lisolecitina se analizó por LC/MS-MS y se expresa en porcentaje de yema de huevo.

10 La figura 23 representa la cantidad de ácido graso libre en la yema de huevo modificada con enzima en función del tiempo de reacción a A: 30°C, B: 40°C y C: 50°C. La cantidad de ácido graso libre se analizó por NEFA C y se expresa en porcentaje de yema de huevo.

15 La figura 24 representa la conversión enzimática de la yema de huevo con una enzima lipolítica según la presente invención (Ejemplo 4). Las cantidades de lisolecitina (A), ácido graso libre (B) y lecitina (C) en función del tiempo de reacción. Las barras de error indican la desviación estándar de las determinaciones por duplicado (n = 2). La cantidad de lecitina y lisolecitina se determinaron por LC/MS-MS y la cantidad de ácido graso libre se determinó por el método NEFA C. Los resultados se expresan en porcentaje de yema de huevo.

20 La figura 25 representa la conversión enzimática de la yema de huevo con Lecitasa® Ultra fosfolipasa de Novozymes A/S (Ejemplo 4). Las cantidades de lisolecitina (A), ácido graso libre (B) y lecitina (C) en función del tiempo de reacción. Las barras de error indican la desviación estándar de las determinaciones por duplicado (n = 2). La cantidad de lecitina y lisolecitina se determinaron por LC/MS-MS y la cantidad de ácido graso libre se determinó por el método NEFA C. Los resultados se expresan en porcentaje de yema de huevo.

25 La figura 26 representa el análisis por TLC (el disolvente era cloroformo:metanol:agua) (65:24:4)) del extracto lipídico de la yema de huevo modificada (Ejemplo 4). 1: LPC y LPC estándar. 2: Enzima lipolítica según la presente invención, 10°C, 240 min. 3: enzima lipolítica según la presente invención, 20°C, 240 min. 4: Enzima lipolítica según la presente invención, 53°C, 240 min. 5: Enzima lipolítica según la presente invención, 20°C, 1440 min. 6: Lecitasa® Ultra 10°C, 4 h. 7: Lecitasa® Ultra 20°C, 240 min. 8: Lecitasa® Ultra 53°C, 4 h. 9: Lecitasa® Ultra 20°C, 1440 min. 10: Muestra de referencia. Los compuestos listados a la izquierda de la placa de TLC son colesterol (C), triacilglicérido (TG), diacilglicérido (DG) ácido graso libre (FFA), monoacilglicérido (MG), fosfatidiletalonamina (PE), fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidiletalonamina (LPE) y lisofosfatidilcolina (LPC).

35 La figura 27 representa la relación entre el cambio en lisolecitina y el contenido en ácido graso libre durante la enzimación de la yema de huevo con una enzima lipolítica según la presente invención y Lecitasa® Ultra fosfolipasas, respectivamente (Ejemplo 4). Los resultados se basan en un peso molar de lisolecitina de 523 y un peso molar de ácidos grasos libres de 283. El ácido graso libre se determinó por el método NEFA C, la lisolecitina y la lecitina se determinaron por LC/MS-MS.

40 La figura 28 representa el análisis por HPTLC (el disolvente era p-éter:MTBE:ácido acético (50:50:1)) de extracto de lípido procedente de yema de huevo modificada (Ejemplo 4). Los compuestos listados a la izquierda de la placa de TLC son triacilglicérido (TG), ácido graso libre (FFA), 1,3-diacilglicérido (1,3 DG), 1,2-diacil-glicérido (1,2 DG), colesterol (C), monoacilglicérido (MG), fosfatidiletalonamina (PE), fosfatidilcolina (PC), lisofosfatidiletalonamina (LPE) y lisofosfatidilcolina (LPC).

45 La figura 29 representa el análisis por TLC (disolvente IV) de la mayonesa preparada con yema de huevo modificada por enzimas procedente de Sanofa A/S (Ejemplo 5).

50 La figura 30 representa mayonesa preparada a partir de yema de huevo modificada con enzimas de Sanofa A/S tratada térmicamente en una estufa de microondas (Ejemplo 5). La muestra 1 era una referencia con agua añadida en lugar de solución enzimática, la muestra 2 contenía 30 U/g de enzima lipolítica según la presente invención y la muestra 3 contenía 30 U/g de Lecitasa® Ultra.

55 La figura 31 representa el volumen de pan específico de panecillos de corteza dura horneados con diferentes concentraciones de una enzima lipolítica según la presente invención sola o en combinación con emulsionante Panodan® M2020 DATEM y probado frente a una combinación de Lipopan F™ y de DATEM así como Lipopan F™ puro o DATEM puro.

60 La figura 32 representa el volumen de pan específico de panecillos de corteza dura horneados con diferentes concentraciones de una enzima lipolítica según la presente invención sola o en combinación con emulsionante Panodan® A2020 DATEM o SSL P 55 y probado frente a una combinación de Lipopan F™/SSL P 55 o Lipopan F™/DATEM así como Lipopan F™ puro, DATEM puro y SSL P 55 puro.

65 La figura 33 representa la secuencia nucleotídica (SEC. ID. n° 5) y la secuencia de aminoácidos deducida (SEC. ID. n° 4) del ADNc de lipasa de *F. semitectum* (IBT 9507). La secuencia de aminoácidos deducida se presenta encima de la secuencia nucleotídica. Las flechas indican los cebadores utilizados para la ampliación del ADNc.

ES 2 351 426 T3

La figura 34 representa una representación esquemática del vector de expresión pDB14-alp-sem de *Hansenula* que contiene el gen de lipasa de *F. semitectum* (Lipasa) fusionado a la secuencia señal α (alfa ss.). AP(R), URA3, el gen de orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa para complementación de uracilo para selección. HARS, secuencia de replicación autónoma para replicación en *Hansenula*. FMD-P, activador de FMD para la expresión de *Hansenula*.

La figura 35 representa la actividad de fosfolipasa de una enzima lipolítica procedente de IBT 9507 de *Fusarium semitectum* en función de la temperatura.

La figura 36 representa la actividad de fosfolipasa de una enzima lipolítica procedente de IBT 9507 de *Fusarium semitectum* en función del pH.

La figura 37 representa una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 1) de una enzima lipolítica fúngica procedente de *Fusarium heterosporum*.

La figura 38 representa una secuencia de aminoácidos de una enzima lipolítica fúngica procedente de *Fusarium heterosporum*, que comprende una secuencia señal del terminal N (subrayada) (SEC. ID. nº 2).

La figura 39 representa secuencia nucleotídica (SEC. ID. nº 3) que codifica una enzima lipolítica fúngica procedente de *Fusarium heterosporum*, según la presente invención.

La figura 40 representa secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 4) de una enzima lipolítica procedente de *Fusarium semitectum*.

La figura 41 representa secuencia nucleotídica (SEC. ID. nº 5) que codifica una enzima lipolítica procedente de *Fusarium semitectum*.

La figura 42 representa una secuencia de aminoácidos (SEC. ID. nº 6) de una enzima lipolítica procedente de *Fusarium heterosporum* (EAEA es un propéptido originalmente procedente de la secuencia señal del factor α).

La figura 43 representa una secuencia nucleotídica (SEC. ID. nº 7) de una enzima lipolítica que incluye una secuencia señal del factor α .

Ejemplo 1

Expresión, purificación, secuenciado y pruebas de coacción de una enzima lipolítica de Fusarium heterosporum

Fermentación

La cepa CBS 782.83 de *Fusarium heterosporum* se adquirió en Centraalbureau voor Schimmelcultures (Holanda).

Medio de cultivo

Agar-agar con glucosa y extracto de levadura

Extracto de levadura	4 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 g/l
Glucosa	15 g/l
Agar-agar	20 g/l

Se añadió glucosa después de esterilización en autoclave.

Medio de prefermentación

Harina de soja	50 g/l
Glucosa monohidratada	50 g/l
KH ₂ PO ₄	2 g/l
Na ₂ HPO ₄	3 g/l
Aceite de soja	1 g/l

ES 2 351 426 T3

Se preparó el medio en frascos de agitación de 500 ml con tabiques y se añadieron 100 ml por matraz de agitación. Se añadió aceite de soja a cada matraz por separado.

Se añadió glucosa después de la esterilización en autoclave.

Medio de producción

Peptona	10 g/l
Tween TM-80	12 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,1g/l

Se preparó el medio en matraces de agitación de 500 ml con tabiques y se añadieron 100 ml por matraz de agitación. Se añadió Tween TM-80 a cada matraz por separado.

Se ajustó el pH a 6,0 antes de la esterilización en autoclave.

Condiciones del cultivo

Se inoculó CBS 782.83 de *Fusarium heterosporum* en placas con agar-agar y glucosa-extracto de levadura, que se incubaron a 24°C hasta el desarrollo de esporas.

Un matraz de agitación que contenía medio de pre fermentación se inoculó con 4 cm² de placa agaragar que contenía un cultivo de esporulación en un pocillo. El matraz de agitación se incubó a 30°C y 200 rpm. Después de 3 días de cultivo, 30 matraces de agitación con medio de producción se inocularon cada uno con 5 ml de caldo de fermentación procedente del matraz de agitación de pre fermentación. Los matraces de agitación con medio de producción se incubaron a 30°C y 200 rpm.

Se recogieron diez matraces de agitación con medio de producción después de 2, 3 y 4 días de cultivo. Se eliminó la biomasa por centrifugación seguido de filtración estéril del sobrenadante a través de filtros de 0,2 µm (VacuCap 90 Filter Unit w/0,2 µm Supor Membrane) de Gelman Laboratory. Tras la filtración, se congeló el filtrado a -80°C y se almacenó hasta el análisis.

Procedimientos analíticos

Se determinó la actividad de fosfolipasa según el “análisis PLU” descrito anteriormente en la presente memoria.

Aplicación

Análisis por TLC

Se activó la placa por TLC en una cabina calorífica (110°C) durante ½ h.

Se vertieron 100 ml de tampón corriente en una cámara de cromatografía con tapa. Las paredes de la cámara se cubrieron con papel de filtro (Whatman 2) para saturar la cámara con el vapor del disolvente.

La placa de TLC se colocó en un marco y se aplicó la muestra en la placa de TLC a 2 cm del fondo. Se colocó a continuación la placa de TLC en la cámara de TLC con el tampón corriente seleccionado. Cuando el tampón corriente llegó a 14 cm del fondo de la placa, la placa de TLC se sacó y se secó en una cámara de gases, y a continuación se colocó en la cabina calorífica a 110°C durante 10 minutos.

La placa de TLC se sumergió a continuación en el reactivo revelador y se secó en la cabina calorífica a 110°C durante 15 minutos.

Tampón corriente

nº IV: cloroformo : metanol : H₂O (65:25:4)

nº I : P-éter : éter metil-terc-butílico (MTBE) : ácido acético (60:40:1).

Tampón revelador (tampón de vanadato)

32 g de Na₂CO₃ ad 300 ml de H₂O (1 M).

ES 2 351 426 T3

Se añadieron 18,2 g de pentóxido de vanadio (V_2O_5) y se disolvieron durante el calentamiento suave y se hornearon en una estufa "BACO-LINE" durante 6 minutos.

La solución se enfrió hasta temperatura ambiente.

Se añaden con cuidado 460 ml de H_2SO_4 2,5 M (460 ml de H_2O + 61 ml de H_2SO_4).

Se añadió agua hasta 1000 ml.

Cromatografía de gases

Cromatógrafo de gases capilar Perkin Elmer 8420 equipado con una columna de sílice fundida WCOT de 12,5 m x 0,25 mm D.I. x 0,1 μm 5% de fenil-metil-silicona (CP Sil 8 CB de Crompack).

Gas portador: helio

Inyección: 1,5 μl con desdoblamiento.

Detector: FID. 385°C

Programa en estufa:	1	2	3	4
Temperatura de la estufa [°C]	80	200	240	360
Isoterma, tiempo [min.]	2	0	0	10
Ritmo de temperatura [°C/min]	20	10	12	

Preparación de la muestra: Se disolvieron 50 mg de lípido de trigo en 12 ml de heptano:piridina 2:1 que contenía un heptadecano como patrón interno, 2 mg/ml. Se transfirieron 500 μl de la muestra a un vial traslúcido. Se añadieron 100 μl de MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida) y se incubó la reacción durante 15 minutos a 90°C. Cálculo: Se determinaron los factores de respuesta para mono di-triglicéridos, ácido graso libre y galactolípidos de las mezclas de referencia de éstos componentes. Basándose en estos factores de respuesta se calcularon los lípidos en la masa.

Prueba de minihorneado

Se añadieron los siguientes ingredientes a un tazón de mezclado Brabender de 50 g y se amasaron durante 5 minutos a 30°C: 50 g de harina, 10 g de levadura seca, 0,8 g de azúcar, 0,8 g de sal, 70 ppm de ácido ascórbico y agua (hasta una consistencia de la masa de 400 unidades Brabender). El tiempo restante fue de 10 min. a 34°C. Se pesaron 15 g de masa. A continuación se moldeó en un dispositivo especial donde se pasó la masa por rodillos entre una placa de madera y un marco de plexiglás. Las masas se envasaron herméticamente en latas durante 45 min. a 34°C y se hornearon en una estufa doméstica Voss durante 8 min. a 225°C.

Tras el horneado los panes se enfriaron a temperatura ambiente y después de 20 min. se pesaron los panes y se determinó el volumen por el método de desplazamiento de la semilla de colza. Los panes se cortaron además y se evaluó la miga y la corteza.

Pruebas piloto de horneado (panecillos con corteza dura)

Se amasaron en un mezclador Hobart con gancho durante 2 minutos a baja velocidad y 9 minutos a alta velocidad: 1500 g de harina, reforma de Danish, 90 g de levadura, 24 g de azúcar, 24 g de sal, 400 unidades Brabender de agua + 2%. La temperatura de la masa fue de 26°C. Se pesaron 1350 g de masa. Se dejó la masa en reposo durante 10 minutos a 30°C y se moldeó en un moldeador Fortuna. La masa se comprobó a continuación durante 45 minutos a 34°C. se horneó la masa en un horno Bago durante 18 minutos a 220°C y se coció con vapor durante 12 segundos.

Tras el enfriamiento, se pesaron los panecillos y se midió el volumen de los panecillos por el método de desplazamiento de la semilla de colza.

Volumen específico del pan

Volumen específico = $\frac{\text{Volumen del pan, ml}}{\text{Peso del pan, gramos}}$

*Resultados y exposición**Fermentación*

Se analizó en las muestras de fermentación la actividad de la fosfolipasa y los resultados se presentan en la Tabla 1.

TABLA 1

Resultados de la fermentación

D.I.	Organismo	Etiqueta de la muestra	PLU-7
172	CBS 782.83 de <i>Fusarium heterosporum</i>	^a Medio de. día 2	35
173	CBS 782.83 de <i>Fusarium heterosporum</i>	Medio de. día 3	33
174	CBS 782.83 de <i>Fusarium heterosporum</i>	Medio de. día 4	26
^a Medio D = medio de producción			

Se ha visto que la actividad de la fosfolipasa era casi idéntica los días 2, 3 y 4 y todas las muestras se mezclaron por consiguiente y se denominaron JBS-2254-97-3.

Purificación y secuenciado

Purificación de la fosfolipasa del extracto de crudo utilizando cromatografía de intercambio aniónico:

Se preparó la columna (Q-Sepharose FF 1,5 x 2,8 cm, 5 ml de gel) tal como describe el fabricante (Amersham Bio.) y a continuación se equilibró en tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 0,1 M, pH 7,5 (tampón A). Se añadió la muestra (15 ml) a NaCl 0,1 M y se aplicó a la columna a un caudal de 3,5 ml/min. Se eluyó la enzima lipolítica con un gradiente lineal de NaCl 0-0,6 M en tampón A (véase la figura 1). Se recogieron fracciones de 3,5 ml durante la serie completa. Se sometieron 10 µl de cada fracción a un análisis de manchas en placa. Se determinó la actividad de la lipasa mediante el análisis en placa de manchas de tributidina y lecitina (se transfirieron 10 µl de cada fracción al orificio y la placa se incubó a 40°C. La formación de halos en los geles de agarosa tienen lugar en función del tiempo. Se añadió también un blanco sin enzima a uno de los orificios para comparación. Las fracciones que contenían actividad lipolítica se sometieron a continuación a SDS-PAGE (véase la figura 2) y análisis del terminal N.

Toma de la huella enzimática por MALDI-TOF y secuenciado de aminoácidos

Se redujo la proteína con ditiotretol y se protegieron los restos de cisteína por carboximetilación utilizando yodoacetamida. Se escindió la proteína con tripsina y el modelo de fragmentación de los péptidos tripticos se examinó por análisis MALDI-TOF. Se separaron los péptidos por cromatografía en una columna de HPLC de C₁₈-fase inversa, y se controló el grado de purificación por análisis MALDI-TOF. Se determinó la secuencia de aminoácidos por degradación de Edman tal como se describió anteriormente con detalle en TR6452.

Se ha determinado la secuencia completa de aminoácidos de la enzima lipolítica de *Fusarium heterosporum*. La digestión con tripsina proporcionó péptidos muy específicos cuando pudo determinarse el P.M. (MALDI-TOF) de manera concluyente. Las secuencias de aminoácidos para todos los péptidos se determinaron también por degradación de Edman. La secuencia de aminoácidos determinada por la degradación de Edman comprende el 99,64% de la cadena de polipéptidos de la enzima lipolítica de *Fusarium heterosporum*.

El resumen de los estudios de degradación de MALDI-TOF y Edman se muestra en la Tabla 2.

ES 2 351 426 T3

TABLA 2

Toma de la huella enzimática y P.M. de los péptidos tripticos de la enzima lipolítica de *Fusarium heterosporum* y determinación de la secuencia completa de aminoácidos por degradación de Edman

Enzima lipolítica de <i>Fusarium heterosporum</i> (2254-97-3)				
Nº	De	Secuencia	M+H calc	M+H obs
1	1-13	AVGVSTSTDFTNFK	1387.5	
2+	14-33	FYIQHGAAAYCNSGTAAGAK	2059.2	2059. 0
3+	34-59	ITCSNNGCPTIESNGVT/VASFTGSK	2701.9	
4+	60-72	TGIGGYVSTDSSR	1300.4	
5+	73-73	K	147.2	
6+	74-80	EIVVAIR	780.0	780.0
7	81-86	GSSNIR	632.7	
8+	87-128	NWLTNLDQDFQSDCSLVSGCGVHSGFQNA W A EISAQASAAVAK	4514.8	
9	129-130	AR	246.3	
10	131-131	K	147.2	
11	132-137	ANPSFK	663.8	
12+	138-158	VVATGHSLGGAVATLSAANLR	1966.3	1966. 1
13+	159-173	AAGTPVDIYTYGAPR	1552.7	1552. 6
14+	174-192	VGNAALSAFISNQAGGEFR	1910.1	1910. 0
15	193-197	VTHDK	599.7	
16	198-202	DPVPR	583.7	
17+	203-211	LPPLIFGYR	1076.3	1076. 3
18+	212-226	HTTPEYWLSGGGGDK	1605.7	
19+	227-235	VDYAISDVK	1010.1	
20a	236-274	VCEGAANLMCNGGTLGLDIDAHLYFQATD ACNAGGFSW*	4231.5	4233. 2
20b+	236-275	VCEGAANLMCNGGTLGLDIDAHLYFQATD ACNAGGFSW*R	4387.7	4387. 8
+ = confirmado por secuenciado de Edman * = cobertura de la secuencia de triptófano oxidado = 99,64%				

La secuencia completa de aminoácidos de la enzima lipolítica de *Fusarium heterosporum* se muestra como SEC. ID. nº 1 (véase la figura 37).

Pruebas de aplicación

Una mezcla de 2 litros procedente de las tres muestras de *F. heterosporum* (Tabla 1), mezcla nº 172-174 marcada, se concentró por ultrafiltración (filtro de 10 kDa) en una unidad de ultrafiltración Amicon. 250 ml de lo retenido contenían aprox. 100 PLU-7/ml. Lo retenido se ajustó a acetato amónico 1 M y se aplicó a una columna de butil Sepharose de 27 ml (2,5 cm de d.i.) y se eluyó con tampón A acetato-NH₄ 1 M en TEA 20 mM pH 7,4 y tampón B TEA 20 mM pH 7,4. El cromatograma (nº 61) procedente de la purificación se muestra en la figura 3.

Se analizaron por SDS-PAGE las fracciones del cromatograma nº 61 tal como se muestra en la figura 4.

Se recogieron fracciones de 10 ml de esta cromatografía y se analizó la actividad de fosfolipasa como se muestra en la Tabla 3. Estos resultados indican una cantidad completamente alta de actividad de fosfolipasa en las fracciones eluidas en el pico principal del cromatograma. La cantidad pequeña de actividad no está unida a la columna pero se eluye en el frente. Aunque el gel SDS no se detectó tan finamente, se observa que las fracciones contienen varias proteínas, pero las fracciones 14 y 15 contienen una banda principal, que es de esperar que sea la enzima lipolítica fúngica.

ES 2 351 426 T3

TABLA 3

Cromatograma nº 61	PLU-7
Frac. 8	32
Frac. 9	89
Frac. 10	69
Frac. 11	51
Frac. 12	39
Frac. 13	81
Frac. 14	23
Frac. 15	17

La fracción 9 y la fracción 14 del cromatograma nº 61 se utilizaron para una prueba de minihorneado y además la mezcla nº 172-174 no purificada se probó en la miniprueba de horneado. Los resultados de este experimento de horneado se muestran en la Tabla 4. Esto demuestra claramente que la enzima lipolítica purificada de la CBS 782.83 de *F. heterosporum* da muy buenos resultados de horneado en cuanto al volumen mejorado del pan. Además la muestra no purificada contribuyó a un volumen del pan muy agradable. La estructura de la miga de los panes mejoró también mucho por la enzima lipolítica de *F. heterosporum* tal como se indica en la figura 5, y se evaluó mejor que una lipasa procedente de la 3044 de *Pseudomona cepacia*.

TABLA 4

Muestra	Enzima	PLU-7/50 g de harina	Volumen del pan ml/g
1	Chr #61 frac 9	100 U	4,33
2	Mezcla #172-174	100U	4,33
3	Chr #61 frac. 14	100 U	4,60
4	Referencia	0	3,29
5	Lipasa, #3044	40 ppm	4,38

Se extrajo la masa de este experimento de minihorneado con butanol saturado con agua y los lípidos se analizaron por TLC. El análisis por TLC confirmó que la lipasa nº 3044 es más activa en triglicérido que la enzima lipolítica procedente de mezcla de *F. heterosporum*. La cantidad de ácidos grasos libres (FFA) es también mayor con la lipasa nº 3044. La TLC en disolvente IV indica un componente (DGMG), que es claramente superior en las muestras de lípidos de la masa tratados con *F. heterosporum* en comparación con una lipasa nº 3044 que hidroliza el triglicérido.

Las fracciones purificadas de *F. heterosporum* se probaron también en un experimento piloto de horneado con los resultados mostrados en la Tabla 5.

TABLA 5

Utilización de fracciones purificadas por cromatografía de F. heterosporum en la prueba piloto de horneado y efectos sobre el volumen del pan

Nº		Volumen específico (ccm/g)
1	Referencia	5,11
2	500U F. het. Mezcla #172-#174	6,28
3	1000U F. het Mezcla #172-#174	6,79
4	40ppm #3044 (Pseudomonas)	5,27
5	2000U F. het. Mezcla #172-#174	6,24
6	4000U F. het. Mezcla #172-#174	4,95
7	1000U 2254-97 C61	6,95
8	40 ppm #3016 (LipopanF™)	6,97

ES 2 351 426 T3

Se extrajo la masa de esta prueba de horneado con butanol saturado con agua y los lípidos de la masa se analizaron por análisis de GLC con los resultados mostrados en la Tabla 6.

TABLA 6

Análisis por GLC de los lípidos de la masa. GL = glicerol. FFA = ácido graso libre. MGMG = monogalactosilmonoglicérido. DAG = diglicérido. DGMG = digalactosil-monoglicérido. MGDG = monogalactosildiglicérido. DGDG = digalactosildiglicérido. TRI = triglicérido

	GL	FFA	MGMG	DAG	DGMG	MGDG	DGD G	TRI
Referencia	0,120	0,152	0,0015	0,0771	0,0195	0,0644	0,172	0,770
500UF. het. Mezcla #172-#174	0,121	0,250	0,012	0,059	0,057	0,030	0,139	0,792
1000U F. het Mezcla #172-#174	0,121	0,277	0,018	0,056	0,087	0,010	0,102	0,738
40ppm #3044	0,127	0,368	0,002	0,132	0,022	0,066	0,173	0,276
2000U F. het. Mezcla #172-#174	0,122	0,320	0,018	0,060	0,119	0,013	0,062	0,723
4000U F. het. Mezcla #172-#174	0,128	0,332	0,021	0,065	0,146	0,010	0,033	0,739
1000U 2254-97 C61	0,125	0,287	0,019	0,067	0,088	0,016	0,099	0,655
40 ppm#3016	0,124	0,284	0,017	0,058	0,086	0,014	0,101	0,723

La relación de hidrólisis de DGDG comparada con la hidrólisis del triglicérido se muestra en la Tabla 7.

Los análisis por GLC de los galactolípidos, se ilustran también gráficamente en la figura 6.

Los resultados de la GLC confirman que la cantidad de DGMG producida en la masa por *F. heterosporum* es mayor que la cantidad producida por 40 ppm de Lipopan F (n° 3016). Los resultados indican además un grado mayor de hidrólisis de MGDG que de DGDG. Los resultados indican además que la cantidad de triglicérido hidrolizada es baja en comparación con una enzima que hidroliza el triglicérido normal como la n° 3044 de *P. cepacia*. Los resultados del horneado a escala piloto y los análisis del lípido confirmaron que la enzima lipolítica de la CBS 782.83 de *F. heterosporum* presenta actividad hidrolítica evidente sobre digalactosildiglicérido (DGDG) y la formación de digalactosilmonoglicérido (DGMG) en una masa.

TABLA 7

Relación de la hidrólisis de DGDG en comparación con la hidrólisis del triglicérido de las fracciones purificadas por cromatografía de *Fusarium heterosporum*

	dTRI	dDGDG	dDGDG/dTRI
Referencia			
500U F. het. Mezcla #172-#174	0	0.033	n/a
1000U F. het Mezcla #172-#174	0.032	0.07	2.19
40ppm #3044	0.494	0	n/a

Conclusiones

En este estudio, se produjo por fermentación una enzima lipolítica fúngica de CBS 782.83 de *F. heterosporum* en matraces de agitación. Se purificó la enzima y se determinó la secuencia de aminoácidos. La enzima presenta aproximadamente 83% de homología con una lipasa comercial de *F. oxysporum* (Lipopan FTM). La enzima dio muy buenos resultados en la prueba de horneado en cuanto al volumen de pan mejorado y mejoró la estructura de la

miga. El análisis de lípidos de la masa confirmó que la enzima era activa sobre galactolípidos durante la producción de galactomonoglicéridos. Sin optimización de la dosis, los resultados del horneado indican que la enzima lipolítica fúngica procedente de CBS 782.83 de *F. heterosporum* es por lo menos equivalente a la enzima comercial Lipopan F, y la DGDG comparativa para la actividad de triglicéridos indica que esta enzima tiene una actividad enzimática superior en un medio de la masa en comparación con Lipopan FTM.

Ejemplo 2

*Construcción y expresión de un gen sintético que codifica una enzima lipolítica de *F. heterosporum* (CBS 782.83) en *Hansenula polymorpha**

Se determinó la secuencia de aminoácidos de una enzima lipolítica fúngica aislada de *F. heterosporum* (CBS 782.83) y se utilizó para diseñar y clonar un gen sintético de enzima lipolítica para la expresión en *Hansenula polymorpha*. Para favorecer la alta expresión, los codones del gen sintético se optimizaron para que estuvieran de acuerdo con las preferencias de codón de *Hansenula polymorpha*. Se sintetizó una secuencia señal del factor alfa optimizada en el codón también y se clonó enfrente del gen sintético de la enzima lipolítica. El montaje ensamblado se transfirió al vector de expresión pB 14 y se transformó en *Hansenula polymorpha*. pB 14 es un plásmido sin genes que proporciona resistencia a antibióticos y puede por consiguiente utilizarse en instalaciones de producción.

En numerosas enzimas lipolíticas que producen cepas de *Fusarium* se identificaron actividades con una alta proporción de actividad de galactolípidos y/o fosfolípidos en comparación con triglicéridos.

Se han seleccionado varias cepas que producen enzimas lipolíticas de interés. Entre éstas está la *Fusarium heterosporum* (CBS 782.83). La enzima lipolítica procedente de esta cepa se ha aislado por consiguiente y se ha determinado la secuencia de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos se volvió a traducir en una secuencia de ácido nucleico que se utilizó para diseñar y construir un gen sintético para la expresión en *Hansenula polymorpha*.

Experimental

La cepa de *Hansenula* utilizada en este estudio fue la cepa RB11(*odc1*) de *Hansenula polymorpha* auxótrofa con uracilo obtenida en Rhein Biotech GmbH (Düsseldorf, Alemania).

Toma de la huella enzimática por MALDI-TOF y secuenciado de aminoácidos

Se aisló una proteína con actividad de enzima lipolítica de *Fusarium heterosporum* (CBS 782.83). La proteína se redujo con ditioneitol y los restos de cisteína se protegieron por carboximetilación utilizando yodoacetamida. La proteína se escindió con tripsina y el modelo de fragmentación de los péptidos tripticos se examinó por análisis MALDI-TOF. Se separaron los péptidos por cromatografía en una columna de HPLC de C₁₈ en fase inversa, y se controló el grado de purificación por análisis MALDI-TOF. Se determinó la secuencia de aminoácidos por degradación de Edman como se describió anteriormente en detalle en TR6452.

Diseño y construcción de un gen sintético de la enzima lipolítica

Las secuencias de aminoácidos de los fragmentos peptídicos se ordenaron por alineación con la cepa japonesa de *Fusarium heterosporum* (Nagao *et al.*, 1994). La secuencia de aminoácidos completa se volvió a traducir en una secuencia de ácido nucleico para dar a conocer todos los codones posibles. Para cada codón se seleccionó el codón más favorable para la expresión en *Hansenula polymorpha* según la tabla de preferencia de codones de los genes expresados en *Hansenula polymorpha*. Se sintetizaron oligonucleótidos sintéticos, cada uno de aproximadamente 100 nucleótidos de longitud, que comprenden el gen completo, y el gen se ensambló por RCP. Para la ampliación final del gen se utilizó un cebador corriente arriba (alps.cbss) diseñado con la mayoría de los nucleótidos en 5' del extremo 3' de la secuencia señal del factor alfa, para permitir la fusión del marco, y un cebador corriente abajo (cbss.t) diseñado con una secuencia de la enzima de restricción *Bam* HI para la clonación (Tabla 8).

Una secuencia nucleotídica que codifica la secuencia señal del factor de apareamiento alfa de levadura fue sintetizado de manera similar con codones favorables por oligonucleótidos y se amplió por RCP. Para la ampliación final de la secuencia señal alfa se utilizó un cebador corriente arriba (alpsynt) diseñado con una secuencia de la enzima de restricción *Eco* RI para clonación, y el cebador corriente abajo (cbss.alps) diseñado con la mayoría de las secuencias 5' del extremo 5' del gen sintético de la enzima lipolítica para permitir la fusión del marco (Tabla 8).

Para fusionar la secuencia señal sintética del factor alfa al gen sintético de la enzima lipolítica se mezclaron los dos fragmentos y se volvieron a ampliar con los cebadores externos alpsynt y cbss.t (Tabla 8). El producto de la RCP se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se determinó la secuencia nucleotídica de las inserciones utilizando un kit de secuenciado de ciclo BigDye Terminator v3.0 (Applied Biosystems) y un analizador genético ABI Prism 3100(Applied Biosystems).

TABLA 8

Secuencias de cebador utilizadas para la ampliación y montaje del gen de la enzima lipolítica de *F. heterosporum* (CBS 782.83) sintético y la secuencia señal sintética alfa. Las secuencias de la enzima de reducción introducidas para clonación en cada cebador están subrayadas. Los nucleótidos incluida la fusión permitidora del gen sintético de la enzima lipolítica y la señal alfa sintética están subrayados dos veces

Gen	Secuencia del cebador		Secuencia de restricción
CBSLip	5'-Alps.cbss	5'- <u>TCCTTGGACAAGAGAG</u> CCCGTTGGAGTGACC TCTACTG	Ninguno <i>Bam</i> HI
	3'-cbss.t	5'- <u>AGGATCCAATTCTCTCCATGGCCTATCTCCA</u> GGAGAA ACCTCCG	
Señal - α	5'-alpsynt	5'- <u>AGAATTCAAACGATGAGATTCCCATCCATC</u> TTTACCG	Eco RI Ninguna
	3'-cbss.alps	5'- <u>AGGTCACCTCCAACGGCTCTCTTGTTCCAAGG</u> AAACAC CTTCC	

Expresión de enzima lipolítica en *Hansenula polymorpha*

Para expresar el gen sintético de la enzima lipolítica de *F. heterosporum* (CBS 782.93) en *Hansenula*, la secuencia señal alfa combinada con el gen de enzima lipolítica se insertó detrás del activador FMD en el vector de expresión pB 14 de *Hansenula*, plásmido sin genes que proporciona resistencia a antibióticos. Después de la configuración de la estructura esperada del plásmido ensamblado en *E. coli*, el plásmido se transformó en las células competentes de *Hansenula polymorpha* por electroporación. Se seleccionaron los transformados en placas YND y se seleccionaron además las colonias para la integración múltiple del gen mediante 3 y 8 pasos de diluciones 1:200 en cultivos líquidos de YND. Por último, los cultivos seleccionados se estabilizaron transfiriendo dos veces en medio YPD. Para seleccionar además altos expresadores cada uno de los cultivos que presenta alto nivel de expresión se colocaron en placas para colonias individuales, en cada una de las cuales se analizó el nivel de expresión.

Para determinar el nivel de expresión del gen de la enzima lipolítica, los clones seleccionados se cultivaron en YPD al 1,8% de glicerol y 0,2% de glucosa durante 2 días a 24°C.

Actividad enzimática

Se analizó la actividad de la enzima lipolítica en muestras del medio de cultivo con lecitina o DGDG como sustratos y utilizando el kit NEFA (Roche) a escala reducida para volúmenes adecuados para microplacas de valoración para la determinación de los ácidos grasos libres liberados.

Resultados

Toma de la huella enzimática por MALDI-TOF y secuenciado de aminoácidos

Se ha determinado la secuencia completa de aminoácidos de la enzima lipolítica de *Fusarium heterosporum* (véase la SEC. ID. nº 1 - figura 37). La digestión con tripsina proporcionó péptidos muy específicos en los que pudo determinarse el P.M. (MALDI-TOF) de manera concluyente. Las secuencias de aminoácidos para todos los péptidos se determinaron también por degradación de Edman. La secuencia de aminoácidos determinada por la degradación de Edman comprende el 99,64% de la cadena de polipéptidos de la enzima lipolítica de *Fusarium heterosporum* (CBS 782.83). Las secuencias de aminoácidos de todos los péptidos se alinearon a la lipasa de la cepa japonesa *F. heterosporum* (Nagao *et al.*, 1994, *J. Biochem.*, 116:536-540) dando a conocer de este modo el orden de los péptidos que identifican la secuencia de aminoácidos de la proteína madura. La alineación se muestra en la figura 7. El resumen del MALDI-TOF y los estudios de degradación de Edman se muestran en la Tabla 9 con el orden de péptidos según la alineación con la secuencia de Nagao.

TABLA 9

Toma de la huella enzimática, determinación del P.M. de la secuencia de aminoácidos completa por degradación de Edman de los péptidos tripticos de la enzima lipolítica de *F. heterosporum* (CBS 782.83). Las secuencias peptídicas confirmadas por degradación de Edman están marcadas con signo +. El triptófano oxidado está marcado con *. Cobertura de la secuencia = 99,64%

Fosfolipasa (2254-97-3) de <i>Fusarium heterosporum</i>					Escisión parcial		
Nº	Desde	Secuencia	M+H calc	M+H obs	Peptidos	M+H calc	M+H obs
1	1-13	AVGVTSTDFTNFK	1387,5				
2+	14-33	FYIQHGAAAYCNSGTAAGAK	2059,2	2059	1+2	3427	3427
3+	34-59	ITCSNNGCPTIESNGVTVASFTG SK	2701,9				
4+	60-72	TGIGGYVSTDSSR	1300,4		3+4+5	4111	4112
5+	73-73	K	147,2				
6+	74-80	EIVVAIR	780,0	780,0	4+5+6	2209	2209
7	81-86	GSSNIR	632,7				
8+	87-128	NWLTLNLDQSDCSLVSGCGVH SG FQ NAAWAEISAQASAAVAK	4514,8		7+8	5129	5129
9	129-130	AR	246,3		8+9	4743	4743
10	131-131	K	147,2				
11	132-137	ANPSFK	663,8				
12+	138-158	VVATGHSLGGAVATLSAANLR	1966,3	1966	10+11+12	2739	2739
13+	159-173	AAGTPVDIYTYGAPR	1552,7	1552			
14+	174-192	VGNAALSAFISNQAGGEFR	1910,1	1910			
15	193-197	VTHDK	599,7				
16	198-202	DPVPR	583,7				
17+	203-211	LPPLIFGYR	1076,3	1076	15+16+17	2221	2221
18+	212-226	HTTPEYWLSGGGGDK	1605,7				
19+	227-235	VDYAISDVK	1010,1		18+19	2596	2596
20a	236-274	VCEGAANLMCNGGTLGLDIDAH LHYFQATDACNAGGFSW*	4231,5	4232			
20b +	236-275	VCEGAANLMCNGGTLGLDIDAH LHYFQATDACNAGGFSW*R	4387,7	4387			

Identidad con otras lipasas de *Fusarium*

Las alineaciones de la secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de la enzima lipolítica de *F. heterosporum* (CBS 782.83) con las secuencias de otras lipasas de *Fusarium* muestran las relaciones entre algunas de las lipasas de *Fusarium* (Tabla 10).

TABLA 10

*Identidad de aminoácidos y nucleótidos de la enzima lipolítica de *F. heterosporum* (CBS 782.83) comparada con otras lipasas de *Fusarium**

IDENTIDADES DE LIPASA	<i>F. heterosporum</i> (Nagao más arriba)	<i>F. oxysporum</i> (Lipopan F TM)
Secuencia de aminoácidos (SEC.ID. nº 1) de <i>F. heterosporum</i> (CBS 782.83)	58,7%	85,1%
Secuencia de nucleótidos (SEC.ID. nº 1) de <i>F. heterosporum</i> (CBS 782.83)	61,8%	69,2%

El mezclado y la ampliación por RCP de los oligonucleótidos sintéticos para el gen de la enzima lipolítica y las secuencias señal alfa produjo los fragmentos de ADN que se clonaron y secuenciaron. Los fragmentos que contenían las secuencias correctas se utilizaron para ensamblar el gen completo por reampliación utilizando los cebadores mostrados en la Tabla 8. La secuencia nucleotídica ensamblada se presenta en la figura 8 con su secuencia de aminoácidos traducida y los cebadores utilizados están indicados con flechas.

El fragmento de ADN que contiene el montaje del gen ensamblado se transfirió al vector de expresión pB 14 de *Hansenula* utilizando las secuencias de la enzima de restricción introducidas. El plásmido resultante pB14-alps.cbss se presenta esquemáticamente en la figura 9.

Expresión de la actividad de la enzima lipolítica fúngica en clones seleccionados

En los clones, que han sido seleccionados mediante el proceso de selección, se analizó la expresión de la enzima lipolítica. Las muestras de 10 microlitros del sobrenadante de cultivos de 2 días se incubaron con DGDG o lecitina durante 10 minutos y 10 microlitros de estas reacciones se analizaron con el kit NEFA. Los resultados después del aislamiento de una sola colonia de 3 de los clones se presenta en la figura 10.

Se ha determinado la secuencia de aminoácidos de una enzima lipolítica procedente de una cepa de *Fusarium heterosporum* (CBS 782.83), y se ha construido un gen sintético que codifica esta enzima lipolítica y optimizado para la expresión *Hansenula polymorpha*. El gen que codificó la enzima madura se fusionó a una secuencia señal sintética procedente del factor alfa de apareamiento de levadura. La combinación de la secuencia señal alfa con el activador FMD del vector pB14 de *Hansenula* se ha demostrado anteriormente que es adecuada para la expresión de las lipasas de *Fusarium*.

Ejemplo 3

*Expresión de una enzima lipolítica de *Fusarium heterosporum* CBS 782.83 en *Hansenula polymorpha* y caracterización del producto en pruebas de cocción*

La cepa B14:8-3,8 (DCDK0172) de *Hansenula polymorpha* que contiene un gen que codifica la enzima lipolítica procedente del hongo filamentoso *Fusarium heterosporum* CBS 782.83, se fermentó en el modo de alimentación discontinua. Después de 160 horas de fermentación la actividad de la fosfolipasa alcanzó 1200 U/ml. Basándose en las fermentaciones se prepararon tres productos y además se analizaron. Los productos se denominan de la manera siguiente: muestra 205, muestra 206 y muestra 209.

Una muestra 205 de enzima lipolítica del *F. heterosporum* expresada en *H. polymorpha* se probó en experimentos de cocción a miniescala. La masa procedente del experimento de cocción fue analizada por GLC y HPTLC.

Los resultados de la cocción procedentes de la cocción a miniescala confirman una mejora muy acusada de la muestra 205 de enzima lipolítica en el volumen del pan y una mejora de la estructura de la miga. El análisis de la enzima lipolítica confirmó una fuerte actividad hidrolítica de la muestra 205 de enzima lipolítica en el digalactosildiglicérido (DGDG) correspondiente con la acumulación de digalactosilmonoglicérido (DGMG).

La enzima tenía solo actividad menor en los triglicéridos en la masa.

Las muestras 206 y 209 se probaron en pruebas de cocción a escala piloto y confirmaron el buen funcionamiento de las enzimas lipolíticas en la cocción tanto con respecto al aumento del volumen del pan como a la estructura de la miga mejorada. A partir de las pruebas de cocción se indica que la muestra 206 funciona un poco mejor en comparación con la muestra 209 en un procedimiento convencional de la masa, sin embargo los dos productos no se han comparado directamente entre sí y más pruebas de cocción tienen que confirmarlo.

*Experimental**Fermentación*5 *Microorganismo*

Se utilizó en este estudio la cepa de *H. polymorpha* con el plásmido que contiene la enzima lipolítica procedente de CBS 782.83 de *F. heterosporum*, tal como se describe en el Ejemplo 2. El activador utilizado en el montaje fue el formato de activador de deshidrogenasa de *H. polymorpha*.

10 *Medio de crecimiento y condiciones del cultivo**Medio YNB-glicerol*

15 El medio utilizado para la preparación de inóculo para las fermentaciones en biorreactor y para el crecimiento en matraces de agitación contenía: 1,7 g/l de base nitrogenada de levadura (DIFCO, Detroit, EE.UU., 0335-15-9), 5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g/l de glicerol y ácido 2-[N-morfolino]etansulfónico (MES) 0,1 M como tampón. El pH se ajustó a 6,1 (pKa de MES) con NaOH 4 M (antes de esterilización en autoclave). La base nitrogenada de levadura y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se esterilizaron en filtro para el medio después de esterilización en autoclave. Este medio se utilizó para el cultivo en
20 matraces de agitación (250 ml de medio en un matraz de agitación con un volumen total de 500 ml).

Agar-agar YNB

El medio definido utilizado para la colocación en placas de los cultivos de solución madre (mantenidos a -80°C en
25 25% (p/v) de glicerol) contenía: 1,7 g/l de base nitrogenada de levadura (DIFCO, Detroit, EE.UU., 0335-15-9), 5 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 g/l de glicerol y 20 g/l de agar-agar (DIFCO, Detroit, EE.UU., 0140-01). La base nitrogenada de levadura y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ se esterilizaron en filtro para el medio después de esterilización en autoclave.

Medio YPD

30 El medio rico se utilizó para la comprobación de la contaminación en los fermentadores. El medio contenía: 10 g/l de extracto de levadura, 10 g/l de peptona y 20 g/l de glicerol.

Fermentaciones

35 Se realizaron tres fermentaciones en este estudio: HET0401, HET0402 y HET0410, todas con la cepa descrita anteriormente. Las variaciones entre las tres fermentaciones están en la composición del medio discontinuo y el medio de alimentación. Todos los demás parámetros eran idénticos para las tres fermentaciones.

40 El medio discontinuo (3 l) utilizado para la fermentación en el fermentador de 6 l contenía: 13,3 g/l de $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 3,0 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 3,3 g/l de KCl, 0,3 g/l de NaCl, 15 g/l de glicerol y 3 ml de ADD APT® Foamstop Sin 260 (ADD APT Chemicals AG, Hedmon, Holanda), 1,0 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 67 mg/l de $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 mg/l de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 20 mg/l de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 21 mg/l de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y 67 mg/l de EDTA, 0,65 mg/l $\text{Ni SO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,65 mg/l de CoCl_2 , 0,65 mg/l de H_3BO_4 , 0,65 mg/l de KI, 0,65 mg/l de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2 mg/l de D-biotina y 0,67 g/l
45 de hidrocloreuro de tiaminocloruro.

Además del medio discontinuo descrito anteriormente, el HET0402 de fermentación contenía 10 g/l de peptona en el medio discontinuo.

50 Además del medio discontinuo descrito anteriormente, HET0410 de fermentación contenía 10 g/l de Bacto triptona en el medio discontinuo.

Medio de alimentación HET0401 y HET0402:

55 El medio de alimentación contenía 635 g/kg de glicerol y 130 g/kg de ácido fórmico.

Medio de alimentación HET0410

El medio de alimentación contenía 570 g/kg de glicerol, 120 g/kg de ácido fórmico y 95 g/kg de Bacto triptona.

60 El pH se controló añadiendo 25% (p/v) de NH_3 -agua.

La fermentación se llevó a cabo en el modo alimentación discontinua en un fermentador de 6 l de construcción casera. Se utilizaron las siguientes condiciones de fermentación: pH 5, aireación 1 vvm, temperatura 26°C y agitación
65 desde 400 a 700 rpm.

El fermentador se inoculó con 2 x 250 ml de caldo de cultivo YNB-glicerol a 25°C y 180 rpm, y con una DO-600 de aproximadamente 10.

ES 2 351 426 T3

El caudal de alimentación en el fermentador se controló por la evolución del CO₂ acumulado y se basándose en las ecuaciones siguientes:

$$\text{Alimentación - caudal [g/h]} = 0, \text{AccCO}_2 \leq 0,45$$

$$\text{Alimentación - caudal [g/h]} = 1,33 \cdot V \cdot \text{AccCO}_2, 0,45 \leq \text{AccCO}_2 \leq 3,25$$

$$\text{Alimentación - caudal [g/h]} = 4,33 \cdot V, 3,25 \leq \text{AccCO}_2$$

V: Volumen del caldo de fermentación [l]

AccCO₂: Evolución del CO₂ acumulado [moles]

Recolección

Se recolectaron las fermentaciones por centrifugación durante 10 minutos a 16.000 x g seguido de filtración estéril del sobrenadante a través de filtros de 0,2 µm (VacuCap 90 Filter Unit w 0,8/0,2 µm Supor Membrane) de Gelman Laboratory. El producto se mantuvo a 4°C hasta su utilización en las pruebas de cocción.

Procedimientos analíticos

Determinación de la actividad de lipasa

Se centrifugó a 9.000 x g durante 10 minutos una muestra de fermentación (10 ml) y se utilizó el sobrenadante para el análisis de la actividad de la fosfolipasa según el “ensayo PLU” dado a conocer anteriormente en la presente memoria.

Crecimiento de biomasa

Se determinó la concentración de biomasa en un fluido de cultivo mediante centrifugación de 10 ml de fluido de cultivo a 9000 x g durante 10 minutos en un recipiente pesado previamente. Después de la centrifugación el sobrenadante se eliminó y se secó la biomasa durante 24 horas a 100°C y luego se pesó. Se calculó la concentración de biomasa como g de peso seco de las células por l de fluido de cultivo.

Caracterización de la enzima y minihorneado

Enzimas y harina

Muestra 205: Muestra 7 (161 horas de fermentación) procedente de HET0401.

Fosfolipasa Lipopan F, nº 2938

Harina : Reforma 2003055.

Minihorneado

Se añadieron los siguientes ingredientes a una vasija de mezclado Brabender de 50 g y se amasó durante 5 minutos a 30°C: 50 g de harina, 10 g de levadura seca, 0,8 g de azúcar, 0,8 g de sal, 70 ppm de ácido ascórbico y agua (para una consistencia de la masa de 400 unidades Brabender). El tiempo restante fue de 10 min a 34°C. Se pesaron 15 g de masa. A continuación se moldeó en un dispositivo especial en el que la masa se enrolló entre una placa de madera y un marco de plexiglás. Las masas se envasaron herméticamente en latas durante 45 min. a 34°C y se hornearon en un horno doméstico Voss durante 8 min. a 225°C.

Tras la cocción se enfriaron los panes a temperatura ambiente y después de 20 min. se pesaron los panes y se determinó el volumen por el método de desplazamiento de la semilla de colza.

Los panes se cortaron también y se evaluó la miga y la corteza.

Extracción de lípidos

Se congelaron inmediatamente y se liofilizaron 10 g de masa envasada completamente hermética. La masa liofilizada se molió en un molinillo de café y se pasó a través de una malla de 800 micras. Se pesaron 1,5 g de masa liofilizada en un tubo de centrifugadora de 15 ml con tapa roscada. Se añadieron 7,5 ml de butanol saturado de agua (WSB). El tubo de centrifugadora se colocó en un baño de agua hirviendo durante 10 min. Los tubos se colocaron en un Rotamix y se hicieron girar a 45 rpm durante 20 min. a temperatura ambiente. A continuación se colocan en un baño de agua hirviendo de nuevo durante 10 min. y se hicieron girar en un Rotamix durante 30 min. a temperatura ambiente. Los tubos se centrifugaron a 3500 g durante 5 min. Se transfirieron 5 ml de sobrenadante a un vial. Se evaporó el WSB a sequedad bajo vapor de nitrógeno.

ES 2 351 426 T3

Cromatografía de gases

La cromatografía de gases se llevó a cabo como se describe en los procedimientos analíticos en el Ejemplo 1 anteriormente.

HPTLC

Aplicador: Aplicador LINOMAT 5, de CAMAG.

Placa de HPTLC: 10 x 10 cm, Merck n° 1.05633.

La placa se seca antes de su utilización en una estufa a 180°C durante 20 a 30 minutos.

Aplicación: 1,0 µl de una solución al 1% en CHCl₃:MeOH 85:15 se aplica a la placa de HPTLC utilizando el aplicador LINOMAT 5.

Tampón corriente:

n° IV: Cloroformo : metanol : H₂O (65:25:4)

n° I: P-éter : éter metil-terc-butílico (MTEB) : ácido acético (60:40:1).

Tiempo de aplicación/elución: 11 minutos para el tampón I corriente y 18 minutos para el tampón IV corriente.

Se seca la placa en una estufa a 180°C durante 10 minutos, se enfría y se revela en acetato de cobre al 6% en PO₄H₃ al 16%. Se seca 10 minutos más a 180°C y se evalúa directamente.

Pruebas de horneado

Productos probados

n° 3016 – Lipopan F que contiene 8700 LIPU/g

ID	Cepa/hospedador	Fermentación
Muestra 206	que contiene 390 LIPU/g	<i>F. heterosporum</i> / <i>H. polimorpha</i> HET0401+ HET0402
Muestra 209	que contiene 950 LIPU/g	<i>F. heterosporum</i> / <i>H. polimorpha</i> HET0410

Receta

Panecillos de corteza dura elaborados con harina Reforma: 2003159

	Componentes, %	Cantidad, g
Harina-reforma 2003159	100	2.000
Agua	58,5	1.170
Levadura comprimida	6	120
Sal	1,6	32
Azúcar	1,6	32
Acido ascórbico	10 ppm	0,02
Alfa-amilasa corriente GRINDAMYL™ A 1000	90 ppm	0,180

Procedimiento de horneado

Sistema mezclador Diosna

- Mezcla en seco durante 1 min. Lentamente
- Mezcla lenta 2 min. + 4 min. Rápida

ES 2 351 426 T3

- Temperatura de la masa: 26°C
- Pesada: 1350 g
- 5 • En reposo: 10 min. a 30°C en cabina calefactora
- Moldeo: Fortuna 3/17/7
- Envasado hermético: 45 min. a 34°C, H.R. 85%
- 10 • Cocción en horno Bago: 13 min. a 220°C, 13 s. vapor + 5 min. tiro abierto
- Piso de piedra MIWE: prog. nº 1
- 15 • Después de cocer los panecillos se enfrían durante 25 min antes de la pesada y la medición del volumen.

Resultados y exposición

Fisiología de la fermentación y producción de fosfolipasa

La adición de triptona al lote y al medio de alimentación de HET0410 dio como resultado una producción más rápida de biomasa y un nivel final mayor de biomasa en comparación con HET0401-0402.

HET0401 y HET0402 con casi idénticas con respecto al desarrollo de actividad de actividad de fosfolipasa, mientras que la productividad de fosfolipasa es significativamente mayor en HET0410.

Recolección

Se recolectaron las fermentaciones después de 168 horas (HET0401-402) y 161 horas (HET0410) de fermentación. El producto se mantuvo a 4°C hasta la utilización en las pruebas de cocción. Alguno de los productos de HET0401 se denominó muestra 205, y contenía aproximadamente 700 PLU-7/ml. Alguno de los productos de entre HET0401 y HET0402 se mezcló y se denominó muestra 206. Este producto contenía aproximadamente 390 PLU-7/ml. La actividad enzimática menor de la muestra 206 en comparación con el producto final de HET0401 y HET0402 puede originarse por almacenamiento y filtración estéril. El producto de HET0410 se denominó muestra 209 y contenía aproximadamente 950 PLU-7/ml.

Caracterización enzimática y minicocción

La muestra 205 de enzima lipolítica procedente de la fermentación HET0401 se probó en un experimento de minicocción.

En dosis diferentes y en comparación con una referencia y Lipopan FTM el volumen específico del pan procedente de esta prueba de cocción se muestra en la Tabla 11. La fotografía del pan se muestra en la figura 11.

TABLA 11

Enzima lipolítica de Fusarium heterosporum (muestra 205) en experimentos de minicocción.
Efecto sobre el volumen del pan

Muestra	Dosis de PLU-7/kg de harina	Volumen de pan ml/g
205	0	3,56
205	200 U/kg	3,98
205	500 U/kg	4,87
205	1.000 U/kg	5,05
205	1.500 U/kg	5,13
205	2.000 U/kg	4,82
205	5.000 U/kg	5,05
205	10.000 U/kg	4,51
Lipopan F	40 ppm	4,57

Los resultados de la cocción confirmaron un efecto muy acusado de la muestra 205 sobre la mejora del volumen del pan, y el efecto del volumen fue mejor que el de Lipopan FTM, en una dosis normal de 40 ppm.

ES 2 351 426 T3

En la figura 11 se aprecia también que la muestra 205 contribuye a una mejora acusada de la estructura de la miga y del color.

La masa envasada completamente hermética procedente de este experimento de cocción se liofilizó y se extrajo con butanol saturado con agua y los lípidos aislados se analizaron por GLC y HPTLC.

El análisis de GLC de los lípidos de la masa (Tabla 12) confirma el efecto hidrolítico de la muestra 205 de enzima lipolítica sobre el digalactosildiglicérido (DGDG) correspondiente con una acumulación de digalactosilmonoglicérido (DGMG). La actividad de la enzima en DGMG es muy baja debido a la cantidad molar total de DGDG (% mmoles = mmoles/100 g de masa liofilizada) y DGMG (% de mmoles) continúa siendo constante a una dosis de enzima aumentada (figura 12). Los resultados de la GLC indican además una actividad muy baja de la muestra 205 en el triglicérido.

TABLA 12

Análisis de GLC de los lípidos de la masa. FFA: ácido graso libre. MGMG = monogalactosilmonoglicérido. DGMG = digalactosilmonoglicérido. MGDG = monogalactosildiglicérido. DGDG = digalactosildiglicérido. TRI = triglicérido

Muestra (S-)	%	%	%	%	%	%	mmol%	mmol %	mmol%
	FFA	MGMG	DGMG	MGDG	DGDG	TRI	DGMG	DGDG	DGMG+ DGDG
0 U S-205	0,232	0,002	0,023	0,013	0,214	0,641	0,034	0,228	0,262
200 U S-205	0,321	0,007	0,050	0,038	0,193	0,660	0,074	0,205	0,279
500 U S-205	0,384	0,012	0,069	0,021	0,132	0,610	0,101	0,140	0,241
1000 U S-205	0,418	0,014	0,117	0,008	0,087	0,614	0,173	0,093	0,265
1500 U S-205	0,444	0,016	0,140	0,011	0,057	0,600	0,206	0,060	0,267
2000 U S-205	0,438	0,026	0,148	0,011	0,039	0,594	0,218	0,041	0,259
5000 U S-205	0,456	0,022	0,171	0,011	0,012	0,533	0,252	0,013	0,264
10000 U S-205	0,453	0,017	0,163	0,013	0,009	0,547	0,241	0,010	0,251
40 ppm Lipopan F	0,372	0,017	0,077	0,027	0,134	0,577	0,114	0,142	0,256
% mmol = mmol/100 g de masa liofilizada									

Comparando los resultados de la cocción y en análisis de lípidos es interesante observar que el mayor efecto de cocción no se obtiene por una hidrólisis completa de DGDG a DGMG, sino que los resultados indican que una hidrólisis parcial de DGDG a DGMG puede dar el mejor rendimiento de la cocción.

La alta dosis de enzima produce más DGMG pero también más ácido graso libre se produce que cabe esperar que de un efecto de cocción negativo, que puede ser otra explicación de porqué sólo una hidrólisis parcial de DGDG es preferible. La Tabla 13 presenta la relación de DGDG y la hidrólisis de triglicéridos, calculada a partir de la Tabla 12. Los resultados ilustran que, el mejor rendimiento de la cocción se obtiene cuando a una dosis en la que la relación de DGDG a actividad de triglicéridos es mayor.

TABLA 13

Relación de DGDG y de hidrólisis de triglicéridos a partir de análisis de GLC de los lípidos de la masa

Muestra (S)	dTRI	dDGDG	dDGDG/dTRI	Volumen de pan mL/g
0 U S-205				3,56
200 U S-205	0	0,023		3,98
500 U S-205	0,031	0,088	2,84	4,87
1000 U S-205	0,027	0,135	0,030	5,05
1500 U S-205	0,041	0,168	4,1	5,13
2000 U S-205	0,047	0,187	3,98	4,82

ES 2 351 426 T3

TABLA 13 (continuación)

Muestra (S)	dTRI	dDGDG	dDGDG/dTRI	Volumen de pan mL/g
5000 U S-205	0,108	0,215	1,99	5,05
10000 U S-205	0,094	0,218	2,3	4,51
40 ppm Lipopan F	0,064	0,086	1,34	4,57

Algunas de las muestras de lípidos se analizaron también por HPTLC como se muestra en la figura 13. Las muestras 4, 5 y 6 son lípidos de la masa del experimento de cocción. El análisis de HPTLC confirma la hidrólisis de DGDG y la formación de DGMG por la muestra 205 de enzima lipolítica.

La relación de actividad relativa de líquido polar:triglicérido de Lipopan F y la muestra 209 que utiliza los ensayos dados a conocer en la presente memoria anteriormente son:

Fosfolípido/triglicérido (PLU/LIPU) Lipopan F = 3
Muestra 209 = 9.

Galactolípido/triglicérido (GLU/LIPU) Lipopan F = 1
Muestra 209 = 4.

La enzima lipolítica de la CBS 782.83 de *Fusarium heterosporum* proporcionó efectos muy acusados en los experimentos de cocción a miniescala con aumento acusado del volumen del pan y mejora de la estructura de la miga. El análisis de lípidos confirma actividad hidrolítica acusada en DGDG en la masa correspondiente con la acumulación de DGMG. La enzima lipolítica de CBS 782.83 de *Fusarium heterosporum* mostraba baja actividad sobre los triglicéridos en una masa.

Ejemplo 4

Caracterización de la actividad sobre el sustrato de lípidos y especificidad de posición de una enzima lipolítica de CBS 782.83 de Fusarium heterosporum expresada en Hansenula polymorpha

Una enzima lipolítica según la presente invención de *Fusarium heterosporum* se expresó en *Hansenula polymorpha* tal como se describe en el Ejemplo 3.

Procedimientos analíticos

La actividad de fosfolipasa se determinó utilizando el análisis de PLU descrito anteriormente en la presente memoria.

La actividad de galactolipasa se determinó utilizando el análisis de galactolipasa descrito anteriormente en la presente memoria.

La actividad en triglicérido (tributirina) se determinó utilizando el análisis de LIPU descrito anteriormente en la presente memoria.

Actividad sobre el aceite de girasol (LUSol, pH-stat pH 6)

Reactivos

Se disuelven 8,4 g de goma arábica en 100 ml de agua desionizada y se añaden 100 ml de CaCl₂ 30 mM. se añaden lentamente 36 g de aceite de girasol durante el mezclado con un mezclador Turrax (20.000 rpm).

Ensayo

Se equilibran 20 ml de emulsión de aceite de girasol en un vaso de precipitados a 30°C durante 5 min. Se ajusta el pH entre 6,3 y 6,5 utilizando un pH-metro. Se añaden 2 ml de la solución enzimática y se añade continuamente NaOH 0,05 N manteniendo el pH a 6,5 durante 10 minutos. Se calcula la pendiente de la curva para la adición de NaOH 0,05 N en función del tiempo.

Se define 1 LUSol como la cantidad de enzima que puede liberar 1 μ mol de ácido graso por min. en las condiciones del ensayo.

Se analizó la actividad de la enzima lipolítica en diferentes sustratos según los procedimientos mencionados anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

TABLA 14

Actividad de una enzima lipolítica de *Fusarium heterosporum* según la presente invención en diferentes sustratos de lípidos

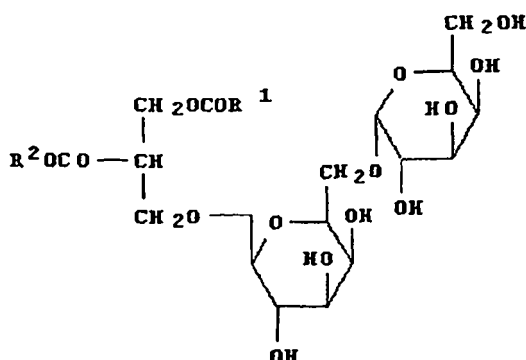
Actividad	Sustrato	pH	Temperatura	Unidad/ml
LIPU	Tributirina	5.5	30	754
LUSol	Aceite de girasol	6.5	30	48
PLU-7	Fosfatidilcolina	7	37	4650
GLU	Digalactosildiglicérido	7	37	1600

La enzima lipolítica de *Fusarium heterosporum* expresada en *Hansenula polymorpha* hidroliza principalmente los ácidos grasos en la posición sn-1 del galactolípido y fosfolípidos en la masa. La especificidad de la enzima se investigó añadiendo diferentes concentraciones de la enzima a una masa de pan. La masa envasada herméticamente se congeló y se liofilizó, y los lípidos de la masa se extrajeron con butanol saturado de agua.

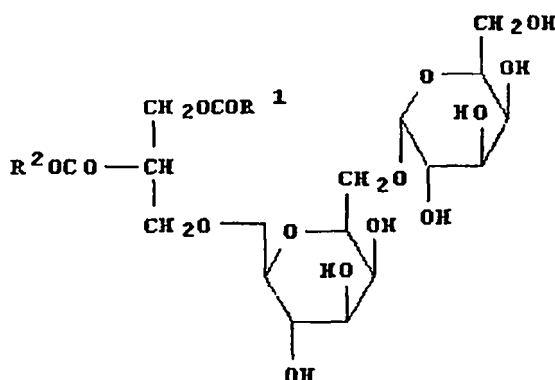
Se analizaron los lípidos de la masa por análisis de GLC y HPLC.

Por análisis de GLC fue posible analizar el digalactosildiglicérido (DGDG) y el digalactosilmonoglicérido (DGMG). Además fue posible analizar los isómeros de posición del digalactosilmonoglicérido (1: digalactosil 1-monoglicérido y 2: digalactosil 2-monoglicérido, véanse las estructuras a continuación). Estos componentes se separaron y cuantificaron por GLC.

1: R1 = H y R2 = Acilo graso



2: R1 = Acilo graso y R2 = H



En una prueba de cocción para la producción de panecillos con corteza dura se añadieron diferentes dosis de la enzima lipolítica y se analizaron los galactolípidos en la masa envasada herméticamente. La cantidad del isómero de digalactosilmonoglicéridos se muestra en la Tabla 15 y se ilustran gráficamente en la figura 14.

TABLA 15

Cantidad de isómero de digalactosilmonoglicéridos en una prueba de cocción utilizando enzima lipolítica procedente de Fusarium heterosporum

	Dosis de enzima TIPU/kg de harina	% de digalactosil 2-monoglicérido referido al peso en seco de la masa	% de digalactosil 1-monoglicérido referido al peso en seco de la masa
5			
10	0	0,0102	0,0399
	200	0,0092	0,0167
	400	0,0071	0,0100
	400	0,0067	0,0057
15	800	0,0103	0,0063
	1.000	0,0071	0,0060
	1.200	0,0081	0,0053
	1.500	0,0064	0,0057
20	2.000	0,0084	0,0047

Conclusión

A partir de los resultados en la Tabla 15 y figura 14 se concluye que el digalactosildiglicérido está hidrolizado principalmente en la posición 1 durante la producción de digalactosil 2-monoglicérido. Se observa también un aumento menor en la cantidad de digalactosil 1-monoglicérido. Es bien sabido que se producirá la migración de acilo desde la posición 2 a la 1 del ácido graso acilo en los lípidos. Esta migración de acilo depende de la temperatura y en función del tiempo se producirá un equilibrio entre digalactosil 2-monoglicérido y digalactosil 1-monoglicérido. Este fenómeno explica el hecho de que se observe también un aumento en el digalactosil 1-monoglicérido.

Ejemplo 5

Determinación de la temperatura óptima y de la estabilidad de la enzima lipolítica procedente de Fusarium heterosporum

Se determinó la actividad enzimática de la enzima lipolítica liofilizada procedente de *F. heterosporum* y expresada en *Hansenula polymorpha* a varias temperaturas conforme a PLU-7 con las modificaciones descritas a continuación. El sustrato era una emulsión de fosfatidilcolina al 0,6%, Triton X-100 al 0,4%, CaCl₂ 6 mM y HEPES 50 mM, pH 7,0. El fermento de la enzima lipolítica liofilizado se diluyó con agua desmineralizada hasta 3 TIPU/ml. Se termostataron 400 µl de sustrato durante 5 minutos a 10, 20, 30, 40, 45, 50, 55 y 60°C y se añadieron 50 µl de muestra. Después de exactamente 10 minutos, se interrumpió la enzimación por incubación a 99°C durante otros 10 minutos. Por último, se determinó la cantidad de ácidos grasos por el método NEFA C (Wako Chemicals, GmbH, Neuss, Alemania). Los reactivos colorantes A y B se prepararon según el protocolo del fabricante. Se pipetearon a una placa de microvaloración 10 µl de lípido extractado redispersado y 100 µl de reactivo A y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se añadieron 200 µl de reactivo B a la placa de microvaloración y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se midió la densidad óptica a 540 nm. Se determinó la cantidad de ácido graso libre, utilizando la absorbancia leída y una curva patrón basada en el ácido oleico. Los resultados se muestran en la figura 15.

La estabilidad enzimática del fermento enzima lipolítica liofilizada se determinó a varias temperaturas. El fermento enzima lipolítica liofilizada se diluyó con tampón de fosfato 50 mM, pH 7,0 a 3 TIPU/ml. Tras 30 minutos de incubación a 20, 30, 37, 40 y 45°C se almacenó la muestra en hielo. Posteriormente, se determinó la actividad de fosfolipasa de acuerdo con PLU-7 con las modificaciones descritas a continuación. Este sustrato era una emulsión de fosfatidilcolina al 0,6%, Triton X-100 al 0,4% y tampón fosfato 50 mM. Se prescindió de CaCl₂ para evitar la precipitación del fosfato de calcio y no afecta a la actividad de la enzima. Se termostataron 400 µl de sustrato durante 5 minutos a 37°C y se añadieron 50 µl de muestra. Después de exactamente 10 minutos, se interrumpió la enzimación por incubación a 99°C durante otros 10 minutos. Por último, se determinó la cantidad de ácidos grasos por el método NEFA C (Wako Chemicals, GmbH, Neuss, Alemania). Los reactivos colorantes A y B se prepararon según el protocolo del fabricante. Se pipetearon a una placa de microvaloración 10 µl de lípido extractado redispersado y 100 µl de reactivo A y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se añadieron 200 µl de reactivo B a la placa de microvaloración y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se midió la densidad óptica a 540 nm. Se determinó la cantidad de ácido graso libre, utilizando la absorbancia leída y una curva patrón basada en el ácido oleico. Los resultados se muestran en la figura 16.

Ejemplo 6

Determinación del pH óptimo y de la estabilidad de la enzima lipolítica procedente de Fusarium heterosporum

Se determinó la actividad enzimática de la enzima lipolítica liofilizada procedente de *F. heterosporum* y expresada en *H. polymorpha* a varias pH. El sustrato era una emulsión de fosfatidilcolina al 0,6%, Triton X-100 al 0,4% y tampón

ES 2 351 426 T3

de fosfato 50 mM a pH 4,0, 5,0, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 y 10,0. Se suprimió el CaCl_2 para evitar la precipitación del fosfato cálcico y no afecta la actividad enzimática. El fermento de la enzima lipolítica liofilizado se diluyó con agua desmineralizada hasta 3 TIPU/ml. Se termostataron 400 μl de sustrato durante 5 minutos a 37°C y se añadieron 50 μl de muestra. Después de exactamente 10 minutos, se interrumpió la enzimación por incubación a 99°C durante otros 10 minutos. Por último, se determinó la cantidad de ácidos grasos por el método NEFA C (Wako Chemicals, GmbH, Neuss, Alemania). Los reactivos colorantes A y B se prepararon según el protocolo del fabricante. Se pipetearon a una placa de microvaloración 10 μl de lípido extractado redispersado y 100 μl de reactivo A y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se añadieron 200 μl de reactivo B a la placa de microvaloración y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se midió la densidad óptica a 540 nm. Se determinó la cantidad de ácido graso libre, utilizando la absorbancia leída y una curva patrón basada en el ácido oleico. Los resultados se muestran en la figura 17.

La estabilidad enzimática del fermento enzima lipolítica liofilizada se determinó a varios pH. El fermento enzima lipolítica liofilizada se diluyó con tampón de fosfato 50 mM a pH 4,0, 5,0, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 y 10,0 a 3 TIPU/ml. Tras 30 minutos de incubación a 37°C se almacenó la muestra en hielo. Posteriormente, se determinó la actividad de fosfolipasa de acuerdo con PLU-7 con las modificaciones descritas a continuación. Este sustrato era una emulsión de fosfatidilcolina al 0,6%, Triton X-100 al 0,4% y tampón fosfato 50 mM, pH 7. Se prescindió de CaCl_2 para evitar la precipitación del fosfato de calcio y no afecta a la actividad de la enzima. Se termostataron 400 μl de sustrato durante 5 minutos a 37°C y se añadieron 50 μl de muestra. Después de exactamente 10 minutos, se interrumpió la enzimación por incubación a 99°C durante otros 10 minutos. Por último, se determinó la cantidad de ácidos grasos por el método NEFA C (Wako Chemicals, GmbH, Neuss, Alemania). Los reactivos colorantes A y B se prepararon según el protocolo del fabricante. Se pipetearon a una placa de microvaloración 10 μl de lípido extractado redispersado y 100 μl de reactivo A y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se añadieron 200 μl de reactivo B a la placa de microvaloración y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Se midió la densidad óptica a 540 nm. Se determinó la cantidad de ácido graso libre, utilizando la absorbancia leída y una curva patrón basada en el ácido oleico. Los resultados se muestran en la figura 18.

Ejemplo 7

Determinación del peso molecular de la enzima lipolítica purificada procedente de *Fusarium heterosporum*

La enzima lipolítica purificada según la presente invención procedente de *Fusarium heterosporum* se hizo funcionar con un gel SDS-PAGE, figuras 19a y 19b. Basándose en un marcador patrón Novex, se calculó el peso molecular como se muestra en la Tabla 15.

TABLA 15

Determinación del peso molecular de la enzima lipolítica según la presente invención

Muestra	R_f	M_w (kDa)	$\log M_w$	Cálculos
	0,91	3,0	0,48	$\log M_w \text{ (kDa)} = -5,30 \cdot R_f^3 + 7,50 \cdot R_f^2 - 5,00 \cdot R_f + 2,7986$ $r^2 = 0,9989$
	0,82	6,0	0,78	
	0,71	14	1,15	
	0,66	17	1,23	
Patrón Novex	0,55	28	1,45	
	0,47	38	1,58	
	0,38	49	1,69	
	0,31	62	1,79	
	0,23	98	1,99	
	0,13	188	2,27	
Enzima lipolítica según la presente invención	0,52			$\log M_w = -5,30 \cdot 0,52^3 + 7,50 \cdot 0,52^2 - 5,00 \cdot 0,52 + 2,80$ $\Rightarrow M_w = 29,9 \text{ kDa}$

Se calculó el peso de la enzima lipolítica para 29,9 kDa.

Ejemplo 8

Determinación del punto isoeléctrico (pI) de la enzima lipolítica procedente de *Fusarium heterosporum*

El punto isoeléctrico (pI) de la enzima lipolítica procedente de *F. heterosporum* se determinó teóricamente basándose en la secuencia SEC. ID. n° 6 de aminoácidos.

ES 2 351 426 T3

El cálculo se realizó utilizando el programa informático Vector NTI Suite 9 de Informax (Invitrogen, Ca, EE.UU.) y dio como resultado un pI de 6,40.

Ejemplo 9

Caracterización de la conversión enzimática de lecitina a lisolecitina en la yema de huevo a diferentes temperaturas por una enzima lipolítica de CBS 782.83 de Fusarium heterosporum

Las enzimas lipolíticas pueden convertir la lecitina (fosfatidilcolina) en lisolecitina (lisofosfatidilcolina) con liberación de un ácido graso libre. La conversión enzimática de lecitina en lisolecitina en la yema de huevo crea mejores propiedades de emulsificación que la lisolecitina que es un emulsionante mejor que la lecitina. Las buenas propiedades de emulsificación de las yemas de huevo son de importancia al preparar mayonesa estable caliente y otros alimentos y aplicaciones alimenticias, tales como, de manera no limitativa a, pasteles y maduración del queso.

Preparación de enzimas

Una enzima lipolítica procedente de *Fusarium heterosporum*, CBS 782.83, expresada en *Hansenula polymorpha* procedente de la fermentación de HET0420 se liofilizó en almidón de trigo. La preparación de la enzima resultante presentó una actividad de fosfolipasa de 1265 U/g, determinada por el ensayo TIPU descrito anteriormente en la presente memoria. Se preparó una solución madre enzimática al 10% (p/v) o al 20% (p/v) disolviendo la enzima liofilizada en polvo en agua desmineralizada. Después de 15 minutos de agitación, se centrifugó la solución durante 5 minutos a 1370 x g. Se utilizó el sobrenadante como solución madre de la enzima.

Enzimación

Se realizaron dos experimentos diferentes para determinar la combinación óptima de dosis enzimática, temperatura de reacción y tiempo para la conversión enzimática de lecitina en lisolecitina en yema de huevo. En el primero, la enzimación se llevó a cabo con una enzima lipolítica según la presente invención a las tres temperaturas siguientes: 30°C, 40°C y 50°C, cada una con las cuatro dosis siguientes: 5 U/g de yema de huevo, 10 U/g de yema de huevo, 20 U/g de yema de huevo y 30 U/g de yema de huevo.

En el segundo experimento la enzimación se realizó para una enzima lipolítica según la presente invención y con Lecitasa® Ultra de Novozymes A/S (Dinamarca), respectivamente a las cinco temperaturas siguientes: 5°C, 10°C, 15°C, 20°C y 53°C con una dosis de la enzima de 30 U/g de yema de huevo. Se probó también a 53°C la dosis de 60 U/g de enzima de yema de huevo.

En ambos experimentos, se transfirieron 10,0 g de yema de huevo pasteurizada de DanÆg (Christianfeld, Dinamarca) a un tubo Wheaton y se colocaron en un bloque calefactor termostatzado a la temperatura apropiada. Las muestras se mezclaron continuamente en un agitador magnético. En el tiempo t = 0 la solución madre enzimática se añadió a la yema de huevo conforme a la Tabla 16. Cada experimento se realizó por duplicado. Se extrajo de la soluciones de yema de huevo/enzima 1,0 g de las muestras según la Tabla 17. Tras los tiempos de incubación según la Tabla 17, la reacción enzimática en las muestra se interrumpió por adición de 7,5 ml de disolvente orgánico (CHCl₃:MeOH, 2:1).

TABLA 16

Se añadió solución madre de la enzima a yema de huevo para obtener diferentes dosis enzimáticas, incluyendo una referencia. Se añadió agua desmineralizada a un total de 2,35 ml para despreciar cualquier diferencia de volumen en la adición de diferentes volúmenes de solución madre enzimática

Muestra	Cantidad de yema de huevo	Actividad enzimática	Actividad enzimática de la solución madre	Volumen añadido de solución madre enzimática	Volumen añadido de H ₂ O desm.
Referencia	10,0 g	0 U	-	0 ml	2,35 ml
	10,0 g	50 U	127 U/ml	0,40 ml	1,95 ml
Enzima	10,0 g	100 U	127 U/ml	0,80 ml	1,55 ml
lipolítica	10,0 g	200 U	127 U/ml	1,60 ml	0,75 ml
	10,0 g	300 U	127 U/ml	2,35 ml	0 ml
	10,0 g	600 U	253 U/ml	2,35 ml	0 ml
Lecitasa®	10,0 g	300 U	3620 U/ml	83 ml	2,25 ml
Ultra	10,0 g	300 U	3620 U/ml	165 ml	2,20 ml

TABLA 17

Tiempos de reacción en la extracción de la muestra en los diferentes experimentos

5	Temperatura de reacción	Dosis enzimática		Tiempo de reacción (min.)					
10	5°C, 10°C, 15°C, 20°C	30U/g	60	120	240	360	480	1440	
	30°C	5, 10, 20 y 30 U/g	30						
				0	120	240	360		-
	40°C	5, 10, 20 y 30 U/g	30	0	120	240	360		-
15				0	120	240	360		-
	50°C	5, 10, 20 y 30 U/g	30	0	120	240	360		-
				0	120	240	360		-
	53°C	30U/g	15	0	60	90	120	240	-
20				0	60	90	120	240	-
	53°C	60U/g	15	0	60	90	120	240	-
				0	60	90	120	240	-
				0	60	90	120	240	330

Extracción de lípidos

25 La adición de 7,5 ml de disolvente orgánico (CHCl₃:MeOH, 2:1) a la muestra no sólo interrumpió la reacción enzimática sino que también extrajo los lípidos. Además, se añadieron 0,2 ml de H₂O desmineralizada a la muestra antes de que se dispersara utilizando un mezclador Whirley durante 1 minuto. Se centrifugó a continuación la muestra durante 10 minutos a 110 x g. Se transfirieron a otro tubo aproximadamente 3 ml de la fase orgánica y este lípido extraído se utilizó para varios análisis. Se almacenaron las muestras a -18°C.

Determinación de ácidos grasos libres

30 Se evaporaron bajo nitrógeno a 50°C 100 µl de la solución de lípidos extraída. Se añadió 1,0 ml de H₂O desmineralizada y el lípido se dispersó utilizando un mezclador Whirley. La cantidad de ácido graso libre se determinó utilizando el kit NEFA C de WAKO Chemicals GmbH, Neuss, Alemania. Los reactivos colorantes A y B se prepararon según el protocolo del fabricante. Se pipetearon a una placa de microvaloración 10 µl de lípido extraído y redispersado y 100 µl de solución A. La placa se incubó a 37°C durante 15 minutos. Se añadieron 200 µl de solución B a la placa de microvaloración y se incubó la placa a 37°C durante 10 minutos. Se midió la densidad óptica a 540 nm. Se determinó la cantidad de ácido graso, utilizando la absorbancia leída y una curva patrón basada en el ácido oleico.

*Determinación de lecitina y lisolecitina por LC/MS-MS**Materiales*

45 Acetona, metanol, cloroformo eran todos de Lab. Scan, Dublín, Irlanda, el etanol al 96% era De Danske Spritfabrikker y el ácido fórmico era de AppliChem, Darmstadt, Alemania.

Instrumentales

50 El sistema de HPLC esta constituido por una bomba cuaternaria (G1311A), una bomba capilar (G1376A), un tomamuestras automático (G1377A) y un compartimento de la columna (G1316A) todos de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania). Un divisor de flujo Acurate™ (ACM-CU-CR) de LC Packings (Amsterdam, Holanda) se utilizó para dividir el efluente de la columna al espectrómetro de masas y para introducir el aporte de disolvente polar. El espectrómetro de masas era un LCQ Deca Ion Trap de Thermo Finnigan (San José, CA, EE.UU.).

55 La columna era una Hypersil SI, 100 x 4,6 mm d.i., 5 µm de Thermo Hypersil-Keystone.

Condiciones cromatográficas y MS

60 Fases móviles

A: no utilizado

B: cloroformo

65 C: metanol/ácido fórmico (1000/0,190)

D: cloroformo/metanol/agua/ácido fórmico (300/550/150/0,190).

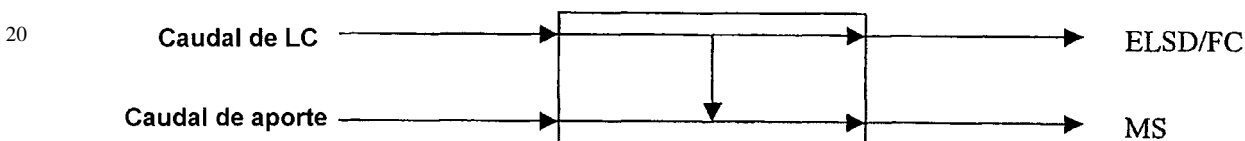
ES 2 351 426 T3

Aporte: etanol al 96%

	Flujo [ml/min]	Tiempo [min]	B [%]	C [%]	D [%]
5	0,6	0	40	60	0
	0,6	2	0	0	100
	0,6	8	0	0	100
10	0,6	9	40	60	0
	0,6	16	40	60	0

15 El volumen de inyección era de 5 μ l y la temperatura de la columna era de 45°C

Separador de flujo



25	Caudal de LC	0,60 ml/min
	Caudal de aporte:	100 μ l/min
30	Tubería de ELSD/FC	100 cm x 0,100 mm d.i. (SS)
	Tubería de MS	100 cm x 150 μ m (FS-150-MS)

35 El reparto aproximado es 20:1

Condiciones de MS

Ajustes de parámetros de MS:

40	Parámetro	Valor
	Temp. del capilar [°C]	325
	Caudal de gas de la funda	70
45	Caudal de gas auxiliar	4
	Fuente	ESI
	Polaridad	Positivo
	Voltaje de la fuente [kV]	6,0
50	Micro Scans SIM	5
	Tiempo de SIM Max Ion [ms]	200

55 Ajuste del detector de MS:

60	Parámetro	Valor
	Duración [min]	15
	Método de ajuste	LPC_544_SIM_00.LCQTun e
	Episodio 1 de exploración – Intervalos SIM	Intervalos de masa
	LPC (16:0) - H+	494,0 - 498,0
	LPC (18:2) - H+	517,0 - 527,0; 541,0 - 549,0
65	PC (34:2) - H+	778,0 - 786,0
	PC (36:4) - H+	801,0 - 813,0

Preparación de patrón y de muestra

La lisofosfatidilcolina (LPC) (de huevo de pollo) (89865) y la fosfatidilcolina (PC) (vegetal) (441601) eran de Avanti Polar Lipids Inc. Alabaster, AL, EE.UU. Se preparó una solución madre de PC y LPC (10 mg/20 ml de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$). Se prepararon sus diluciones para comprender las concentraciones desde 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se redisolvieron 7,5 μl de extracto de lípido procedente de 1g de yema de huevo en 1,5 ml de $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (1:1).

Análisis por TLC

El análisis por TLC se realizó tal como se describe en el Ejemplo 1.

Para la observación de los diferentes glicéridos, se aplicaron 2 μl de extracto de lípido en bandas de 3 mm a una placa de sílice 60 de HPTLC (Merck) con un tomamuestras 4 automático (CAMAG) para TLC. Se colocó la placa de sílice en una cámara de revelado horizontal (CAMAG) con tampón corriente (P-éter:éter metil-terc-butílico:ácido acético (50:50:1)). Se utilizaron 20 ml de tampón corriente para la fase gas y 5 ml para el total y se eluyó la placa hasta aproximadamente 5 cm de la posición de aplicación. Se secó la placa en una cabina calefactora (160°C) durante 5 minutos. Por último, la placa de TLC se sumergió en el reactivo de revelado ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ al 6% en H_3PO_4 acuoso al 16% y se carbonizó en una cabina calefactora (160°C) durante 10 minutos.

Resultados

Para determinar la combinación óptima de la dosis de enzima, se determinaron la temperatura de reacción y el tiempo para la conversión enzimática de lecitina en lisolecitina en la yema de huevo a cuatro dosis de enzima diferentes a tres temperaturas diferentes y cinco tiempos de reacción diferentes.

Las cuatro dosis de enzima utilizadas, 5 U/g, 10 U/g, 20 U/g y 30 U/g, así como los tiempos de reacción utilizados, 30 minutos, 60 minutos, 120 minutos, 240 minutos y 360 minutos, estaban basados en las pruebas iniciales no incluidas en la presente memoria. Las tres temperaturas, 30°C, 40°C y 50°C, se seleccionaron basándose en la curva óptima de temperatura para la enzima lipolítica, véase la figura 20.

La cantidad de lecitina y lisolecitina en la yema de huevo modificada por la enzima se analizó por HPLC y se representa en la figura 21 y la figura 22 en función del tiempo de reacción. En la figura 23, la cantidad de ácido graso libre en la yema de huevo modificada por la enzima se representa en función del tiempo de reacción.

El experimento demuestra que la conversión de lecitina en lisolecitina por una enzima lipolítica según la presente invención era óptima utilizando 20 U/g de yema de huevo de la enzima lipolítica a 30°C durante 120 minutos. La dosis de 20 U/g de yema de huevo se selecciona debido a una disminución observada en las concentraciones de LPC a 30 U/g de yema de huevo desde 120 minutos de reacción hasta 240 minutos de reacción.

Basándose en este resultado, se examinó si la enzima lipolítica según la presente invención y la Lecitasa® Ultra tienen efecto sobre los lípidos de la yema de huevo a temperaturas inferiores a 30°C y para comparar sus actividades a 53°C, que es la temperatura actualmente utilizada industrialmente para Lecitasa® Ultra.

La conversión enzimática de lecitina a lisolecitina en la yema de huevo se probó a cinco temperaturas diferentes (5°C, 10°C, 15°C, 20°C y 53°C) y a seis tiempos de reacción diferentes. Se probó una dosis de enzima de 30 U/g de yema de huevo porque ésta sería la dosis mayor de interés comercial debido al coste de la enzima y porque las velocidades de reacción, era de esperar que fueran bajas a las temperaturas probadas. Todas las unidades de la enzima mencionadas se han determinado por TIPU. 30 u/g de yema de huevo es también la dosis recomendada de Lecitasa® Ultra. Además, se probó una dosis de 60 U/g de yema de huevo a 53°C. Los tiempos de reacción utilizados eran de 60 minutos, 120 minutos, 240 minutos, 360 minutos, 480 minutos y 1440 minutos. Sin embargo, a 53°C los tiempos de reacción fueron de 15 minutos, 30 minutos, 60 minutos, 90 minutos, 120 minutos y 240 minutos. A 53°C utilizando 60 U/g se extrajo además una muestra a 330 minutos de reacción.

En las figuras 24 y 25, la cantidad de lisolecitina, ácido graso libre y lecitina en la yema de huevo modificada por la enzima se representa en función del tiempo de reacción utilizando la enzima lipolítica según la presente invención y Lecitasa® Ultra fosfolipasas, respectivamente. Los contenidos en lecitina y lisolecitina de las muestras se determinaron por LC-MS y el contenido en ácido graso libre se determinó por el método NEFA C. La cantidad de FFA en las muestras de referencia (resultados no representados) y la suma de lisolecitina y lecitina, permaneció constante durante los experimentos representados en las figuras 24 y 25.

La figura 24 muestra los resultados de la enzimación de yema de huevo con la enzima lipolítica según la presente invención. A 53°C la actividad de la enzima lipolítica cesó después de 30 minutos de reacción, alcanzando una concentración de LPC de 1,7% (p/p) con 30 U/g de yema de huevo (figura 24b). Las concentraciones de FFA fueron de 1,0% (p/p) y 1,3% (p/p) con 30 U/g de yema de huevo y 60 U/g de yema de huevo, respectivamente. Utilizando Lecitasa® Ultra las cantidades de LPC y FFA aumentaron durante el período de 15 a 240 minutos (figura 19), dando 2,7% de LPC (p/p) después de 240 minutos de reacción con 30 U/g de yema de huevo. Las concentraciones de FFA fueron del 1,4% (p/p) y 2,1% (p/p) después de 240 minutos de reacción utilizando 30 y 60 U/g de yema de huevo respectivamente. La actividad de Lecitasa® Ultra cesó después de 330 minutos de reacción utilizando 60 U/g de yema de huevo. La enzima lipolítica de la presente invención tenía una velocidad de reacción inicial mayor que Lecitasa® Ultra.

A 20°C y 53°C las velocidades de reacción iniciales fueron similares con la enzima lipolítica de la presente invención (figura 24). A temperaturas entre 5 y 20°C, la cantidad de LPC y de FFA aumentó durante el experimento. Aunque a temperaturas inferiores a 20°C la velocidad inicial disminuyó notablemente con temperaturas decrecientes. A 20°C una concentración del LPC del 3,3% (p/p) y una concentración de FFA 1,6% (p/p) se hizo reaccionar después de 60 minutos de reacción, con 30 U/g de yema de huevo. Esta concentración fue similar a 240 minutos de reacción a 53°C con Lecitasa® Ultra. No fue posible volver a poner en suspensión el extracto de lípido sin disolvente para el análisis de FFA después de 1440 minutos de reacción a 20°C. Después de 1.440 minutos a 5°C y 10°C, las muestras con enzima lipolítica tenían una alta viscosidad que hacía imposible la agitación. Lo más probable fue debido a la cristalización de FFA. Se observó disminución en las concentraciones de LPC en TN 6642 a 30 U/g de yema de huevo, 30°C desde 120 hasta 240 minutos de reacción no se observó en ninguno de estos experimentos.

La enzimación de la yema de huevo con Lecitasa® Ultra fosfolipasa proporciona velocidades iniciales significativamente decrecientes a 20°C y temperaturas inferiores en comparación con la velocidad inicial de Lecitasa® Ultra a 53°C (figura 25). A 20°C se alcanzó una concentración de LPC de 3,0% (p/p) y una concentración de FFA del 1,5% (p/p) después de 1440 minutos de reacción con 30 U/g de yema de huevo. Esta concentración fue similar a los 240 minutos de reacción a 53°C.

La figura 26 muestra el análisis por TLC del líquido extraído por la yema de huevo modificada por la enzima. Este análisis confirmó los resultados de la LC-MS y demostró que la enzima lipolítica según la presente invención y Lecitasa® Ultra fosfolipasa aumentaba la cantidad de lisolecitina.

La reacción enzimática, que cataliza las enzimas lipolíticas, produce cantidades equivalentes de lisolecitina y ácidos grasos libres. Una posible e indeseada reacción secundaria es la hidrólisis de triacilglicéridos. En la figura 27 se muestra la reacción entre el cambio en la cantidad de lisolecitina y ácidos grasos libres durante la reacción enzimática.

Con la Lecitasa® Ultra existe una buena correlación de formación equivalente de lisolecitina y ácidos grasos libres (figura 27). Sin embargo, en la mayoría de las muestras tratadas con Lecitasa® Ultra había muy poca reacción. La enzimación de la yema de huevo con la enzima lipolítica de la presente invención da como resultado la producción de más de un ácido graso libre por lisolecitina formada a concentraciones de lisolecitina superiores a 40 mM y concentraciones en ácido graso libre superiores a 60 mM. La conversión máxima con Lecitasa® Ultra es lisolecitina 30 mM y ácido graso libre 25 mM. Las muestras con una relación de ácido graso libre a lisolecitina inferior a 0,8 o superior a 1,2 (n/n) y contenido en LPC superior a 1,0% (p/p) se muestran en la Tabla 18.

TABLA 18

Muestras con relaciones de ácido graso libre (FFA) a lisolecitina (LPC) inferiores a 0,8 o superiores a 1,2 (n/n) y contenido en LPC superior a 1% (p/p). Las muestras se trataron con enzima lipolítica o Lecitasa® Ultra. El FFA se determinó por el método NEFA C. LPC y PC se determinaron por LC-MS

Enzima	Temp. (°C)	Tiempo de reacción (min)	$\Delta\text{FFA}/\Delta\text{LPC}$ (n/n)	% de LPC (p/p)	% de FFA (p/p)	% de PC (p/p)
Enzima lipolítica	5	1440	1,99	3,0	2,9	2,0
Enzima lipolítica	10	480	1,97	2,3	2,3	2,5
Enzima lipolítica	15	480	1,48	4,1	3,5	0,6
Enzima lipolítica	15	360	1,64	3,6	3,4	1,0
Enzima lipolítica	15	1440	1,98	4,2	4,7	0,1
Enzima lipolítica	20	60	0,67	3,3	1,6	2,0
Enzima lipolítica	20	360	1,30	4,7	3,6	0,3
Enzima lipolítica	20	480	1,43	5,0	4,1	0,3
Lecitasa® Ultra	20	1440	0,72	3,0	1,5	2,0
Enzima lipolítica	53	15	0,69	1,5	0,9	3,7
Enzima lipolítica	53	60	0,70	1,7	1,0	2,6
Enzima lipolítica	53	90	0,71	1,8	1,0	2,7
Enzima lipolítica	53	240	0,72	1,7	1,0	2,8
Enzima lipolítica	53	30	0,72	1,8	1,0	3,0
Lecitasa® Ultra	53	120	0,61	2,4	1,1	2,3
Lecitasa® Ultra	53	60	0,62	1,6	0,9	2,9

Muestras con una relación de ácido graso libre a lisolecitina superior a 1,2 (n/n) y un contenido en LPC superior a 1,0% (p/p) (figura 27) se observan generalmente a tiempos de reacción prolongados o en muestras que contienen menos de 1,0% de PC (p/p). La muestra de enzima lipolítica a 15°C tiene relaciones elevadas de ácido graso libre a lisolecitina en todas las muestras. Esto indica que las enzimas cambian la especificidad del sustrato a tiempos de reacción prolongados o cuando el contenido de PC es bajo. Esto podría ser debido a la hidrólisis de fosfatidileta-

ES 2 351 426 T3

nolamina, digalactosil diacilglicérido o triacilglicéridos que se encuentran en la yema de huevo. Muestras con una relación de ácido graso libre a lisolecitina inferior a 0,8 (n/n) y un contenido en LPC superior a 1,0% (p/p) se observan generalmente a una temperatura de reacción de 53°C (Tabla 18). Esto podría explicarse por interesterificaciones.

La figura 28 demuestra que la enzima lipolítica de la presente invención no presenta actividad hidrófila sobre los triacilglicéridos y 1,3 diacilglicéridos a tiempos de reacción prolongados o bajas concentraciones de PC. La acumulación de 1,2-diacilglicéridos demuestra que la actividad de la lipasa es específica para 1,3. La formación de monoglicéridos demuestra que Lecitasa® Ultra ejercía un efecto hidrolítico sobre tri- o diacilglicéridos a 20°C. No es posible determinar si la enzima lipolítica de la presente invención o Lecitasa® Ultra fosfolipasa, tiene el mayor grado de hidrólisis de triacilglicéridos debido a que los niveles de formación de LPC difieren significativamente. La reducción de la dosis de enzima y el tiempo de reacción de la enzima lipolítica podría reducir la hidrólisis. La Tabla 18A presenta el tiempo de reacción, la temperatura y la dosis aplicada a los pacientes de las bandas 1 a 30 en la figura 18.

TABLA 18

Número de banda	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30					
Enzima ^a	B	K	K	L	B	K	K	L	B	K	K	B	K	K	K	K	L	L	L	L	B	K	K	K	L	L	L	B	K	L					
Tiempo de reacción (h)	8	24	24	24	8	24	24	24	8	24	24	4	6	8	24	4	6	8	24	1	2	4	1	2	4	1	2	4	4	4					
Temperatura (°C)	5	5	5	5	10	10	10	10	15	15	15	20	20	20	20	20	20	20	20	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53
Dosis (U/g)	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30

^a) B: blanco, K: proteína lipolítica según la presente invención. L: Lecitasa® Ultra fosfolipasa

Para los expertos resulta evidente que, utilizando experimentación rutinaria, la optimización de la dosis enzimática, la temperatura de reacción y el tiempo de reacción pueden determinarse fácilmente para cualquier aplicación alimenticia dada.

Conclusión

Se realizó la enzimación de la yema de huevo de DanÆg A/S de una enzima lipolítica según la presente invención y Lecitasa® Ultra fosfolipasas para determinar la conversión de lecitina en lisolecitina. Ésta se realizó utilizando una dosis de enzima de 30 U/g de yema de huevo a cinco temperaturas (5 a 20°C y 53°C), y a seis tiempos de reacción diferentes (60 a 1440 minutos, sin embargo a 53°C, 15 a 240 min) se llevó a cabo para examinar la actividad enzimática. 53°C es la temperatura utilizada actualmente en la industria para modificar la yema de huevo con Lecitasa® Ultra.

La enzima lipolítica según la presente invención tenía una velocidad de reacción mayor que la Lecitasa® Ultra a todas las temperaturas probadas. A 53°C la reacción con enzima lipolítica cesó después de solo 30 minutos de reacción. A una dosis de 30 U/g de yema de huevo a 53°C la concentración de LPC fue de 1,7 a 2,7% (p/p) con enzima lipolítica y Lecitasa® Ultra, respectivamente. A la concentración de 3,3% (p/p) de LPC se hizo reaccionar después de sólo 60 minutos de reacción a 20°C con enzima lipolítica.

A bajas temperaturas (5 a 20°C) la conversión de lecitina en lisolecitina con enzima lipolítica fue significativamente mejor que con Lecitasa® Ultra. La velocidad de reacción de la enzima lipolítica fue notablemente menor a 10°C e inferior en comparación con a 15°C y superior. La enzima lipolítica era activa a 5°C y formación de más del 2% (p/p) de lisolecitina fue detectable después de 24 horas de reacción. Además las muestras con la enzima lipolítica eran más viscosas a 10°C e inferiores en comparación con temperaturas más altas.

Se observó que la enzima lipolítica cambia la especificidad del sustrato e hidroliza fosfatidil-etanolamina, digalactosil-diacilglicérido o triacilglicéridos además de los fosfolípidos a tiempos de reacción prolongados o cuando el contenido de PC es bajo. Esto puede evitarse utilizando una dosis de enzima menor o tiempos de reacción más breves y justifica la necesidad de la utilización total de las condiciones de tratamiento de cada producto en cuestión. A 53°C las interesterificaciones pueden explicar que se produce menos de un equivalente de ácido graso libre por lisolecitina con la enzima lipolítica y Lecitasa® Ultra.

En conclusión, la enzima lipolítica según la presente invención, es un candidato potencial para la enzimación de la yema de huevo a baja temperatura. La actividad observada a bajas temperaturas es también de interés en otras aplicaciones.

Ejemplo 10

Producción de mayonesa mediante utilización de una enzima lipolítica CBS 782.83 de Fusarium heterosporum

Producción de mayonesa

Se disolvieron 6,25 g de enzima lipolítica preparada como se describe en el Ejemplo 4 en 50 ml de H₂O desmineralizada correspondiente a una actividad de fosfolipasa de 150 U/ml. Tras 15 minutos de agitación se centrifugó la solución durante cinco minutos 1370 x g. El sobrenadante se utilizó para la enzimación de 150 g de yema de huevo de

ES 2 351 426 T3

Sanofa A/S según la Tabla 19. Otros 150 de yema de huevo de Sanofa A/S se trataron con Lecitasa® Ultra (Novozymes A/S, Dinamarca) según la Tabla. Las enzimas se llevaron a cabo a 30°C durante 180 minutos con agitación lenta. La extracción de lípido se llevó a cabo tal como se describe en el Ejemplo 4.

TABLA 19

Enzimación de yema de huevo de Sanofa A/S utilizando enzima lipolítica según la presente invención y Lecitasa® Ultra, respectivamente. La solución de enzima lipolítica utilizada tenía una actividad de 150 U/ml y la Lecitasa® Ultra tenía una actividad de fosfolipasa de 34500 U/ml

Muestra	Cantidad de yema de huevo	Enzima lipolítica añadida	Lecitasa® Ultra añadida	H ₂ O desm. añadida	U/g de yema de huevo
Referencia	150 g			30,0 mL	0
Enzima lipolítica	150 g	30,0 mL			30
Lecitasa® Ultra	150 g		0,13 mL	29,9 mL	30

Se produjo mayonesa con yema de huevo modificada con enzima de Sanofa A/S utilizando un mezclado Koruma (Disho V60/10). Durante el tratamiento se calentó la mayonesa a 95°C durante cinco minutos

TABLA 20

Ingredientes utilizados para producir mayonesa

Ingrediente	Mayonesa de referencia	Enzima lipolítica de mayonesa	Lecitasa® Ultra de mayonesa
Agua	34,5 %	34,5 %	34,5 %
Aceite	50,0 %	50,0 %	50,0 %
Sal	1,0%	1,0%	1,0%
Azúcar	3,0%	3,0%	3,0%
Sorbato potásico	0,1 %	0,1 %	0,1 %
Grindsted FF 1102	1,7 %	1,7 %	1,7 %
Yema de huevo 1	4,23 %		
Yema de huevo 2		4,23 %	
Yema de huevo 3			4,23 %
Vinagre al 10%	4,00 %	4,00 %	4,00 %
Mostaza	1,50 %	1,50 %	1,50 %
Suma	100 %	100 %	100 %

Análisis por TLC

El análisis por TLC se llevó a cabo como se describió anteriormente.

Determinación del tamaño de partícula en la mayonesa

Se disolvieron 2,0 g de muestra de mayonesa en 22,5 g de SDS al 0,2% y se agitó durante un mínimo de 30 minutos a 300 rpm. La distribución del tamaño de partícula se midió a continuación en un analizador granulométrico Malvern.

Resultados

Se utilizó yema de huevo de Sanofa A/S para la producción de mayonesa con yema de huevo modificada con enzima. Esta yema de huevo contenía 8% de sal (en comparación con 0% de yema de huevo en DanÆg). Las pruebas iniciales (no representadas) demostraron que la concentración de sal mayor en la yema de huevo de Sanofa A/S influía en la actividad lipolítica y por consiguiente, se utilizó una dosis de enzima de 30 U/g en lugar de 20 U/G.

El análisis por TLC del lípido extraído de la yema de huevo modificada con enzima de Sanofa A/S (figura 29) demostró que la enzima lipolítica según la presente invención reducía la cantidad de lecitina correspondiente con el aumento de la cantidad de lisolecitina (figura 29). En comparación, la conversión de lecitina en lisolecitina al utilizar

Lecitasa® Ultra era insignificante. La conversión elevada de lecitina en lisolecitina mostrada por TLC correlacionaba bien con la determinación de ácido graso libre realizada en el lípido extraído de la yema de huevo modificada con enzima de Sanofa A/S (Tabla 21). La cantidad de ácido graso libre liberado utilizando enzima lipolítica fue 3,5 veces mayor que la cantidad de ácido graso libre utilizando Lecitasa® Ultra.

TABLA 21

Cantidad de ácido graso libre en la yema de huevo modificada con enzima de Sanofa A/S. La cantidad de ácido graso libre se analizó por el método C de NEFA y se expresa en porcentaje de yema de huevo

Muestra	Ácido graso libre (% (p/p))
Referencia	0,39
Enzima lipolítica	2,4
Lecitasa® Ultra	0,68

La distribución de tamaño de las gotitas de aceite en la mayonesa se analizó con objeto de evaluar las propiedades de emulsificación de la yema de huevo de Sanofa A/S modificada con enzima de forma distinta. Como puede observarse la mayonesa producida con yema de huevo tratada con la enzima lipolítica de la presente invención tenía el tamaño de partícula medio más pequeño así como la distribución de tamaño de partícula más estrecha en comparación con la mayonesa producida con yema de huevo tratada con Lecitasa® Ultra o yema de huevo sin tratar. Un tamaño de partícula medio pequeño así como una distribución estrecha del tamaño de partícula indica buenas propiedades de emulsificación, por consiguiente la yema de huevo modificada con enzima lipolítica tenía las mejores propiedades de emulsificación.

TABLA 22

Distribución del tamaño de partícula en la mayonesa preparada con yema de huevo modificada con enzima de Sanofa A/S

Muestra	Tamaño medio de partícula	10% cuantil (µm)	90% cuantil (µm)
Referencia	13,7	2,0	21,5
Enzima lipolítica	4,4	1,2	7,3
Lecitasa® Ultra	13,3	1,8	21,9

Para evaluar la estabilidad térmica de las emulsiones preparadas con yema de huevo modificada con enzima de Sanofa A/S, se calentaron las mayonesas en un horno de microondas durante 4 segundos. Como puede apreciarse en la figura 30, las mayonesas que contenían yema de huevo modificada con enzima produjeron emulsiones estables al calor, mientras que la referencia que contenía yema de huevo sin tratar separada en el tratamiento térmico en el horno de microondas y la emulsión por consiguiente no eran estables al calor.

Conclusión

Los resultados del análisis de TLC y la determinación de ácido graso libre de la yema de huevo modificada con enzima de Sanofa A/S, y la distribución del tamaño de partícula y la prueba de estabilidad al calor de las mayonesas producidas con yema de huevo modificada con enzima de Sanofa A/S se correlacionaron bien. La yema de huevo modificada utilizando la enzima lipolítica según la presente invención tenía la tasa de conversión mayor de lecitina en lisolecitina y la cantidad mayor de ácido graso libre. Como era de esperar, este cambio en la relación lecitina:lisolecitina produjo una mayonesa que era estable al calor y tenía la distribución de tamaño de partícula más óptima.

Utilizando Lecitasa® Ultra para modificar la yema de huevo procedente de Sanofa A/S no dio como resultado un cambio muy grande en la relación lecitina:lisolecitina o una gran cantidad de ácidos grasos libres. Esta conversión menos pronunciada de lecitina a lisolecitina se reflejaba en la distribución del tamaño de partícula de la mayonesa que era similar a la de la yema de huevo sin modificar. El cambio en la relación lecitina:lisolecitina que se produjo utilizando Lecitasa® Ultra fue suficiente, sin embargo, para hacer la mayonesa estable al calor.

La yema de huevo de Sanofa A/S modificada con 30 U/g de enzima lipolítica a 30°C durante 120 minutos presentaba una velocidad de conversión alta de lecitina a lisolecitina, y la mayonesa producida con esta yema de huevo era estable al calor y tenía una distribución de tamaño de partícula óptima. En comparación, la yema de huevo de Sanofa A/S tratada con 30 U/g de Lecitasa® Ultra a 30°C durante 120 minutos presentaba solamente un cambio menor en la relación lecitina:lisolecitina y la mayonesa producida tenía una distribución de tamaño de partícula similar a la mayonesa con yema de huevo sin tratar, pero era de hecho estable al calor. Por consiguiente, la enzima lipolítica según la presente invención fue mayor de la Lecitasa® Ultra en la producción de mayonesa.

Ejemplo 11

Prueba de aplicación de una enzima lipolítica procedente de Fusarium heterosporum en combinación con emulsio-
nante para la preparación de panecillos con corteza dura

En esta prueba se utilizaron fermentos de enzima lipolítica según la presente invención y procedentes de *Fusarium heterosporum* sola o en combinación con Panodan® A2020 DATEM y GRINDSTED® SSL P55, ambos emulsio-
 nantes de Danisco A/S, para la cocción de panecillos con corteza dura. El efecto sobre el volumen específico del pan
 se comparó con el efecto de Lipopan F™ de Novozymes, solo o en combinación con emulsionante sobre el volumen
 específico del pan.

Aplicación

Se hornearon panecillos con corteza dura utilizando la receta y el procedimiento de cocción siguientes.

Receta para cocción	Cantidad	Componentes en % de harina
Harina-Danish Reform 2004002		2.000 g 100
Agua	1.140 g	57
Levadura comprimida	120 g	6
Sal	32 g	1,6
Azúcar	32 g	1,6
Ácido ascórbico	0 ppm	0
Alfa amilasa normal/GRINDAMYL™ A 1000 de Danisco A/S	75 ppm	0,150

Procedimiento de horneado

Sistema mezclador Diosna

- Mezcla en seco durante 1 min. Lentamente
- Mezcla lenta 2 min. + 4 min. Rápida
- Temperatura de la masa: 26°C
- Pesada de la masa: 1350 g
- En reposo: 10 min. a 30°C en cabina calefactora
- Moldeo: moldeador Fortuna 3/17/7
- Envasado hermético: 45 min. a 34°C, H.R. 85%
- Cocción en horno Bago: 13 min. a 220°C, 13 s. vapor + 5 min. tiro abierto
- Piso de piedra MIWE: prog. N° 1
- Después de cocer los panecillos se enfrían durante 25 min antes de la pesada. El volumen de los panecillos se mide por el método de desplazamiento de la semilla de colza.

Volumen específico del pan

$$\text{Volumen específico} = \text{Volumen del pan, ccm/peso del pan, g}$$

La adición de enzima lipolítica liofilizada está referida a la harina. La enzima se añade a la harina después de
 mezclar en primer lugar junto con agua, ácido ascórbico y levadura comprimida. Todos los demás ingredientes secos
 se mezclan en la etapa 1.

Resultados

Se utiliza enzima lipolítica liofilizada procedente de *Fusarium heterosporum* en combinación con Panodan®
 M2020 DATEM de Danisco A/S y se prueba frente a una combinación de Lipopan F™/DATEM así como Lipopan
 F™ puro o DATEM puro. Los resultados se muestran en la Tabla 23 y en la figura 31.

ES 2 351 426 T3

TABLA 23

	Muestra	Cantidad	Volumen específico, g/ccm
5	Referencia		5,89
		10 ppm	5,98
	Lipopan F TM	30 ppm	7,54
		40 ppm	8,18
10		96 ppm	6,07
		191 ppm	6,2
	Enzima lipolítica	287 ppm	7,06
		383 ppm	8,13
15		478 ppm	8,01
	PAN M2020	0,3%	7,89
		0,15%	6,5
	PAN M2020 +	0,15%	
20	Enzima lipolítica	96 ppm	7,68
	PAN M2020 +	0,15%	
	Enzima lipolítica	191 ppm	8,29
	PAN M2020 +	0,15%	
25	Lipopan F TM	10 ppm	7,69

Se utiliza enzima lipolítica liofilizada procedente de *Fusarium heterosporum* en combinación con Panodan® A2020, DATEM y GRINDSTED® SSL P55 y se prueba frente a una combinación de Lipopan FTM/SSL o Lipopan FTM/DATEM así como Lipopan FTM puro, DATEM puro y SSL puro.

Los resultados se muestran en la Tabla 24 y en la figura 32.

TABLA 24

	Muestra	Cantidad	Volumen específico, g/ccm
40	Referencia		5,98
	Panodan® A2020 al 0,3%	0,3%	7,98
	SSL P55 al 0,3%	0,3%	7,78
	Lipopan F TM	15 ppm	6,42
45		40 ppm	7,77
	Lipopan F TM +	15 ppm	
	Panodan® A2020 al 0,15%	0,15%	8,44
	Lipopan F TM +	15 ppm	
50	SSL P55 al 0,15%	0,15%	8,62
	Enzima lipolítica	43 ppm	5,93
		86 ppm	6,43
	Enzima lipolítica+	30 ppm	
55	Panodan® A2020 al 0,15%	0,15%	7,86
	Enzima lipolítica+	43 ppm	
	Panodan® A2020 al 0,15%	0,15%	7,86
	Enzima lipolítica+	43 ppm	
60	GRINSTED® SSL P55	0,15%	8,1

Conclusión

La conclusión de la Tabla 23 y de la figura 31 es que, una dosis óptima de enzima lipolítica liofilizada según la presente invención es aproximadamente 383 ppm de enzima lipolítica y que el producto puede utilizarse en una dosis baja en combinación con una dosis baja del emulsionante DATEM. En un experimento en paralelo se demos-

tró que a dosis desde 574 ppm hasta 1912 ppm de enzima lipolítica el volumen específico del pan disminuyó (datos no representados). El rendimiento de 383 ppm de enzima lipolítica según la presente invención es similar a 40 ppm de Lipopan FTM. Cuando se utiliza en combinación con el emulsionante, la enzima lipolítica según la presente invención funciona también en el nivel con Lipopan FTM. Según la determinación de la actividad de fosfolipasa utilizando el ensayo TIPU descrito anteriormente en la presente memoria, 10 ppm de Lipopan FTM son aprox. 120 TIPU por kg de harina y 96 ppm de enzima lipolítica de la presente invención corresponden a 117 TIPU por kg de harina.

Además basándose en los resultados de la prueba de la Tabla 24 y de la figura 32, los autores concluyen que una enzima lipolítica según la presente invención, puede utilizarse en combinación con SSL así como con DATEM y de este modo refuerzan el efecto de una baja concentración de emulsionante. La funcionalidad de la enzima lipolítica según la presente invención puede compararse con la funcionalidad de Lipopan FTM cuando se dosifican equitativamente. De nuevo, el nivel óptimo de actividad de fosfolipasa en combinación con un emulsionante, se determina que es aprox. 100-150 TIPU por kg de harina.

En conclusión, una dosis óptima de enzima lipolítica pura según la presente invención, es aproximadamente 500 TIPU por kg de harina en combinación con el emulsionante la concentración de enzima lipolítica debería ser 1/5 a 1/4 de la concentración óptima de la enzima lipolítica, lo que hace referencia a aprox. 120 TIPU por kg de harina.

Ejemplo 12

Prueba de aplicación de una enzima lipolítica procedente de Fusarium heterosporum para la preparación de tortilla de trigo

Se ha probado el efecto de una enzima lipolítica según la presente invención y procedente de *Fusarium heterosporum* sobre la laminabilidad de la tortilla de trigo preparada con ácido fumárico (procedimiento de EE.UU.) como se explica en el ejemplo siguiente.

La tortilla de trigo se coció utilizando los ingredientes de la Tabla 25:

TABLA 25

Receta para la preparación de tortilla de trigo

35

Receta	Tipo	Dosis (% de harina)	Gramos
Harina	Clásico (n° 2004068)	100	3.000
Azúcar		1,0	30
Grasa (manteca, margarina, aceite)	manteca	8,7	267
Sal		1,5	45
Sorbato potásico		0,3	9
Propionato-Ca		0,3	9
Bicarbonato sódico		0,9	27
Ácido	fumárico	0,8	24
Agua		48	144

50

Procedimiento para preparar la masa de tortilla de trigo

1. Temperatura deseada de la masa: 32°C.
2. El amasado se realiza a temperatura ambiente en un mezclador Kemper.
3. Se colocan todos los ingredientes secos en la vasija del mezclador (incluyendo opcionalmente enzimas lipolíticas y/o emulsionantes)
4. Se mezcla en seco durante 1 min.
5. Se añade agua.
6. Mezclado: 11 min. a velocidad 1.
7. Pesada: 1350 g x 3

65

ES 2 351 426 T3

8. Moldeado: en panecillos de masa sobre divisor/redondeador glimek

9. Reposo durante 10 min a 32°C.

5 10. Horneado: en un horno para tortillas CFO 40, con el ajuste siguiente: arriba: 230°C, medio: 228°C y fondo: 160°C.

11. Enfriamiento: 12 min. a 20°C, H.R. 80%.

10 Se añadió a la masa una enzima lipolítica según la presente invención en concentraciones crecientes (Pruebas n° 3-7). Para comparación, se incluyeron una referencia (prueba n° 1) y una prueba con el emulsionante Panodan® 205 de Danisco A/S (Prueba n° 2). Véase la Tabla 26.

15 Cuando se añaden la enzima lipolítica, Panodan® 205 y L-cisteína, se añaden al primer procedimiento de mezclado (Etapas 3 y 4 anteriormente). La L-cisteína puede añadirse para aumentar la extensibilidad de la masa preparada y de este modo mejorar el proceso de prensado de la masa antes de la cocción.

TABLA 26

Montaje de la prueba

Ingredientes Prueba n°	Enzima lipolítica	Panodan® 205	L-cisteína (ppm)
1			10
2		1,03 %	10
3	100ppm		10
4	200ppm		10
5	400ppm		10
6	1200ppm		10
7	2400ppm		10

Las tortillas se evalúan por medio de una prueba de laminabilidad en frío realizada a temperatura ambiente, en la que la tortilla es laminada alrededor de diferentes rodillos de madera de diferentes diámetros, comenzando con el rodillo de madera de mayor diámetro. La laminabilidad está indicada por el número de rodillos de madera alrededor de los cuales la tortilla puede laminarse sin romperse. Cuanto mayor es el número mejor es la laminabilidad.

Muestra	Evaluación visual Laminabilidad	Penetración Fuerza (g)
1-día 7	2-1-1	432
2-día 7	1-1-1	421
3-día 7	1-1-1	369
4-día 7	2-2-2	439
5-día 7	2-2-1	489
6-día 7	2-1-2	448
7-día 7	2-2-2	533

A partir de los resultados, se concluye que una dosis de 200 ppm o más de una proteína lipolítica según la presente invención, parece proporcionar una mejor laminabilidad en comparación con el sistema de referencia. Utilizando el ensayo TUPÍ descrito anteriormente en la presente memoria, se determinó que el nivel de actividad necesario para mejorar la laminabilidad (en una dosis de 200 ppm) corresponde a aproximadamente 650 unidades TIPU por kg de harina. De estos resultados puede concluirse también que la fuerza para hacer la prueba de penetración aumenta a un nivel mayor de enzima lipolítica, lo que hace referencia a que la resistencia de la tortilla mejora. La prueba de penetración se realiza mediante la utilización del analizador TAXT2 de textura, producido por Stable Micro System, en el que se mide la fuerza necesaria para penetrar o romper la tortilla.

ES 2 351 426 T3

Este equipo está ajustado con los siguientes parámetros:

La fuerza se mide en compresión.

5		
	Velocidad de la prueba previa	10 mm/s
	Velocidad de ensayo	2 mm/s
10	Velocidad después de la prueba	10 mm/s
	Dist.de la prueba de rotura	1 mm/s
	Distancia	25 mm/s
	Fuerza	1 g
15	Tiempo	5 s
	Célula de carga	5 kg
	Temperatura	20-22°C (temperatura ambiente)

20 Ejemplo 13

Clonación molecular, análisis de la secuencia y expresión heteróloga de un gen sintético que codifica una enzima lipolítica procedente de Fusarium semitectum (IBT 9507) en Hansenula polymorpha

25 Se clonó un fragmento de un gen de enzima lipolítica de *F. semitectum* procedente del ADN genómico utilizando RCP con cebadores diseñados a partir de bloques conservados de aminoácidos en secuencias de proteínas alineadas de enzimas lipolíticas de diferentes cepas de *Fusarium*. Los cebadores degenerados de RCP se diseñaron utilizando los programas informáticos CODEHOP (Rose *et al.*, 2003, *Nucleic. Acids Res.*, 18: 3763-3766)).

30 Para clonar los extremos del gen se utilizaron los métodos para 5'- y 3'-RACP (Frohman *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8998-2002). Se aisló ARN completo de un cultivo de la cepa *F. semitectum* inducida con 1% de aceite de girasol, y los cebadores utilizados se diseñaron a partir de la secuencia del fragmento génico obtenido con los cebadores CODEHOP.

35 Los tres fragmentos obtenidos por los procedimientos anteriores se ensamblaron por simulación informática para poner de manifiesto la secuencia de ADNc completa. El análisis de la secuencia de ADNc de 1.236 nucleótidos de longitud presentaba un marco de lectura abierto que comprende 352 aminoácidos (figura 33).

40 Para expresar el gen de la enzima lipolítica de *F. semitectum* en el gen de *Hansenula* el gen se suministró con una secuencia señal procedente del factor de apareamiento α de la levadura y se insertó detrás del activador de FMD en el vector de expresión pB14 de *Hansenula*. El plásmido resultante, pB14-alp.sem (mostrado esquemáticamente en la figura 34) se transformó en las células competentes de *Hansenula polymorpha* por electroporación. Se seleccionaron los transformados en placas YND y se continuaron seleccionando colonias para la integración múltiple del gen mediante 45 10 pasos de 1:200 diluciones en cultivos líquidos de YND. Por último, los cultivos seleccionados se transfirieron dos veces al medio YPD.

Para determinar el nivel de expresión del gen de la enzima lipolítica los clones seleccionados se cultivaron en YPD con glicerol al 1,8% y glucosa al 0,2% durante 2 días a 37°C.

50

Ejemplo 14

Determinación del pH óptimo y de la temperatura para la actividad de una enzima lipolítica de Fusarium semitectum

55 Una enzima lipolítica según la presente invención de IBT 9507 de *Fusarium semitectum* y expresada en *Hansenula polymorpha* tal como se describe en el Ejemplo 8, se utilizó en ensayos funcionales en suspensión de la masa para la determinación de la actividad de fosfolipasa y galactolipasa y la actividad de esta enzima se estudió en relación con las variaciones en el pH y la temperatura.

60

Procedimientos analíticos

Cromatografía de gases

65

Se pesaron 0,8 gramos de harina de trigo en un tubo de centrifugadora con tapa de 12 ml. Se añaden 1,5 ml de agua que contiene la enzima. La muestra se mezcla en un Whirley y se coloca en una cabina calefactora a 30°C durante 60 minutos. Se añaden 6 ml de n-butanol:etanol 9:1 y la muestra se mezcla de nuevo hasta que la harina esté

ES 2 351 426 T3

finamente distribuida en el disolvente. Los tubos se colocan a continuación en un baño de agua a 95°C durante 10 minutos. A continuación se mezcla otra vez y se coloca en un dispositivo giratorio a 45 rpm durante 45 minutos. La mezcla se centrifuga a continuación a 2.000 g durante 10 minutos y se transfieren 2 ml de sobrenadante a un tambor de vidrio de 10 ml. El disolvente se evapora a 70°C bajo un vapor de nitrógeno. Los lípidos aislados se analizan por GLC.

Los ensayos de cromatografía de gases y de actividad de galactolipasa se realizaron tal como se describe en el Ejemplo 1.

Temperatura óptima

Actividad de galactolipasa

Para la determinación de la actividad en función de la temperatura el ensayo de la fosfolipasa se realizó como en el Ejemplo 1 pero la temperatura se fijó a 30°C, 37°C, 45°C, 52°C o 60°C.

pH óptimo

Actividad de fosfolipasa

Para la determinación de la actividad en función del pH el ensayo de la fosfolipasa se realizó como en el Ejemplo 1 pero la L- α -fosfatidilcolina al 0,6% Plant al 95% (Avanti n° 441601) y Triton-X 100 al 0,4% (Sigma X-100) se disolvieron en tampón de fosfato 0,05 M pH 5, pH 6, pH 7, pH 8 o pH 9.

Resultados

En una enzima lipolítica según la presente invención de IBT 9507 de *Fusarium semitectum* se analizó la actividad PLU-7 de fosfolipasa y la actividad GLU de galactolipasa con los resultados mostrados en la Tabla 27.

TABLA 27

Actividad enzimática de *Fusarium semitectum*

Ensayo	Actividad
Fosfolipasa	0,8 PLU-7/ml
Galactolipasa	1,3 GLU/ml

Se analizó IBT 9507 de *Fusarium semitectum* en experimentos en suspensión de la masa añadiendo 1 PLU-7 a 0,8 g de harina según el procedimiento mencionado. Se preparó también una muestra de referencia con agua en lugar de enzima y una muestra con Lipopan FTM. Los lípidos extraídos de la masa se analizaron por GLC con los resultados mostrados en la Tabla 28.

TABLA 28

GLC de lípido de la masa, % referido al peso de harina. FFA = ácidos grasos libres, MGMG = monogalactosilmonoglicérido, DGMG = digalactosilmonoglicérido, MGDG = monogalactosildiglicérido, DGDG = digalactosildiglicérido, TRI = triglicérido

Enzima	Dosis	FFA, %	MGMG, %	DGMG, %	MGDG, %	DGDG, %	TRI, %
Referencia	0	0,148	0,007	0,025	0,047	0,160	0,516
F. <i>semitectum</i>	1 PLU-7/g de harina	0,268	0,001	0,120	0,033	0,045	0,446
Lipopan F TM	1 PLU-7/g de harina	0,229	0,027	0,090	0,016	0,069	0,415

ES 2 351 426 T3

Los resultados en la Tabla 28 indican que la lipasa de *F. semitectum* presenta actividad significativa en galactolípidos y en comparación menos actividad en triglicérido en comparación con Lipopan FTM.

Se analizó también IBT 9507 de *Fusarium semitectum* con respecto a la actividad en función de la temperatura (Tabla 29) y pH (Tabla 30).

TABLA 29

Actividad de fosfolipasa en función de la temperatura para F. semitectum

Temperatura, °C	Actividad relativa, PLU
30	79
37	92
45	100
52	20
60	2

TABLA 30

Actividad de la fosfolipasa en función del pH para F. semitectum

pH	Actividad relativa, PLU
5	67
6	83
7	100
8	80
9	17

Las actividades presentadas en las Tablas 29 y 30 se ilustran también gráficamente en las figuras 35 y 36.

Conclusión

La enzima lipolítica según la presente invención de *Fusarium semitectum* ha mostrado actividad muy acusada en galactolípidos en la masa y la actividad en el triglicérido es menor que la actividad en triglicérido de Lipopan FTM. La temperatura óptima para la actividad de esta enzima es aprox. 45°C y el pH óptimo es 7.

Ejemplo 15

Utilización de una enzima lipolítica según la presente invención en pienso para animales

Para evaluar la eficacia de una enzima lipolítica según la presente invención a varios niveles de dosis utilizados en pienso normal para todo el periodo de producción de pollos para asar.

Resumen

Los resultados preliminares sugieren que la adición de una enzima lipolítica según la presente invención a las dietas de pollos para asar es una estrategia nutritiva eficaz para mejorar el rendimiento de las aves, para mejorar la retención de nutrientes y para reducir la excreción de nitrógeno. Específicamente, las investigaciones preliminares sugieren que la adición de enzima lipolítica según la presente invención a la dieta de animales mejora la ganancia de peso corporal, la eficacia de la conversión del pienso y la capacidad de metabolismo de la materia seca y del nitrógeno del animal.

ES 2 351 426 T3

Detalles del tratamiento	
Número de tratamientos	8
Réplica de tratamientos	0-21 d, 13 réplicas 22-42 d, 9 réplicas
Aves por réplica	0-21 d, 8 aves/réplica (6 en jaula grande, 2 en jaula pequeña) 22-42 d, 2 aves/réplica (2 en jaula grande)
Especies de aves	Para asar
Raza del ave	Ross o Cobb
Sexo del ave	Macho
Intervalo de la prueba	0-42 días
Forma nutritiva (granulado/puré)	Puré
Coccidiostático/activador de crecimiento utilizado en la dieta	ninguno
Edad a la que se pesan las aves/pienso	0,21 y 42 días/0,21 y 42 días
Densidad de las existencias (aves/m ²)	
Programa de iluminación	23 h de luz los días 0-4, 16 h de luz los días 4-21, 20 h de luz los días 22-31 y 23 h de luz los días 32-42.
Programa de temperatura doméstico	
Programa de humedad doméstico	
Programa de vacunación	Elancoban (ración inicial)
Ventilación-cambios de aire/h	

Formulación nutritiva y programa de alimentación

Ingredientes	Al inicio (%)	A la terminación (%)
Maíz	55,55	59,22
Centeno	5,00	9,00
SBM (48% CP)	33,47	24,79
Aceite de soja	1,85	3,06
Sal	0,41	0,33
DL metionina	0,21	0,14
Lisina HCL	0,05	0,10
Piedra caliza	1,18	1,15
Fosfato dicálcico	1,48	1,41
Vit/min	0,50	0,50
TiO ₂	0,30	0,30
TOTAL	100,00	100,00
Provisión de nutrientes (calculada)		
CP (%)	21,50	18,06
Me (kcal/kg)	3000,0	3125,0
Me (MJ/kg)	12,55	13,08

ES 2 351 426 T3

	Calcio (%)	0,90	0,85
	Fósforo (%)	0,68	0,63
5	Fósforo disp, (%)	0,40	0,38
	Grasa (%)	4,48	5,73
	Fibra (%)	2,59	2,48
	Met (%)	0,55	0,43
10	Cys (%)	0,36	0,32
	Met+Cys (%)	0,91	0,75
	Lys(%)	1,20	1,00
	Try (%)	0,25	0,20
15	Na (%)	0,18	0,15

El pienso se prepara en forma de papilla, con o sin enzima lipolítica según la presente invención.

20 Las dietas y el agua se ofrecen a voluntad. Las dietas de ensayo se alimentan continuamente a lo largo del período de la prueba. Las muestras de pienso se enriquecen opcionalmente con una enzima lipolítica según la presente invención a razón de 330 g/tonelada. La enzima puede añadirse en forma de enzima anhidra cuando se mezcla el pienso. Se realizan observaciones dw:

25	Peso en vivo (por jaula)	días 0, 21 y 42
	Ganancia de peso	0-21 d, 22-42 d, 0-42 días
30	Ingesta de pienso	0-21 d, 22-42 d, 0-42 días
	FCR (tasa de conversión de alimento)	0-21 d, 22-42 d, 0-42 días
	Recogida de contenidos del íleo	días 21 y 42

35 Se determinan los pesos totales por jaula para el pienso y las aves, así como el peso de la mortalidad total y el número de aves para cada jaula por período analizado. El consumo de pienso por jaula se determina sin corregir para la mortalidad. Los datos de eficacia de conversión del pienso se determinan referidos al consumo total por peso *en vivo* y peso total (incluyendo el peso de mortalidad).

40 Antes de comenzar el estudio se examinan los síntomas de enfermedad, salud y lesiones en los animales. Los que parezcan estar en malas condiciones se apartan del estudio.

45 Los animales del estudio se asignan a sus grupos de tratamiento utilizando una técnica aleatoria. Los animales y sus corrales se identifican exclusivamente antes de empezar la administración del pienso de ensayo.

Los datos de los grupos tratados se comparan con los de su grupo de referencia oportuno utilizando las pruebas estadísticas apropiadas y aceptando un nivel de probabilidad inferior a 0,05 como indicación de significación.

50 Los pesos corporales, las ingestas de alimento y las tasas de conversión del alimento se analizan por análisis de varianza y pruebas de diferencia significativa mínima.

55

60

65

Animales

	Números de tratamiento	2
	Número de réplicas	13 a 21 días y 9 a 42 días
5	Animales por réplica	8 a 21 días y 2 a 42 días
	Especie de animal	Para asar
	Raza del animal	Ross o Cobb
	Sexo	Macho
10	Edad de los animales de ensayo	0 a 42 d
	Peso de los animales del ensayo	~ 40 g
	Dieta/enjaulado	
	Información de la dieta	Véase anteriormente
15	Forma de la dieta	Papilla
	Coccidiostático al inicio	Ninguno
	Coccidiostáticos a la terminación	Ninguno
	Activador de crecimiento inicial	Ninguno
20	Activador de crecimiento final	Ninguno
	Medidas principales realizadas	
	Variables	Ganancia de peso, conversión del pienso, digestibilidad de nutrientes
25	Cuándo	0-21 d, 22-42 d
	Enzimas/aditivos	
	Enzimas utilizadas (1)	Enzima lipolítica de <i>Fusarium semitectum</i> y/o <i>Fusarium heterosporum</i> -330 g/tonelada
30		

Ejemplo 16

- 35 *Evaluación del efecto de una enzima lipolítica CBS 782.83 de Fusarium heterosporum sobre la calidad de la pasta instantánea preparada de harina china*

Introducción

- 40 El mercado de la pasta instantánea (IN) ha experimentado un gran desarrollo en los últimos 5 a 8 años en el S.E. asiático, y en alguna medida en Europa y en EE.UU. Este desarrollo es evidente incluso en las regiones que son tradicionalmente mercados basados en el arroz y/o la pasta (Food Navigator, 2000). La reciente popularidad de IN puede atribuirse principalmente a su coste muy asequible, a la conveniencia y a los procedimientos de producción nítidos.

- 45 La harina con un contenido medio en proteínas (9-11%), bajo índice de cenizas (~0,50%), alto brillo L* (85) y amarillez b* (> 8,0) y alta viscosidad de la pasta de almidón (< 750 BU) produce una pasta instantánea (IN) de color amarillo cremoso y presenta las características deseadas de sensación en el paladar. Existen varios tipos diferentes de pastas consumidas, cada uno con las características específicas de la calidad de harina que impactan en el producto final.

- 50 La satisfacción de las demandas del consumidor final, es un reto en la industria harinera debido al gran número de productos finales y a la amplia gama de expectativas del consumidor. Los ingredientes diseñados específicamente y los aditivos a la dosis correcta desempeñan una función muy importante en la mejora del sabor, textura, aspecto, estabilidad al almacenaje y/o valor nutritivo del producto final.

- 55 En tanto que la importancia del color y la textura de IN cocinado no pueden ser subestimada, los consumidores están discerniendo cada vez más, son conscientes de la salud y están buscando alternativas bajas en grasa sin perjuicio de la calidad.

- 60 Una enzima lipolítica según la presente invención se probó en la harina china para evaluar el efecto del contenido de grasa de IN y estudiar los cambios en la textura y el color durante el tratamiento.

- 65 *Materiales y procedimientos*

Para este proyecto se utilizó el procedimiento convencional de Agrifood Technology para la producción de IN y un procedimiento de evaluación ampliado. Se utilizó harina china como harina de referencia y se realizó al comienzo

de cada día. El contenido en proteína, la humedad, cenizas, color, gluten húmedo y la actividad diastásica de la harina de trigo se midieron utilizando los procedimientos aprobados por la AACC (American Association for Clinical Chemistry). Las pruebas de reología de la masa incluían: harinograma, extensograma (45 min. de succión), alveograma y amilograma.

La producción de IN puede resumirse de la manera siguiente:

Cada lote de IN se preparó a partir de 350 g de harina y se mezcló a baja velocidad durante lo cual se añadieron poco a poco 33 partes de solución salina acuosa que contenía cloruro sódico al 1% y sales alcalinas al 0,2% (carbonato potásico:carbonato sódico en la proporción 6:4). Para las muestras dosificadas, se mezcló la harina intensamente con la cantidad medida de ingrediente antes de la adición de la solución salina acuosa.

Se mezcló la masa desmenuzable durante unos 4 minutos más a velocidad media y se cubrió 8 veces. La cobertura comenzó con un compactador de acero, seguido de dos rodillos acanalados de plástico y por último con cinco rodillos lisos de acero inoxidable, con una relación de reducción del 30% entre cada rodillo. El espesor de la lámina de masa final fue de 1,35 mm. La lámina de masa se cubrió una vez más antes del corte. El diferencial en velocidad entre los rodillos de corte y la cinta transportadora dio como resultado que se formaran rizos apretados. Los hilos de pasta apretadamente rizados se cocieron con vapor durante dos minutos, se frieron en aceite de palma por ambos lados a 180°C durante 1 minuto. Los bloques de pasta se enfriaron y empaquetaron en bolsas de cierre prensado para análisis posteriores.

Las muestras se recogieron en varias fases de la producción para análisis. El color y el tamaño de partícula de la miga, se midieron utilizando el Chromameter de Minolta y los calibradores vernier, respectivamente. El color de la lámina de masa y del producto final se registraron con el Chromameter de Minolta y se tomó una foto digital de ambos (no mostrada). Se realizaron mediciones de actividad en agua en las pastas cocidas al vapor. La actividad en agua puede medirse determinando el peso de las pastas cocidas al vapor tanto inmediatamente después de la cocción con vapor como después de la eliminación completa del contenido de agua mediante secado en una estufa a 90°C, el contenido en agua puede determinarse a continuación dividiendo la diferencia de peso antes y después del secado por el peso después del secado.

El tiempo de cocción óptimo, el rendimiento de la cocción, las pérdidas por cocción (método gravimétrico), el color y la textura (firmeza) de las pastas cocinadas se midieron utilizando los procedimientos convencionales de Agrifood Technology conocidos por un experto en la materia. El análisis del perfil de textura (APT) se realizó también en la textura de la pasta cocinada con objeto de medir la cohesión, la elasticidad y la masticabilidad.

La cohesión se define como cuán bien el producto resiste una segunda deformación en relación con cómo se comporta en la primera deformación. Se mide como el área de trabajo durante la segunda compresión dividida por el área de trabajo durante la primera compresión y por consiguiente no tiene unidades de medida. La cohesión, en este caso se refiere al producto “al dente” que no es un atributo deseable para IN.

La elasticidad se define como cuán bien un producto se recupera físicamente una vez ha sido deformado durante la primera compresión. La elasticidad se mide de varias maneras, pero la más típica, por la distancia de la altura detectada del producto en la segunda compresión.

La masticabilidad se aplica solamente a productos sólidos y se calcula como la pegajosidad multiplicada por la elasticidad. La masticación es recíproca de la pegajosidad.

Un bloque de pasta que representa cada cantidad de dosis se molió en un molinillo de café y se utilizó una sub-muestra homogénea para el análisis de grasas por el método de hidrólisis ácida (pueden utilizarse métodos estándares alternativos para determinar el contenido en grasa).

Resultados y comentarios

El contenido en proteínas y el color (con respecto al brillo, L*) de la harina estaba dentro del intervalo aceptable para la producción de pastas instantáneas. La absorción de agua estaba ligeramente en el límite superior para la producción de IN; sin embargo, ya que la masa de pasta es muy crujiente no impactó en la maquinabilidad.

La harina presentó buena extensibilidad monoaxial (extensograma) y biaxial (alveograma), lo que tendría un impacto positivo sobre las calidades de alimentación de la pasta. La viscosidad máxima del amilograma fue de 870 BU, lo que es deseable para IN.

La pérdida de cocción de IN que contenía la segunda dosis más alta de enzima lipolítica fue mayor que la de la referencia y el IN que contenía la cantidad mínima de enzima lipolítica según la presente invención. El contenido en grasa de IN con la cantidad máxima de enzima lipolítica fue significativamente menor que la referencia y el IN experimental con la cantidad más baja de enzima lipolítica. La elasticidad y la masticabilidad de algún IN experimental fue mejor que la referencia. Basándose en estos datos, la enzima lipolítica se investigaría más a diferentes dosis.

Conclusiones

Algunos de los puntos destacados que pueden extraerse de este estudio son:

La adición a la IN de una enzima lipolítica según la presente invención no impactó drásticamente sobre el tamaño de la miga, la pegajosidad de la miga, las características de maquinabilidad o del tratamiento. Significativamente, las dosis crecientes de enzima lipolítica dieron como resultado una reducción en el contenido en grasa de la IN. La enzima lipolítica mejoró la consistencia de la pasta a dosis crecientes en comparación con la referencia mientras que la cohesión no fue afectada. La enzima lipolítica tenía un efecto positivo sobre la amarillez de las pastas horneadas.

De este modo la enzima lipolítica redujo el contenido en grasa en la IN, mejoró la textura y aumentó la amarillez de las pastas horneadas.

Aunque la presente invención se ha descrito haciendo referencia a las formas de realización preferidas específicas, debe apreciarse que la invención tal como se reivindica no debería estar limitada indebidamente a dichas formas de realización específicas. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para poner en práctica la invención que resultan evidentes para los expertos en bioquímica y biotecnología o en los campos relacionados, se pretende que estén comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Enzima lipolítica fúngica en la que la enzima comprende una secuencia de aminoácidos como la representada en la SEC. ID. nº 1 o la SEC. ID. nº 2 o la SEC. ID. nº 4 o la SEC. ID. nº 6, o una secuencia de aminoácidos que presenta por lo menos 90% de identidad con la SEC. ID. nº 1, SEC. ID. nº 2, SEC. ID. nº 4 o SEC. ID. nº 6, y en la que la presenta una proporción superior de actividad sobre los lípidos polares en comparación con los triglicéridos.
- 10 2. Secuencia nucleotídica que codifica una enzima lipolítica fúngica según la reivindicación 1.
3. Ácido nucleico que codifica una enzima lipolítica fúngica, siendo dicho ácido nucleico seleccionado de entre el grupo constituido por:
 - 15 a) un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica representada en la SEC. ID. nº 3 o la SEC. ID. nº 5 o la SEC. ID. nº 7;
 - b) un ácido nucleico que está relacionado con la secuencia nucleotídica de la SEC. ID. nº 3 o la SEC. ID. nº 5 o la SEC. ID. nº 7 por degeneración del código genético; y
 - 20 c) un ácido nucleico que comprende una secuencia nucleotídica que presenta por lo menos 90% de identidad con la secuencia nucleotídica representada en la SEC. ID. nº 3 o la SEC. ID. nº 5 o la SEC. ID. nº 7.
- 25 4. Procedimiento de preparación de una sustancia alimenticia que comprende añadir la enzima lipolítica fúngica según la reivindicación 1 a uno o más ingredientes de la sustancia alimenticia.
5. Procedimiento de preparación de un producto horneado que comprende la adición de una enzima lipolítica fúngica según la reivindicación 1 a una masa y hornear la masa para preparar el producto horneado.
- 30 6. Procedimiento según la reivindicación 5, en el que la sustancia alimenticia es uno o más de entre los siguientes: huevo o un producto a base de huevo; un producto horneado; producto de pastelería; un producto congelado; un producto lácteo, que incluye un queso; una mousse; una crema vegetal batida; un aceite y una grasa comestibles; un producto batido aireado y no aireado; emulsiones de aceite en agua y emulsiones de agua en aceite; margarina; manteca; un producto para untar, incluyendo productos para untar bajos en grasa y muy bajos en grasa; un aliño; mayonesa; una salsa para mojar; una salsa a base de crema; una sopa a base de crema; una bebida, una emulsión de especias y una salsa.
- 35 7. Procedimiento de preparación de un lisofosfolípido que comprende tratar un fosfolípido con la enzima lipolítica fúngica según la reivindicación 1 para producir el lisofosfolípido.
- 40 8. Procedimiento de preparación de un lisoglucolípido que comprende tratar un glucolípido con una enzima lipolítica fúngica según la reivindicación 1 para producir un lisoglucolípido.
9. Procedimiento de desengomado enzimático de aceites vegetales o comestibles, que comprende el tratamiento del aceite comestible o vegetal con una enzima lipolítica fúngica según la reivindicación 1 con el fin de hidrolizar una mayor parte de los lípidos polares presentes en los mismos.
- 45 10. Composición para mejorar el pan o composición para mejorar la masa que comprende la enzima lipolítica fúngica según la reivindicación 1.
- 50 11. Composición para mejorar el pan o composición para mejorar la masa según la reivindicación 10 que comprende una exo- o endoamilasa.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 en el que la enzima lipolítica fúngica se utiliza en combinación con una alfa-amilasa.

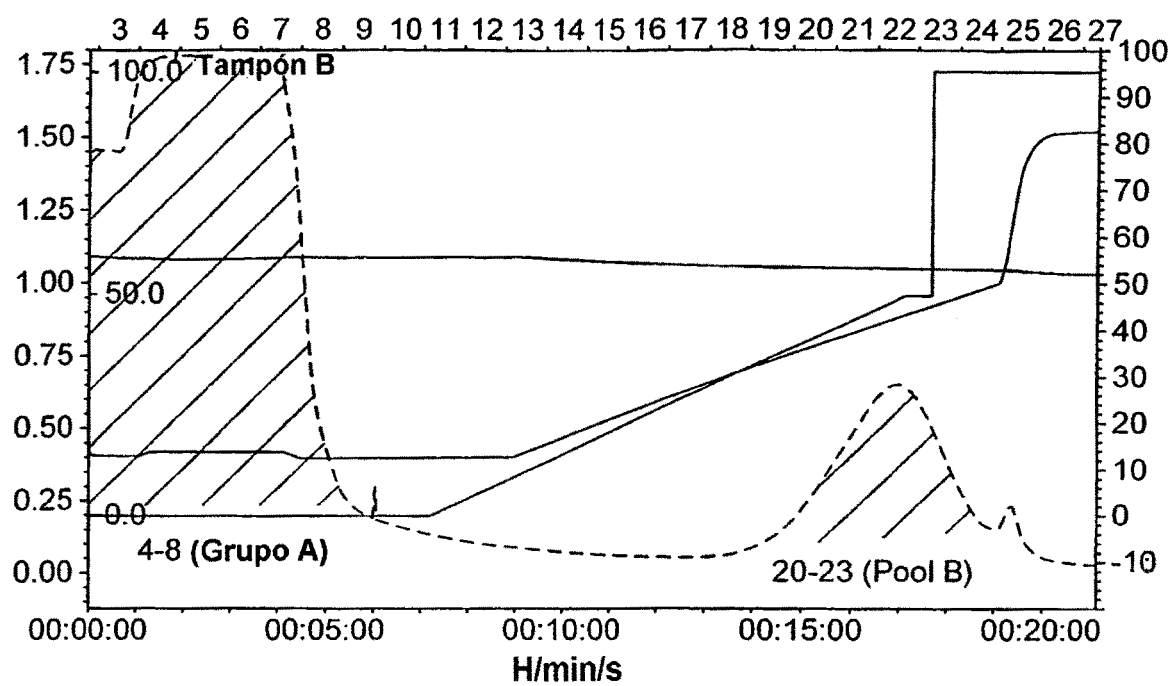


FIG. 1

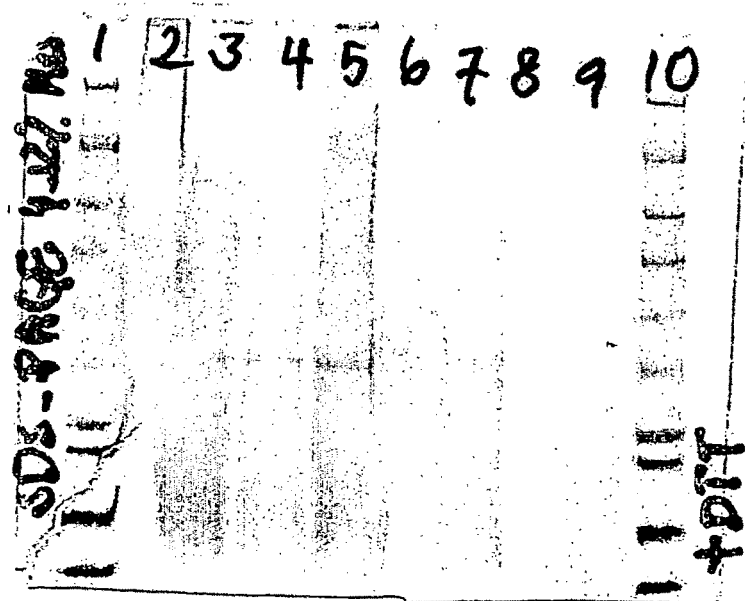


FIG. 2

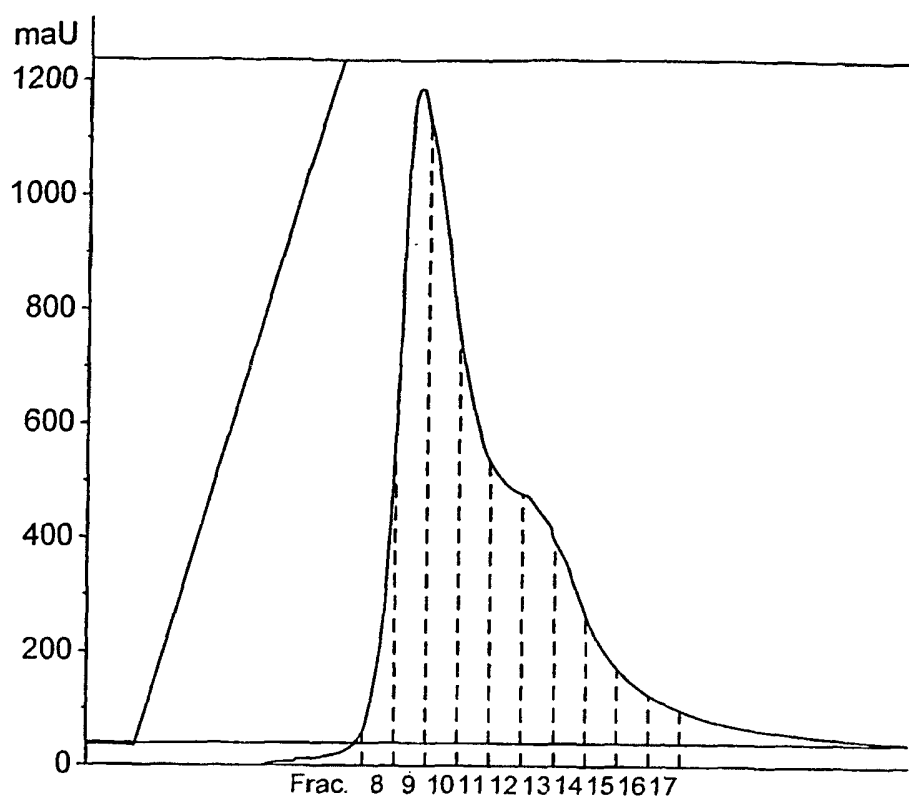


FIG. 3

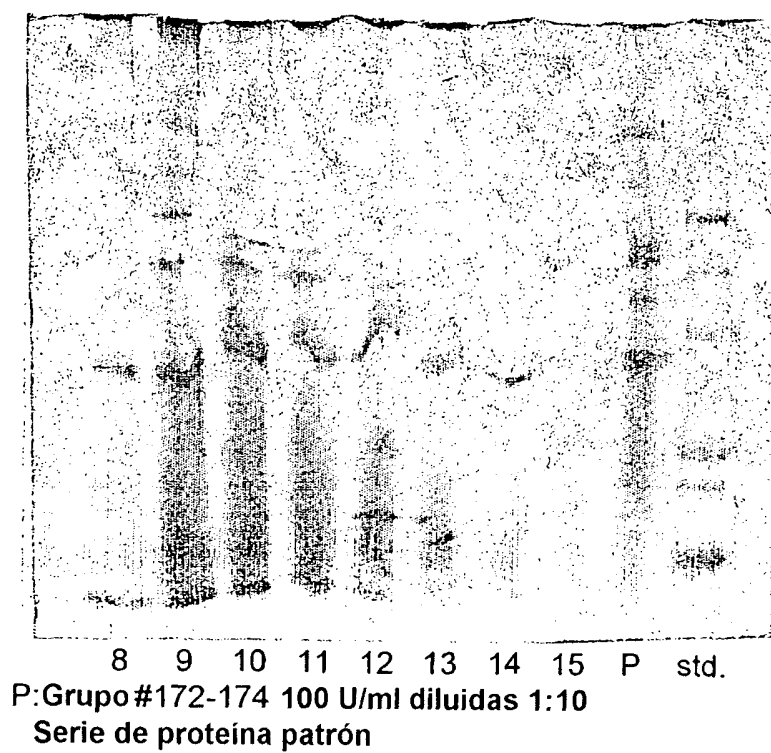


FIG. 4

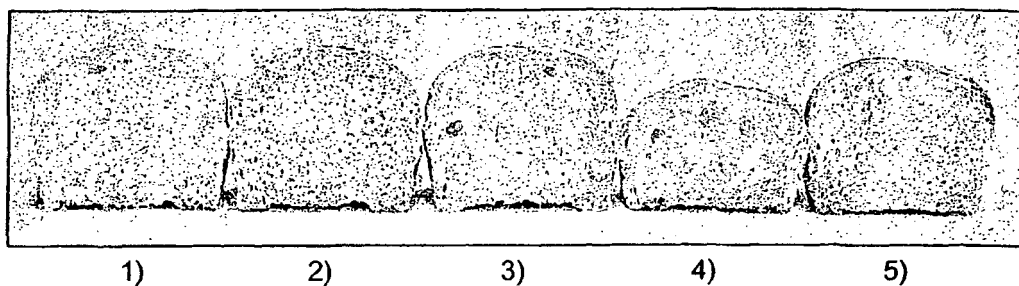


FIG. 5

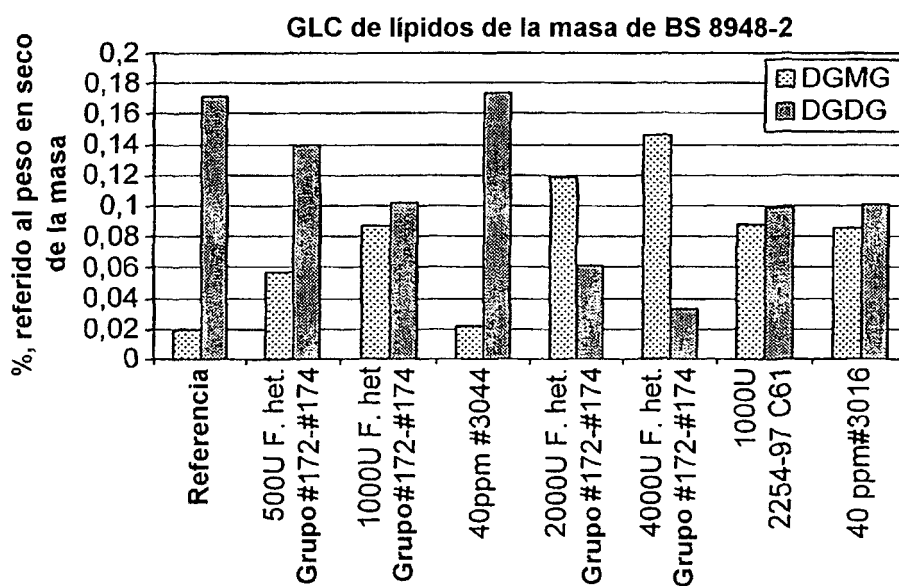


FIG. 6

		1	-----AVGVSTSTDFTNFKFYIQH	50
CBS Peptides	(1)			
F. het-Nagao	(1)	MMLVLSLLSIIAFTAAGFPVPSVDENTRVLEHRAVTVTQDLSNFREYFQH		
			** **.	
		51		100
CBS Peptides	(19)	GAAAYCNSGTAAGAKITCSNNGCPTIESNGVTVVASFTGSKTGIGGYVST		
F. het-Nagao	(51)	ADAAYCNFNENTAVGKPVHCSAGNCPCDIEKDAAIVVGSVVGTGKTGIGAYVAT		
			. **** * *	
		101		150
CBS Peptides	(69)	DSSRKEIVVAIRGSSNIRNLTLNLDQSDCSLVSGCGVHSGFQNAAWAEI		
F. het-Nagao	(101)	DNARKEIVVSVRGSINVRNWITNFENGQKTCDLVACGGVHTGFELDAWEV		
			* .***** * *	
		151		200
CBS Peptides	(119)	SAQASAAMAKARKANPSEKVVATGHSLGGAVATLSAANLRAAGTPVDIYT		
F. het-Nagao	(151)	AANVKAASAAKTANPTTFKFVVTGHSLGGAVATIAAAYLRKDGFFFDLYT		
			.. ***. *. ***** *	
		201		250
CBS Peptides	(169)	YGAPRVGNAAALSAFISNQAGGEFRVTHDKDPVPRLPPLIFGYRHRTPEYW		
F. het-Nagao	(201)	YGPSRVGNDDFANEVTTQTGAERYVTHGDDVPVRLPPPIVFGYRHSPEYW		
			.** *	
		251		300
CBS Peptides	(219)	LSGGGGDKVDYAISDVKVCEGAANLMCNGGTLGLDIDAHHLHYFQATDACN		
F. het-Nagao	(251)	LNGGP-LDKDYTVTEIKVCEGIANVMCNGGTIGLDILAHITYFQSMATCA		
			* ** ** ..*	
		301		334
CBS Peptides	(269)	AGGFSWR-----		
F. het-Nagao	(300)	PIAIPWKRDMSDEELEKKLTQYSEMDQEFVKQMI		
			*	

FIG. 7

```

      M R F P S I F T A V L F A A S S A L A A P V N      23
AATTCAAACGATGAGATTCCCATCCATCTTTACCGCTGTTCGTTCGCCGCTTCCTCCGCCCTGGCTGCCCCAGTCAACA      80
      → alpsynt
T T T E D E T A Q I P A E A V I G Y S D L E G D F D V      50
CTACCACTGAGGACGAGACTGCTCAGATTCCAGCTGAGGCTGTTCATCGGTTACTCTGACCTGGAGGGTGACTTCGATGTT      160

A V L P F S N S T N N G F L F I N T T I A S I A A K E      77
GCTGTTTGGCATTCTCCAACCTCCACCAACAACGGTTTCTTGTTCATCAACACTACCATTGCCTCCATTGCTGCCAAGGA      240

E G V S L D K R A V G V T S T D F T N F K F Y I Q H      103
GGAAGGTGTTCTCTGGACAAGAGAGCCGTTGGAGTGACCTCTACTGACTTCACTAAGTTTAAAGTTCTACATTAGCATG      320
      → alps.cbss
← cbss.alps
G A A A Y C N S G T A A G A K I T C S N N G C P T I E      130
GTGCTGCCGATCTGTAACCTCCGTACCGCCGAGGTGCAAGATCACTTGTTCGAATAACGGTTGCCCTACTATCGAG      400

S N G V T V V A S F T G S K T G I G G Y V S T D S S R      157
TCCAACGGCGTGACTGTGGTCGCCTCCTTCACTGGTTTCAAGACTGGCATCGGCGGTTACGTGTCCACCGATAGCTCGAG      480

K E I V V A I R G S S N I R N W L T N L D F D Q S D      183
AAAAGAGATCGTGGTCGCAATCAGAGGTTCCAGCAACATCCGAATTGGCTGACTAATCTTGACTTTGACCAGTCCGACT      560

C S L V S G C G V H S G F Q N A W A E I S A Q A S A A      210
GTTCCCTTGTTCGGGCTGTGGTGTTCACCTCCGGTTTCCAGAACGCTTGGGCCGAGATCTCCGCACAGGCTCGGCTGCC      640

V A K A R K A N P S F K V V A T G H S L G G A V A T L      237
GTGGCAAAAGCTAGAAAGGCCAACCCATCCTTCAAGGTTGTGCGCACTGGCCACTCGCTCGGCGGCGCTGTGGCGACCT      720

S A A N L R A A G T P V D I Y T Y G A P R V G N A A      263
GTCCGCTGCCAACCTTCGAGCTGCAGGTACTCCAGTCGACATCTACACTTATGGTGCACCTAGAGTTGGCAACGCCGAC      800

L S A F I S N Q A G G E F R V T H D K D P V P R L P P      290
TGTCTGCTTTCATCTCGAACCAAGCAGGCGGTGAATTTAGAGTCACTCAGACAAGGACCCAGTGCTCGGCTTCCACCT      880

L I F G Y R H T T P E Y W L S G G G G D K V D Y A I S      317
CTGATCTTCGGTTACAGACACACTACCCAGAGTACTGGCTGTGAGGTGGCGGCGGAGACAAGGTGGACTACGCAATCTC      960

D V K V C E G A A N L M C N G G T L G L D I D A H L      343
CGACGTGAAGGTCTGCGAGGGAGCCGCAACCTCATGTGTAAACGGCGGTACTGGGACTGGACATCGACGCACACTTGC      1040

H Y F Q A T D A C N A G G F S W R      360
ACTACTTCCAGGCACTGATGCTTGCAACGCCGAGGTTTCTCTGGAGATAGGCCATGGAGAGAATTGGATCCT      1115
      ← cbss.t

```

FIG. 8

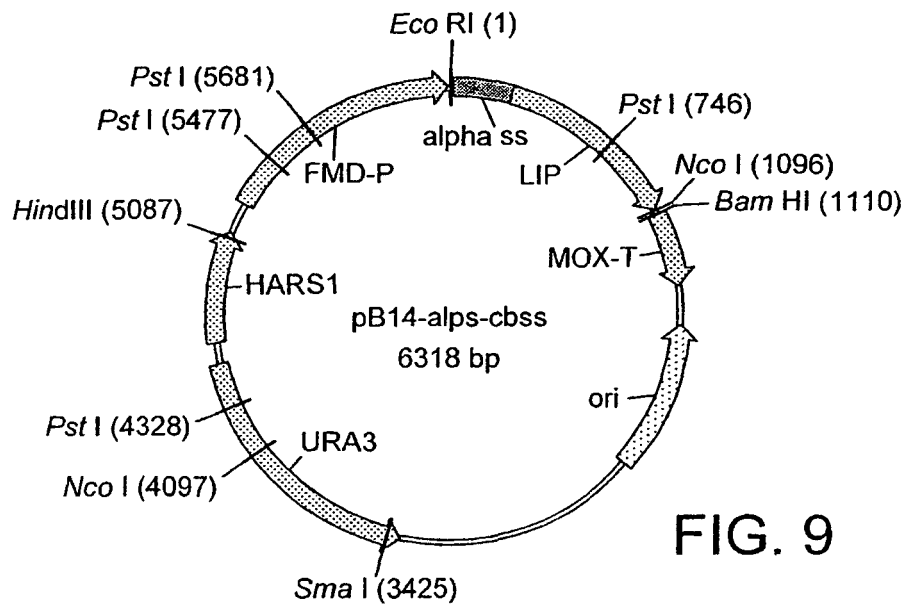


FIG. 9

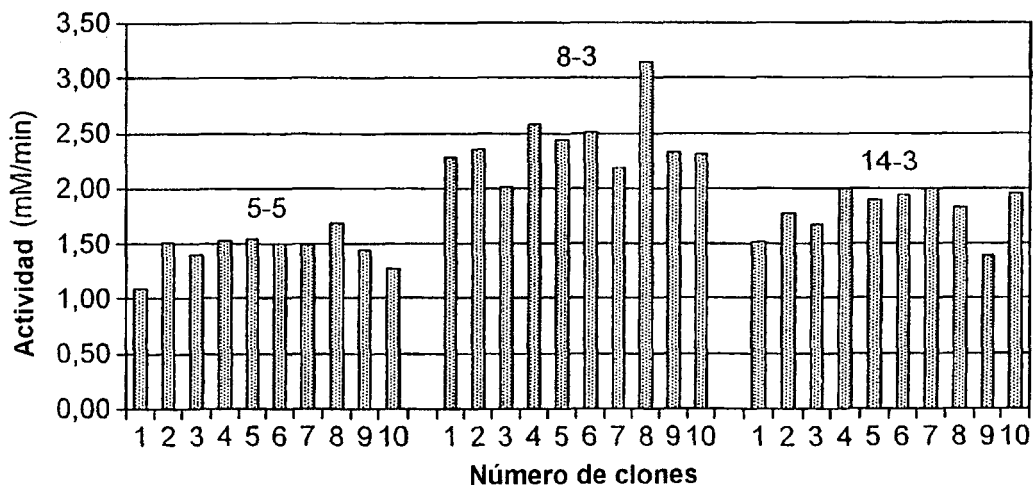


FIG. 10

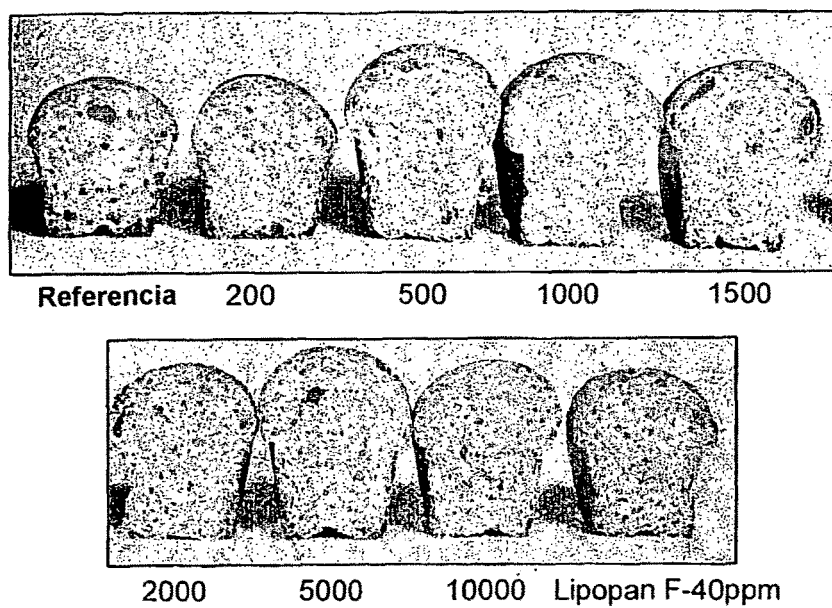


FIG. 11

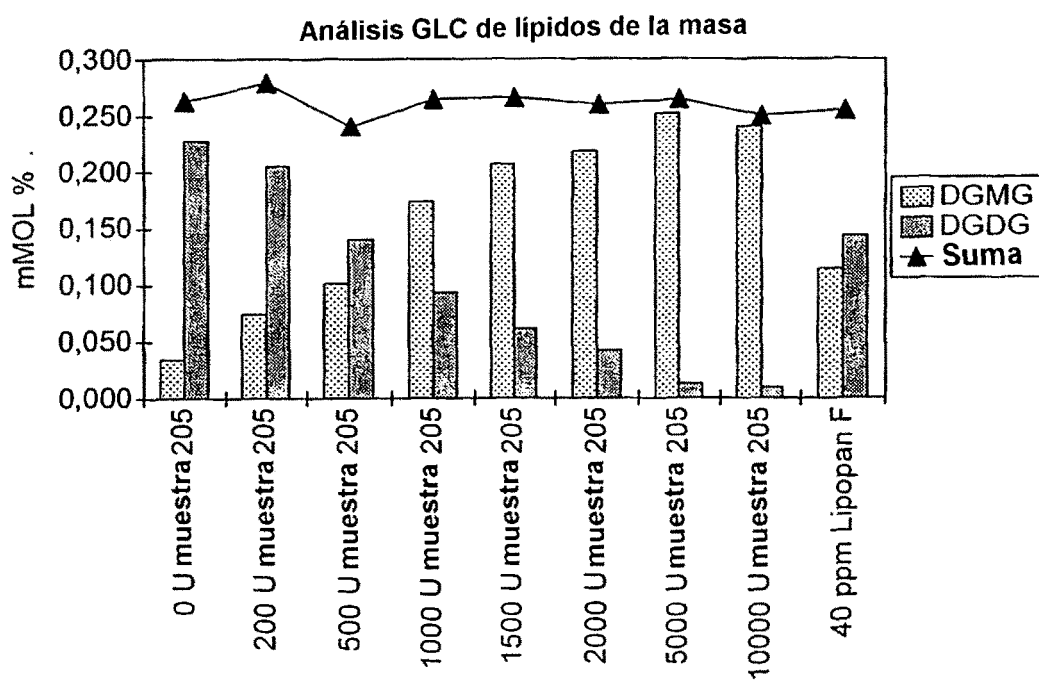


FIG. 12

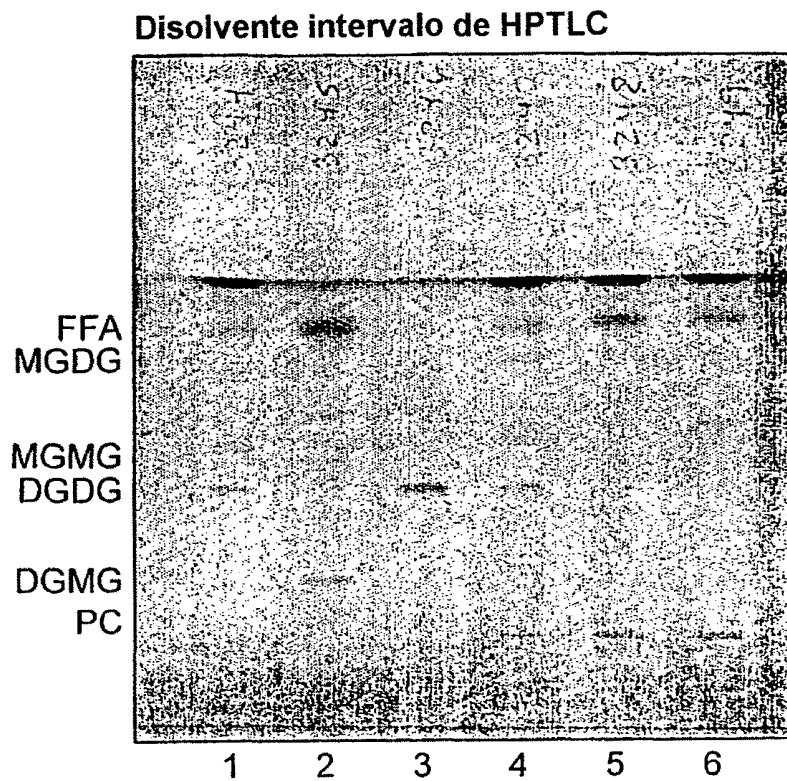


FIG. 13

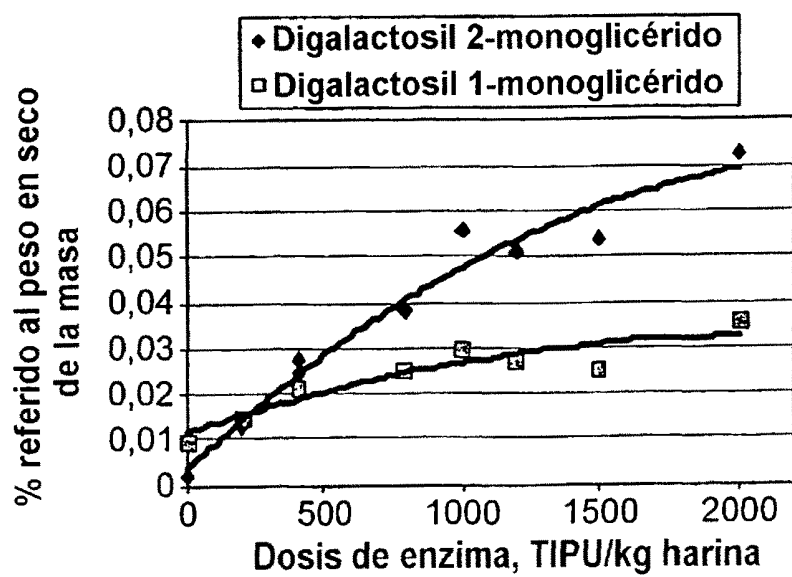


FIG. 14

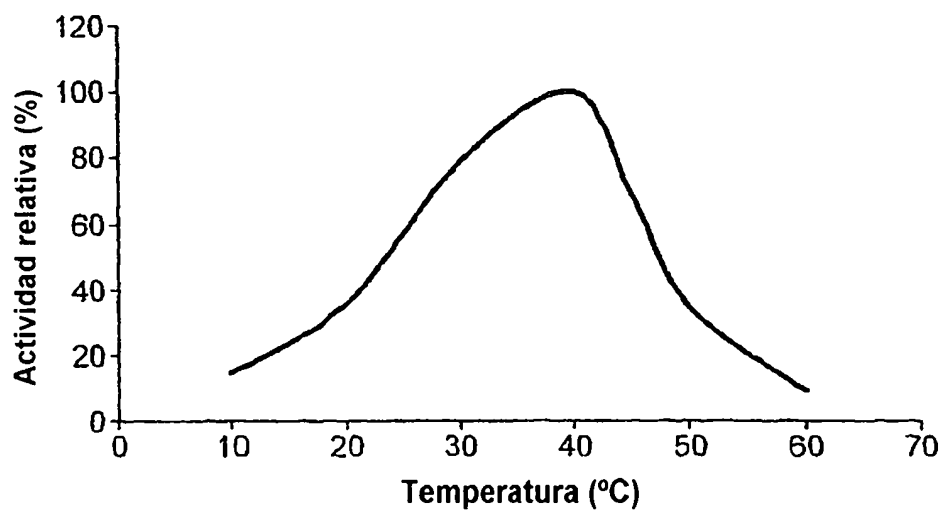


FIG. 15

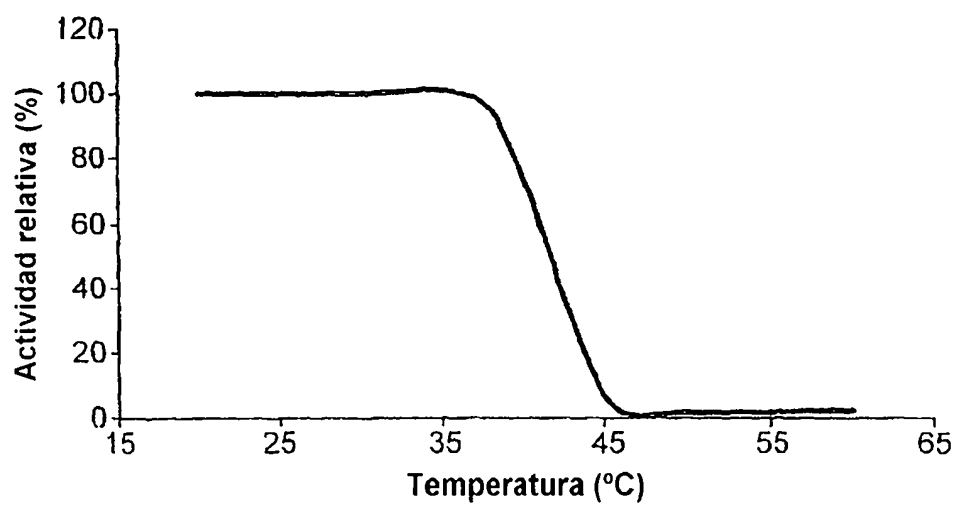


FIG. 16

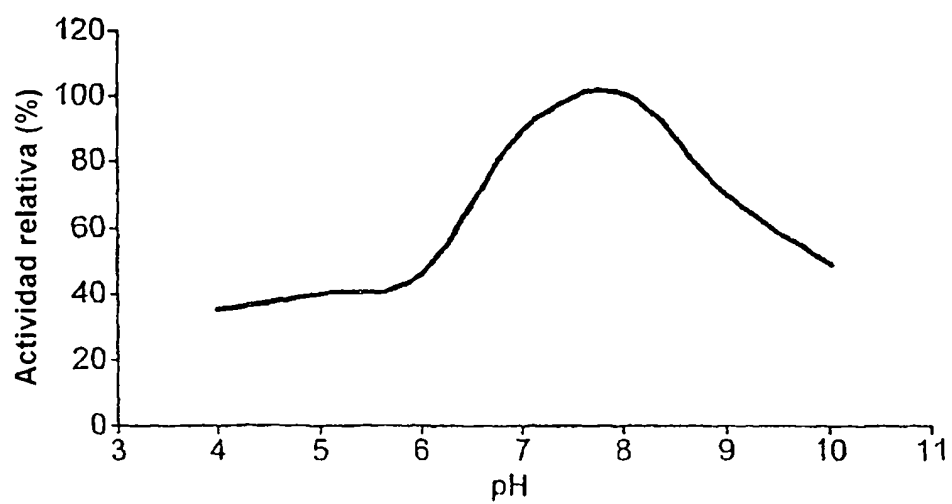


FIG. 17

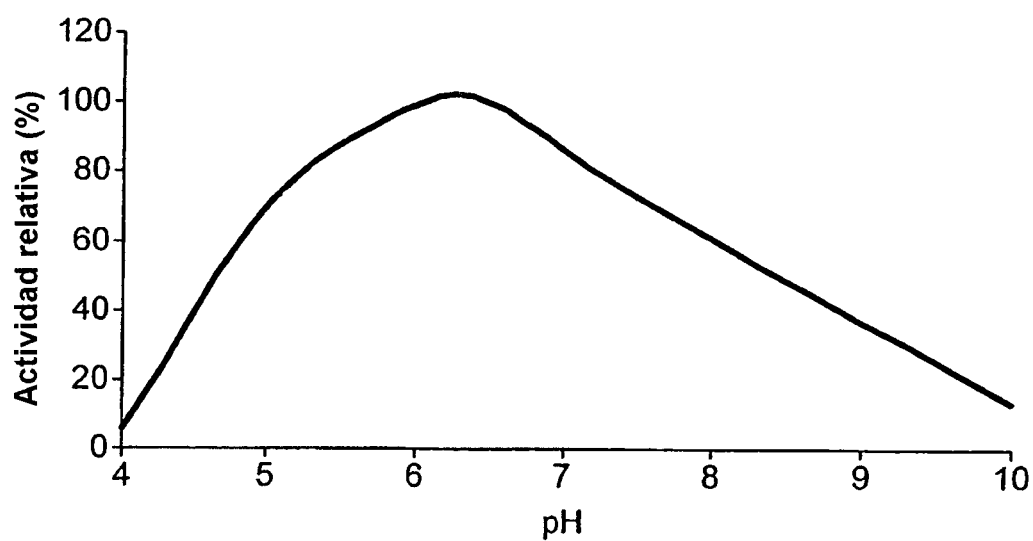


FIG. 18

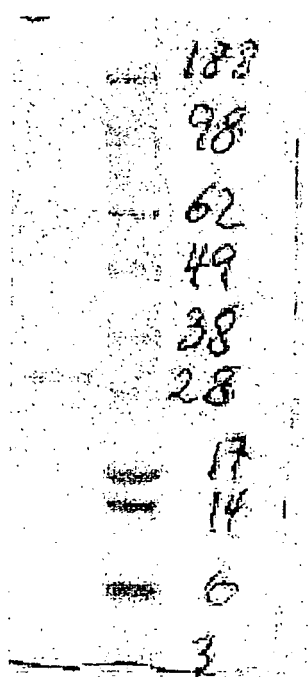


FIG. 19a

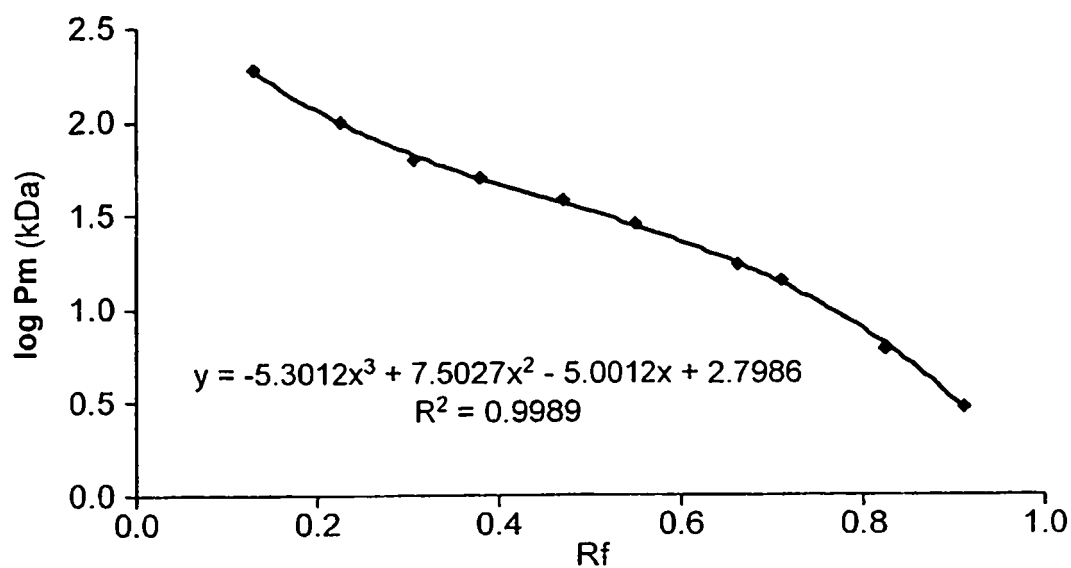


FIG. 19b

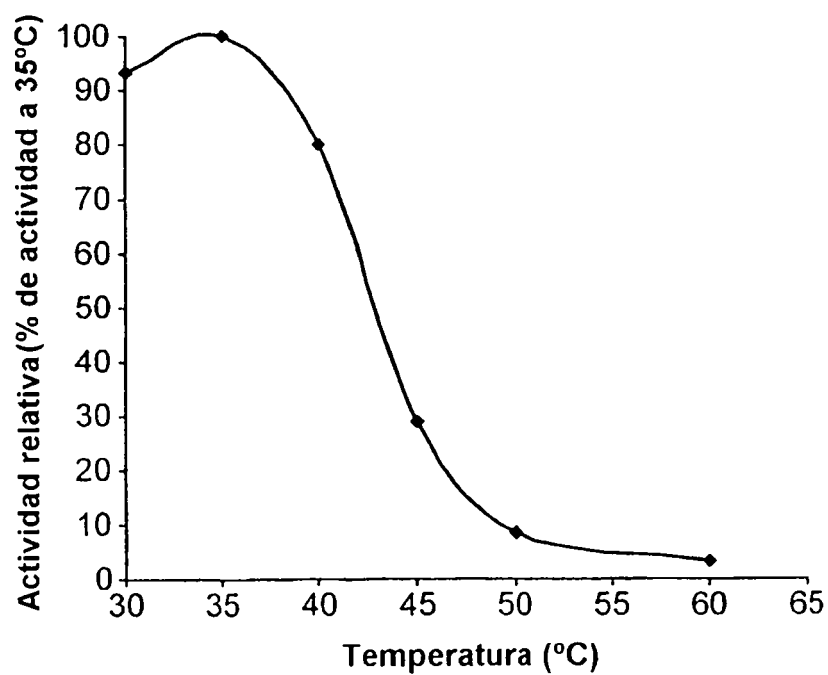


FIG. 20

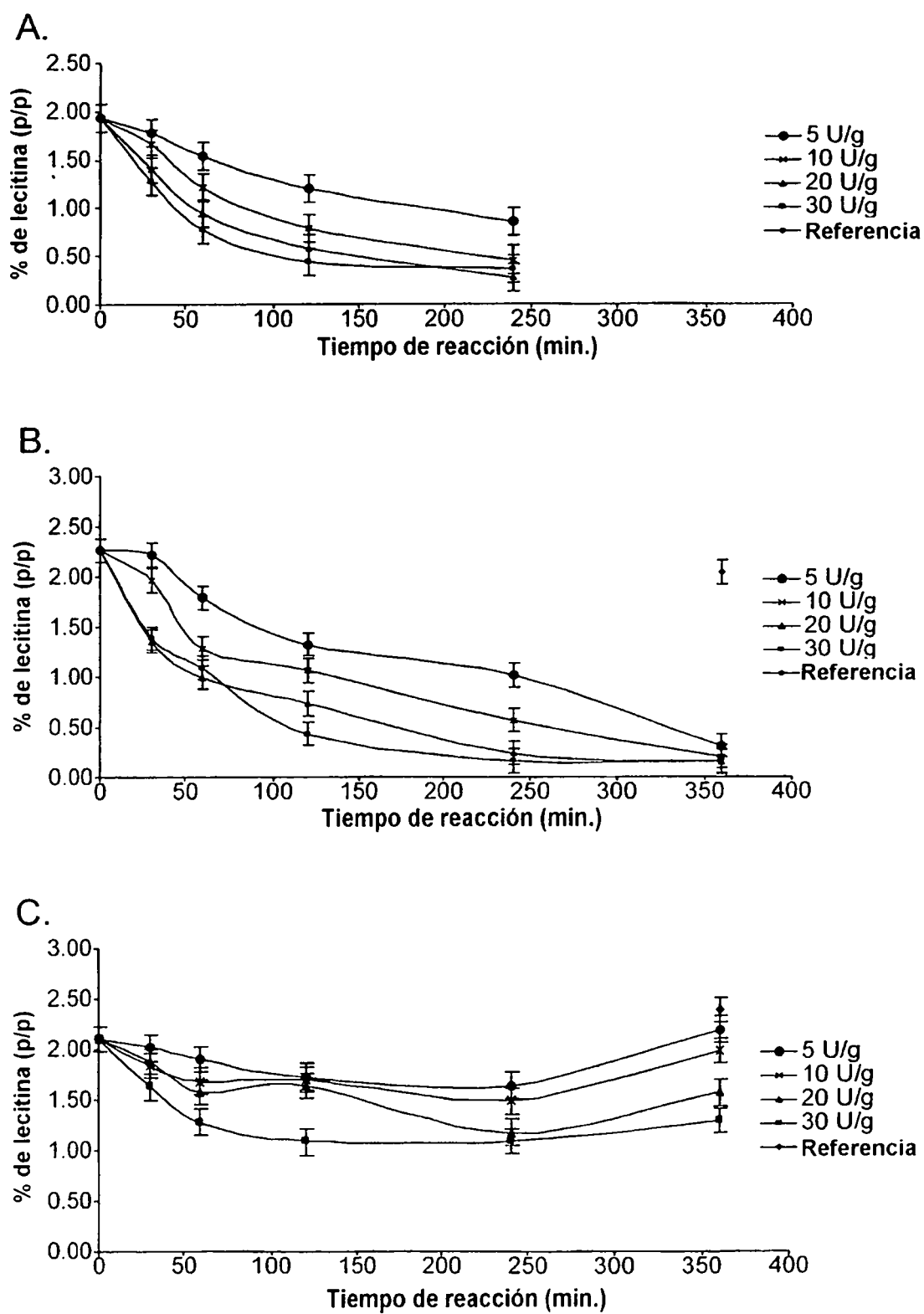


FIG. 21

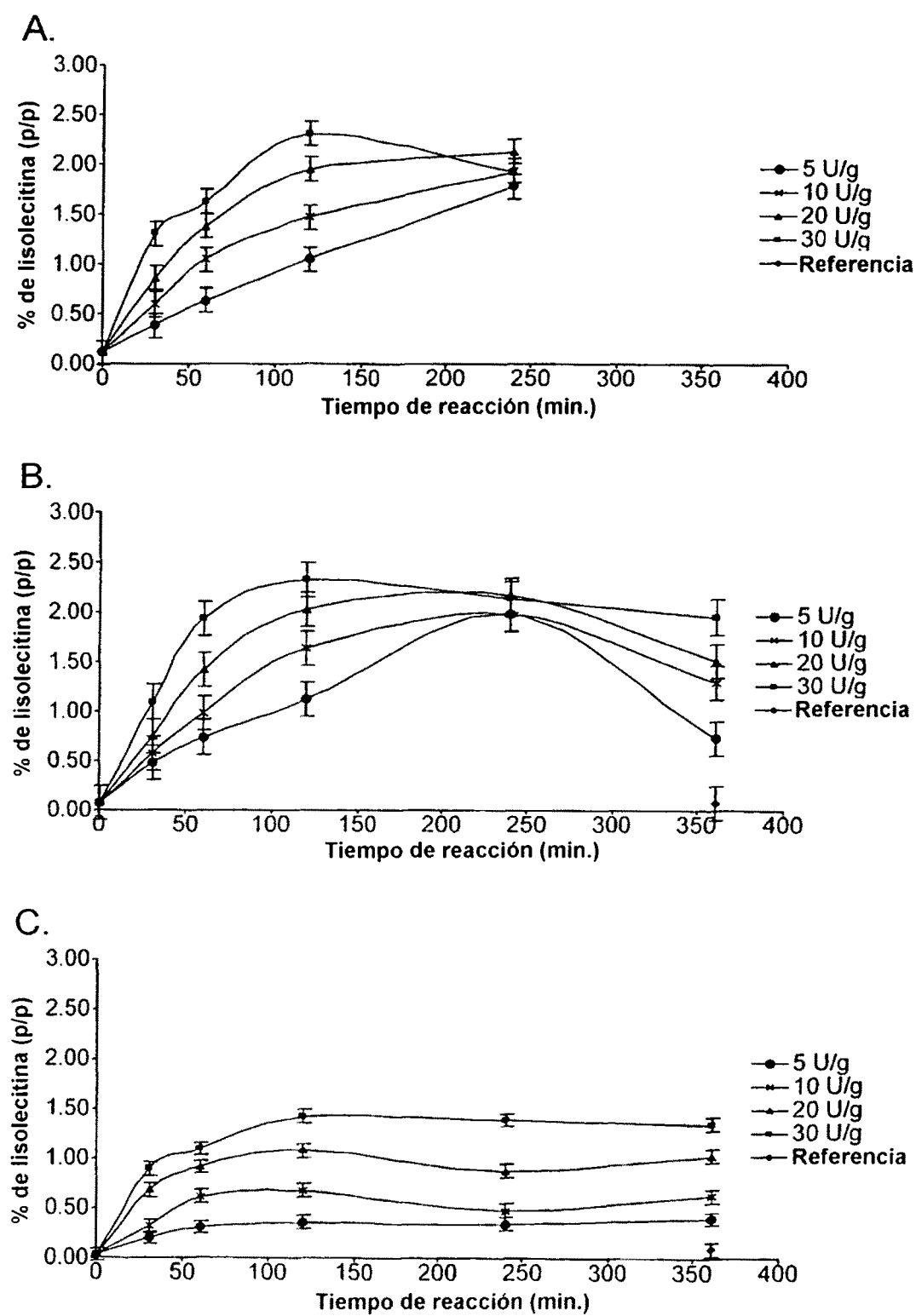


FIG. 22

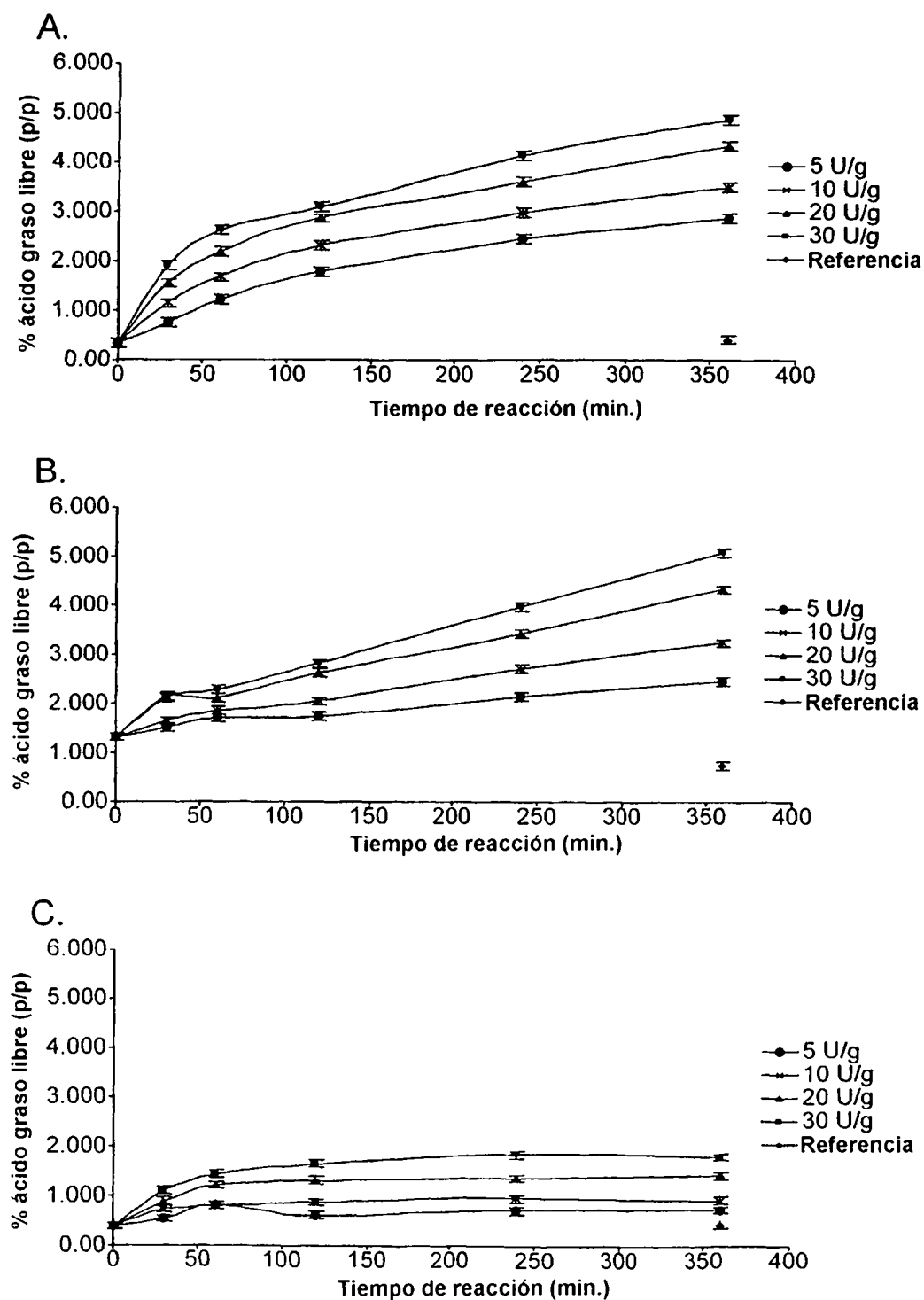


FIG. 23

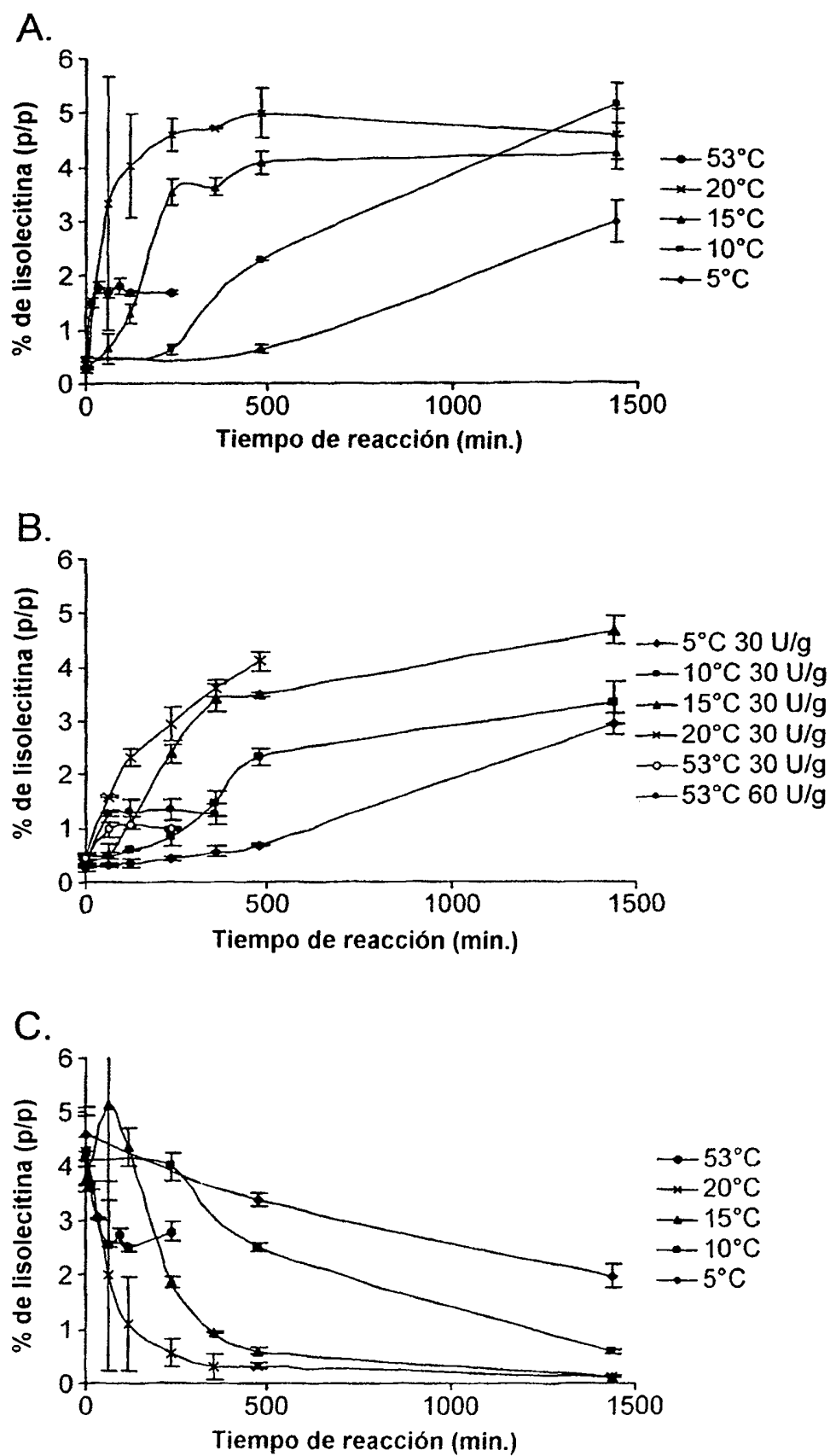


FIG. 24

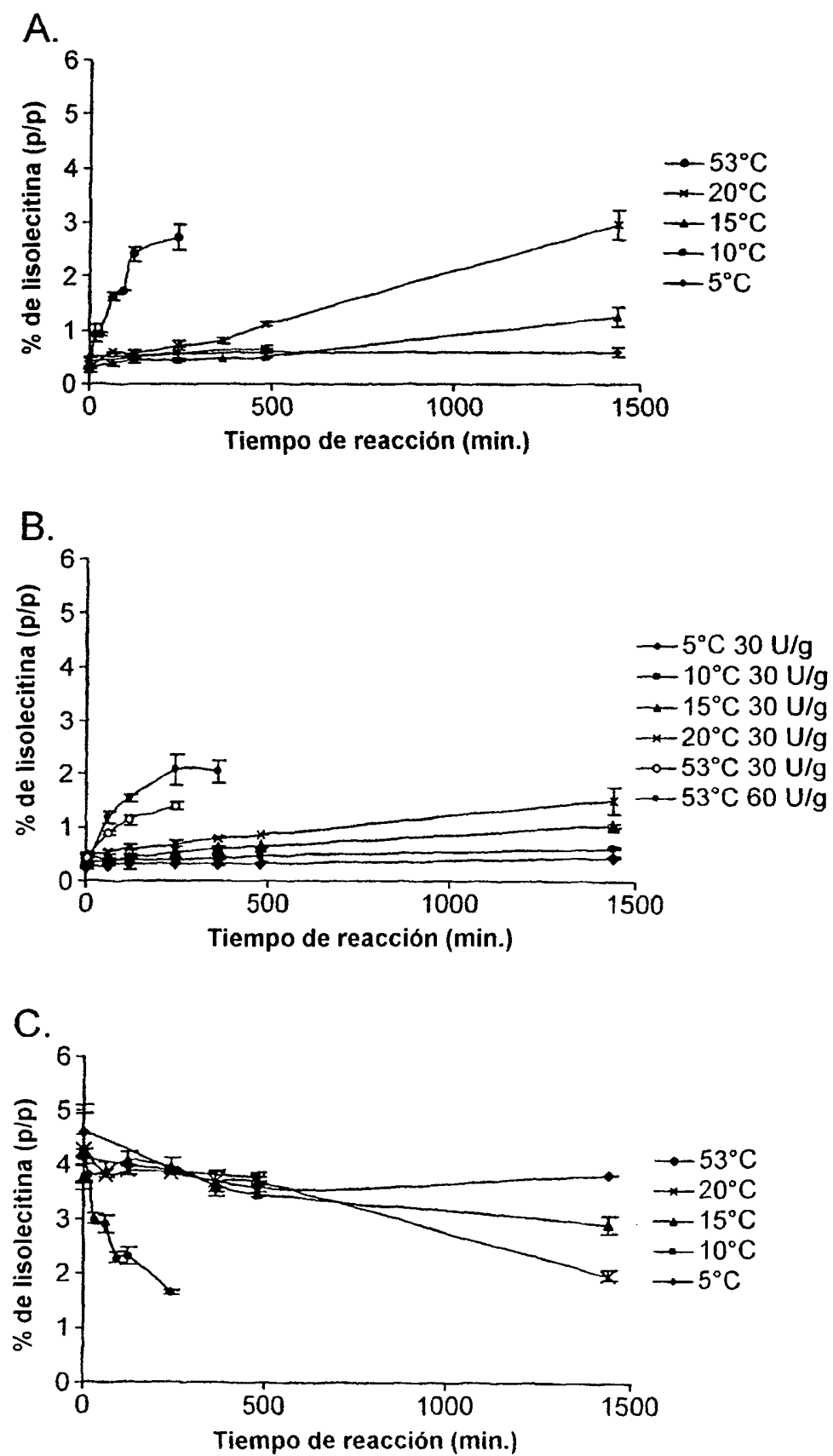


FIG. 25

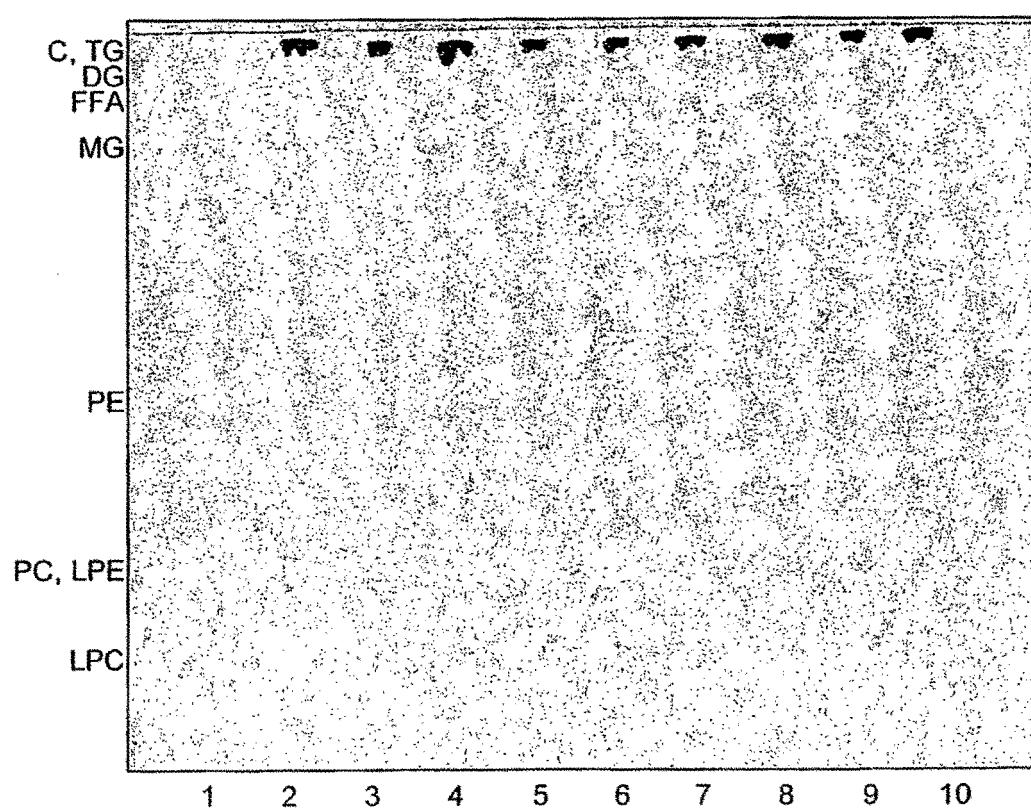


FIG. 26

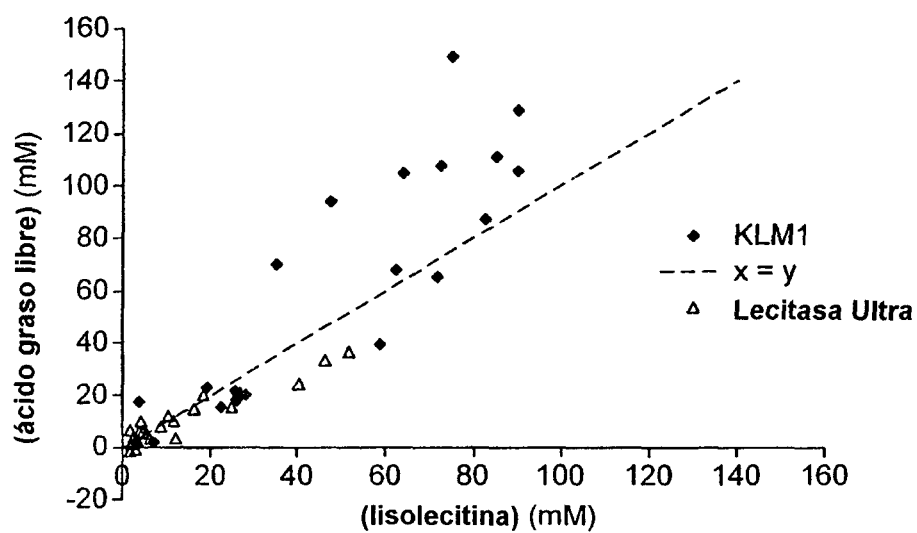


FIG. 27

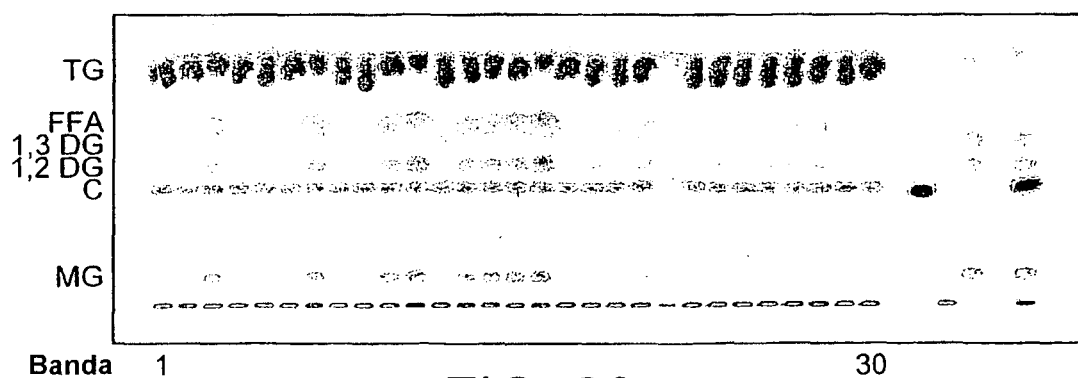


FIG. 28

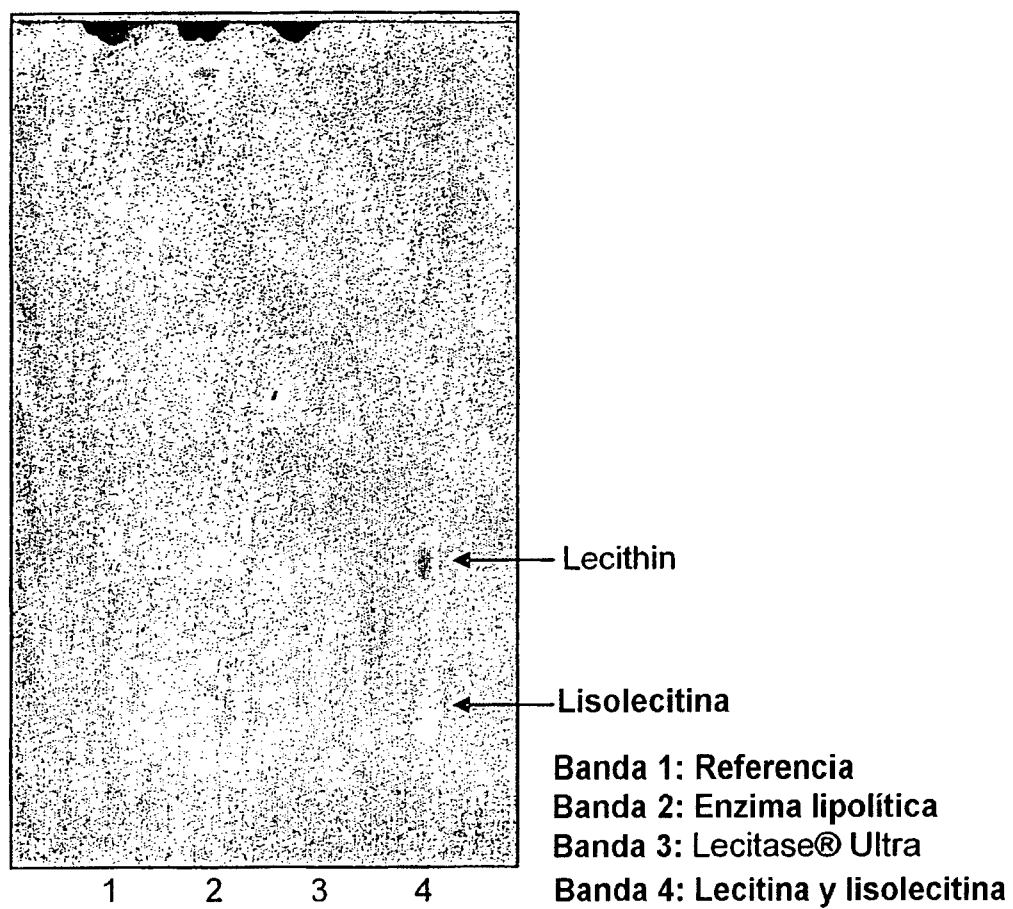
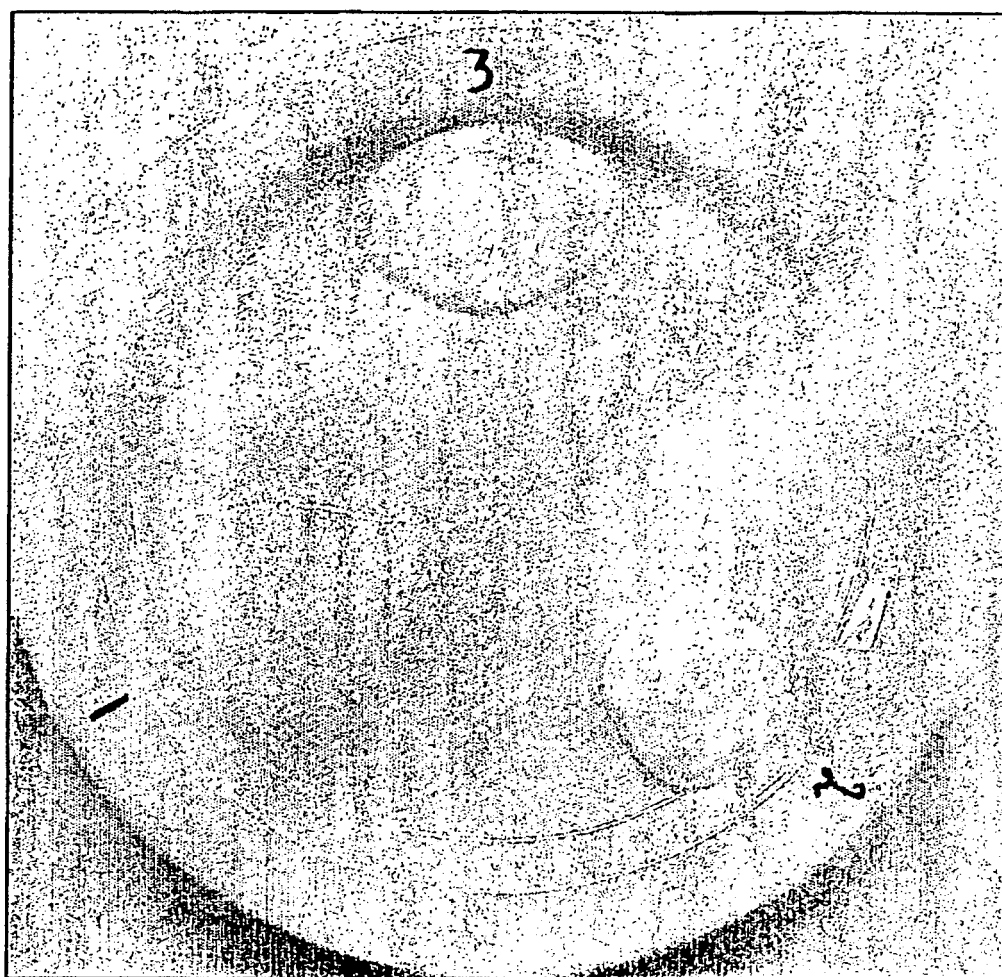


FIG. 29



1. Referencia
2. Enzima lipolítica
3. Lecitase® Ultra

FIG. 30

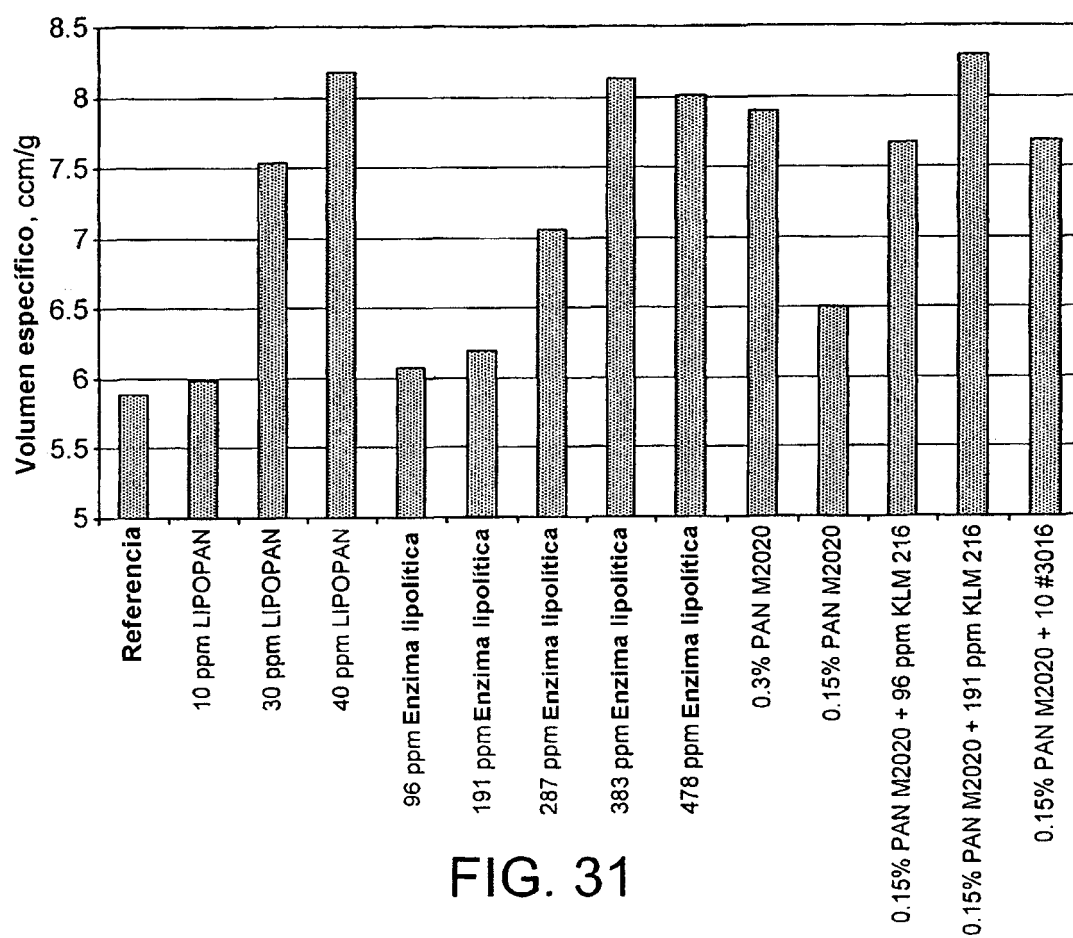


FIG. 31

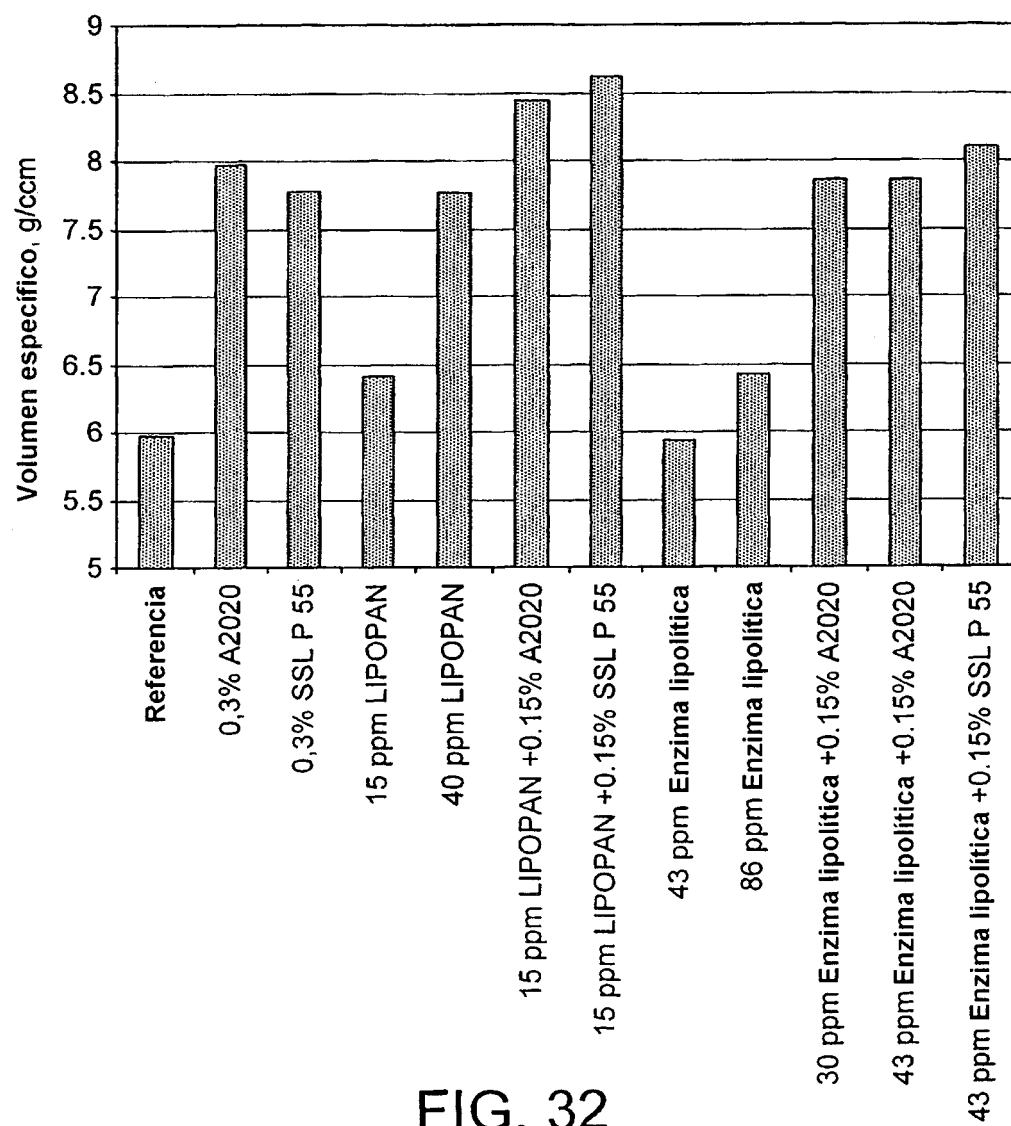


FIG. 32

```

GGGGGGGATATCTTCGCCAGTTTCAGTGTTCAAGTATCCTTTCTGAGGGAGTCGCACTTGTACAGCTTGTCTATCACTTA 80
      M R V L S L L S V A T F A V A S P 17
TACCCTTGATCCATACCCCTTGCCCTGTCAAGATGCGTGTCTCTCACTCCTCTCAGTTGCCACCTTTGCTGTGGCCAGTCC 160
      L S V E D Y A K A L D E R A V A V S N G D F G N F K 43
TCTGAGCGTAGAGGACTACGCCAAGGCTCTCGATGAAAGAGCTGTTGCTGTCTCCAACGGTGACTTTGGTAACCTCAAGT 240
      F Y I Q H G A A S Y C N S N A A A G A K I T C G N N G 70
TCTACATCCAGCACGGTGCTGCTTCATACTGCAACTCCAATGCCGCAGCTGGTGCAAAGATCACCTGTGGAAACAATGGC 320
      C P T V Q S N G A T I V A S F T G S K T G I G G Y V S 97
TGTCCAACAGTCCAGTCCAACGGTGCTACTATCGTCGCATCCTTCACTGGTTCCAAGACTGGCATCGGCGGTTACGTTTC 400
      T D S S R K E I V L S V R G S I N I R N W L T N L D 123
GACCGACTCTTCACGAAAGGAAATCGTCTCTCCGTTTCGAGGCAGCATAAACATTTCGAAACTGGGCTCACCAACCTCGACT 480
      F G Q E D C S L T S G C G V H S G F Q N A W K E I S A 150
TCGGCCAGGAGGACTGCAGCTTGACCTCAGGTTGTGGAGTACACAGCGGTTTCCAGAATGCCCTGGAAAGAGATTTCGCT 560
      A A T A A V A K A R K A N P S F K V I A T G H S L G G 177
GCAGCAACCGTGCTGTGCGAAAGGCCGCAAGGCGAACCCTTCGTTCAAGGTCATTGCCACAGGCCACTCCCTTGGTGG 640
      A V A T L A G A N L R V G G T P V D I Y T Y G S P R 203
TGCCGTGCTACACTCGCCGGGCGCAAATCTTCGAGTTGGTGAAACCCGTTGACATCTACACCTACGGCTCCCCCGAG 720
      V G N S Q L A G F I S N Q A G G E F R V T N A K D P V 230
TTGGAAACTCCCAGCTCGCTGGCTTCATCTCGAACCAAGCTGGTGGAGAGTTCCGCGTTACCAATGCCAAGGACCTGTT 800
      P R L P P L V F G Y R H T S P E Y W L S G A G G D K V 257
CCCAGACTTCCCCCTCTGGTCTTTGGTTACCGACACACATCCCCGAGTACTGGCTGTCTGGTGCGGGAGGTGACAAGGT 880
      D Y T I N D I K V C E G A A N L K C N G G T L G L D 283
TGACTACACCATCAATGACATCAAGTCTGTGAGGGTGTGCCAACCTCAAGTGCAACGGTGGAACCTTGGATTGGATA 960
      I D A H L H Y F Q E T D A C S G G G I S W R S R R Y R 310
TTGATGCTCACCTGCACTACTTCCAGGAGACTGATGCTTGCTCTGGTGGCGGTATCTCTTGGAGAAGCCGAAGATACAGA 1040
      S A K R E D I S E R A A P M T D A E L E K K L N N Y V 337
AGCGCCAAGCGTGAGGACATCTCTGAGAGGGCTGCTCCTATGACGGATGCTGAGCTTGAGAAGAAGCTCAACAACATATGT 1120
      E M D K E Y V K N N A A R T S 352
CGAGATGGATAAGGAGTATGTCAAGAACAAATGCCGCACGCACGTATAGTATGACATTTACGCAGTAATGATATACCAG 1200
AATAATAAGAATCACAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAA 1236

```

FIG. 33

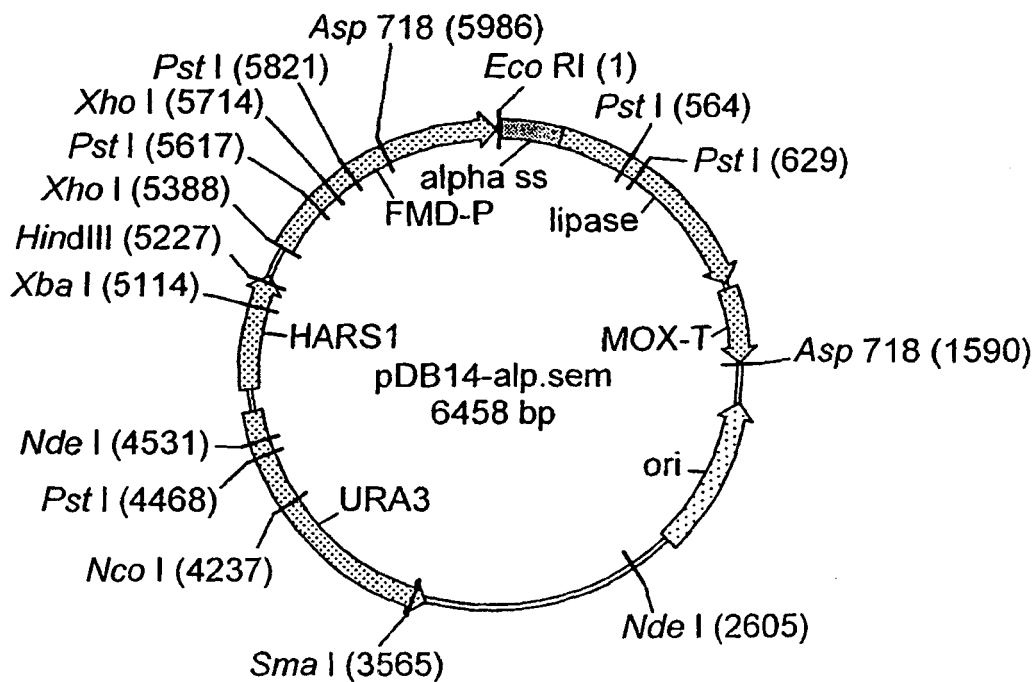


FIG. 34

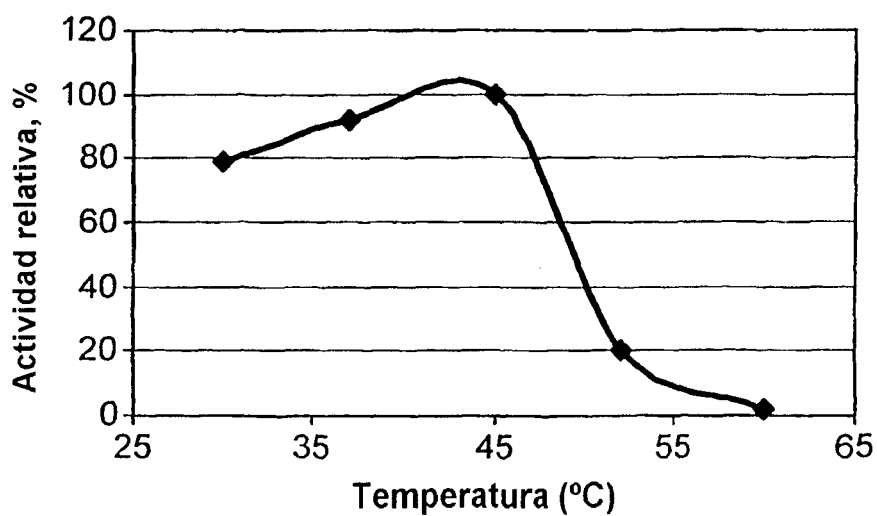


FIG. 35

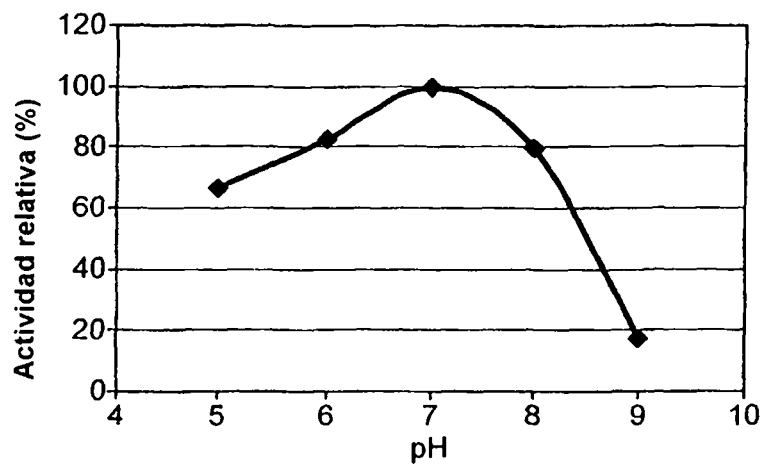


FIG. 36

(SEC ID No. 1)

```

1  avgvststdft nfkfyiqhga aaycnsghaa gakitcsnng cptiesngvt vvasftgskt
61  giggyvstds srkeivvair gssnirnwlt nldfdqsdcs lvsgcgvhsg fqnaaeisa
121 qasaavakar kanpsfkvva tghslggava tlsaanelraa gtpvdiytyg aprvgnaals
181 afisnqagge frvthdkdpv prlpplifgy rhttpewls ggggdkvdya isdvkvcega
241 anlmcnggtl gldidahlhy fqatdacnag gfswr

```

FIG. 37

(SEC ID No. 2)

```

1  mrfpsiftav lfaassalaa pvnttttedet agipaeavig ysdlegdfdv avlpfsnsth
61  ngflfintti asiaakeeqv sldkravgvt stdftnfkfy iqhgaaaycn sgtaagakit
121 csnnqcptie sngvtvvasf tgsktgiggy vstdssrkei vvairgssni rnwltndldfd
181 qsdcslvsgc gvhsqfqnaw aeisaqasaa vakarkanps fkvvatghsl ggavatlsaa
241 nlraagtpvd iytygaprvq naalsafisn qaggefrvth dkdvpvrlpp lifgyrhttp
301 eywlsggggd kvdyaisdvk vcegaanlmc nggtlgldid ahlhyfqatd acnaggfswr
361 *

```

FIG. 38

(SEC ID No. 3)

```

1 gccgttggag tgacctctac tgacttcaact aactttaagt tctacattca gcatggtgct
61 gccgcatact gtaactccgg taccgccgca ggtgcaaaga tcacttggtc gaataacggt
121 tgccctacta tcgagtccaa cggcgtgact gtggtcgccct ccttcactgg ttcgaagact
181 ggcatcggcg gttacgtgtc caccgatagc tcgagaaaag agatcgtggt cgcaatcaga
241 ggttccagca acatccggaa ttggctgact aatcttgact ttgaccagtc cgactgttcc
301 cttgtttcgg gctgtggtgt tcactccggt ttccagaacg cttgggccga gatctccgca
361 caggcctcgg ctgccgtggc aaaagctaga aaggccaacc catccttcaa ggttgctcgc
421 actggccact cgctcggcgg cgctgtggcg accctgtccg ctgccaacct tcgagctgca
481 ggtactccag tcgacatcta cacttatggt gcacctagag ttggcaacgc cgcactgtct
541 gctttcatct cgaaccaagc aggcggtgaa tttagagtca ctacgcacaa ggaccagtg
601 cctcggcttc caccctctgat cttcgggttac agacacacta cccagagta ctggctgtca
661 ggtggcggcg gagacaaggt ggactacgca atctccgacg tgaaggctct cgagggagcc
721 gcaaacctca tgtgtaacgg cggtacactg ggactggaca tcgacgcaca cttgcactac
781 ttccaggcaa ctgatgcttg caacgccgga ggtttctcct ggaga

```

FIG. 39

(SEC ID No. 4)

```

1 MRVLSLLSVA TFAVASPLSV EDYAKALDER AVAVSNGDFG NFKFYIQHGA ASYCNSNAAA
61 GAKITCGNNG CPTVQSNMAT IVASFTGSKT GIGGYVSTDG SRKEIVLSVR GSINIRNWL
121 NLDGQEDCS LTSGCGVHSG FQNAWKEISA AATAAVAKAR KANPSFKVIA TGHSLGGAVA
181 TLAGANLRVG GTFVDIYTYG SPRVGNSQLA GFISNQAGGE FRVTNAKDPV PRLPPLVFGY
241 RHTSPEYWLS GAGGDKVDYT INDIKVCEGA ANLKCNGGTL GLDIDAHLY FQETDACSGG
301 GISWRSRRYR SAKREDISER AAPMTDAELE KKLNNYVEMD KEYVRKNNAAR TS

```

FIG. 40

(SEC ID No. 5)

```

1  ggggggggata  tcttcggccag  tttcagtggt  cagtatcctt  tctgagggag  tcgcacttgt
61  cacagcttgt  ctatcactta  tacccttgat  ccataccott  gcctgtcaag  atgcgtgtcc
121  tgteactcct  ctcagttgcc  acctttgctg  tggccagtcc  tctgagcgta  gaggactacg
181  ccaaggtctc  cgatgaaaga  gctgttgctg  tctccaacgg  tgactttggt  aacttcaagt
241  tctacatcca  gcacggtgct  gcttcatact  gcaactccaa  tgccgcagct  ggtgcaaaga
301  tcacctgtgg  aaacaatggc  tgtccaacag  tccagtccaa  cggtgctact  atcgtcgcat
361  ccttcactgg  ttccaagact  ggcacggcg  gttacgtttc  gaccgactct  tcacgaaagg
421  aaatcgtect  ctccgttcga  ggcagcataa  acattcgaaa  ctggctcacc  aacctcgact
481  tcggccagga  ggactgcagc  ttgacctcag  gttgtggagt  acacagcggt  ttccagaatg
541  cctggaaaga  gatttccgct  gcagcaaccg  ctgctgtcgc  aaaggcccgc  aaggcgaacc
601  cttcgttcaa  ggtcattgcc  acaggccact  ccttggtgg  tgccgtcgct  acactcgccg
661  gcgcaaactc  tcgagttggt  ggaacacccg  ttgacatcta  cacctacggc  tcccccgag
721  ttggaaactc  ccagctcgct  ggcttcactc  cgaaccaagc  tgggtggagag  ttccgcgtta
781  ccaatgccaa  ggacctgtt  cccagacttc  cccctctggt  ctttggttac  cgacacacat
841  cccccgagta  ctggctgtct  ggtgcgggag  gtgacaaggt  tgactacacc  atcaatgaca
901  tcaaggtctg  tgaggtgct  gccaaacctc  agtgcaacgg  tggaaacctt  ggattggata
961  ttgatgctca  cctgcactac  ttccaggaga  ctgatgcttg  ctctggtggc  ggtatctctt
1021  ggagaagccg  aagatacaga  agcgccaagc  gtgaggacat  ctctgagagg  gctgctccta
1081  tgacggatgc  tgagcttgag  aagaagctca  acaactatgt  cgagatggat  aaggagtatg
1141  tcaagaacaa  tgccgcacgc  acgtcatagt  atgacattta  cgcagtaatg  atataccacg
1201  aataataaga  atcacaaaat  aaaaaaaaaa  aaaaaa

```

FIG. 41

(SEC ID No. 6)

```

1  EAEEAVGVTS  TDFTNFKFYI  QHGAAAYCNS  GTAAGAKITC  SNNGCPTIES
51  NGVTTVVASFT  GSKTGIGGYV  STDSSRKEIV  VAIRGSSNIR  NWLTNLDQDQ
101  SDCSLVSGCG  VHSGFQNAWA  EISAQASAAV  AKARKANPSF  KVVATGHSLG
151  GAVATLSAAN  LRAAGTPVDI  YTYGAPRVGN  AALSAFISNQ  AGGEFRVTHD
201  KDPVPRLPPL  IFGYRHTTPE  YWLSGGGGDK  VDYAISDVKV  CEGEANLMCN
251  GGTGLGLDIDA  HLHYFQATDA  CNAGGFSWR

```

FIG. 42

(SEC ID No. 7)

```

1  agaattcaaa cgatgagatt cccatccatc ttaccgctg ttctgttcgc cgcttccctcc
61  gccctggctg ccccgagtcaa cactaccact gaggacgaga ctgctcagat tccagctgag
121 gctgtcatcg gttactctga cctggagggt gacttcgatg ttgctgtttt gccattctcc
181 aactccacca acaacgggtt cttgttcatc aacactacca ttgcctccat tgctgccaag
241 gaggaagggtg tttccttgga caagagagct gttgctgtct ccaacgggtga ctttggtaac
301 ttcaagttct acatccagca cgggtgctgct tcatactgca actccaatgc cgcagctggt
361 gcaaagatca cctgtggaaa caatggctgt ccaacagtcc agtccaacgg tgctactatc
421 gtcgcatoot tcaactggtc caagactggc atcggcggtt acgtttcgac cgactcttca
481 cgaaaggaaa tcgtcctctc cgttcgaggc agcataaaca ttcgaaactg gctcaccaac
541 ctcgacttog gccaggagga ctgcagcttg acctcaggtt gtggagtaca cagcggtttc
601 cagaatgcct ggaaagagat ttccgctgca gcaacgctg ctgtcgcaaa ggcccgcaag
661 gcgaaccott cgttcaagggt cattgccaca ggccactccc ttggtggtgc cgtcgctaca
721 ctgcgcggcg caaatcttcg agttggtgga acacccgttg acatctacac ctacggctcc
781 ccccgagttg gaaactccca gctcgctggc ttcatctcga accaagctgg tggagagttc
841 cgcgttacca atgccaaagg ccctgttccc agacttcccc ctctggtctt tggttaccga
901 cacacatccc ccgagtactg gctgtctggt gcgggagggtg acaagggtga ctacaccatc
961 aatgacatca aggtctgtga ggggtgctgc aacctcaagt gcaacgggtg aacccttgga
1021 ttggatattg atgtcacct gcactacttc caggagactg atgcttgctc tgggtggcgt
1081 atctcttgga gaagccgaag atacagaagc gccaaagcgtg aggacatctc tgagagggtc
1141 gctcctatga cggatgctga gcttgagaag aagctcaaca actatgtcga gatggataag
1201 gagtatgtca agaacaatgc cgcacgcacg tcatagtatg acatttacgc ggatcct

```

FIG. 43