



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 897**

51 Int. Cl.:
A21D 8/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02751462 .9**

86 Fecha de presentación : **17.05.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1387616**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **11.02.2004**

54 Título: **Procedimiento para la preparación de una masa con una enzima.**

30 Prioridad: **18.05.2001 GB 0112226**
09.01.2002 US 347007 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

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

72 Inventor/es: **Bojsen, Kirsten;**
Poulsen, Charlotte, Horsmans y
Søe, Jørn, Borch

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 284 897 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la preparación de una masa con una enzima.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la preparación de masas y de productos a base de masa de harina y, en especial, pero no exclusivamente, para mejorar la consistencia y la maquinabilidad de las masas, y el volumen, la blandura y la estructura de la miga de pan y de otros productos de panadería.

10 **Antecedentes de la técnica**

En la industria alimentaria son muy utilizados los aditivos para mejorar la calidad del producto alimenticio. Uno de los aditivos alimentarios más utilizados es el emulsionante y en especial el monoglicérido.

15 El monoglicérido se produjo al principio como una mezcla de mono-, di- y triglicéridos. Sin embargo, se desarrolló posteriormente tecnología para producir monoglicéridos muy purificados por destilación molecular. Los monoglicéridos se producen habitualmente mediante una reacción de glicerólisis, en la que el triglicérido y el glicerol se hacen reaccionar a temperatura elevada superior a 200°C utilizando catalizadores alcalinos.

20 Como alternativa a la utilización de catalizadores alcalinos y temperaturas elevadas se han realizado muchos intentos para utilizar enzimas tales como lipasas en la producción de monoglicéridos. En un artículo de revista, Bornscheuer (Enzyme and Microbial Technology 17:578-585, 1995) menciona la glicerólisis enzimática de triglicéridos en presencia o ausencia de disolventes y que los monoglicéridos pueden producirse por glicerólisis enzimática en fase sólida.

25 Los monoglicéridos pueden utilizarse como emulsionantes en muchas aplicaciones alimentarias. En la industria de la panificación, los monoglicéridos se han utilizado para mejorar la blandura del pan formando complejos con el almidón y retardando de este modo la cristalización de la amilopectina y el comienzo del endurecimiento del pan.

30 Las lipasas (E.C. 3.1.1.3) también se han utilizado directamente en la producción del pan. Por ejemplo, en la patente EP 0 585 988 se reivindica que la adición de lipasa a la masa produce una mejora del efecto contra el endurecimiento. Se sugiere que cuando se añade a la masa una lipasa obtenida de *Rizhopus arrhizus* puede mejorar la calidad del pan resultante cuando se utiliza en combinación con grasa/manteca. El documento WO 94/04035 da a conocer que puede conseguirse una blandura mejorada añadiendo una lipasa a la masa sin adición de ninguna grasa y/o aceite adicional a la masa. Castillo, P. ESEGP 89-10 dic. 1999 Helsinki, demuestra que las lipasas exógenas pueden modificar el volumen del pan. Así pues, las lipasas (E.C. 3.1.1.3) que hidrolizan los triacilgliceroles eran conocidas porque presentaban ventajas para la utilización en la industria de la panificación.

40 En el documento WO 98/45453 se ha demostrado que la cantidad de monoglicérido en las masas tratadas con lipasa aumenta sólo muy ligeramente, ya que la lipasa añadida a la masa degrada fácilmente los monoglicéridos a glicerol y libera ácidos grasos. Esto se explica por el hecho de que la lipasa reconoce la parte de ácido graso de la molécula en la zona activa y como los monoglicéridos y diglicéridos están más orientados en la interfase donde la lipasa es activa, los monoglicéridos y diglicéridos se degradan fácilmente durante la adición de la lipasa a una matriz que contiene emulsiones de grasa/aceite. Incluso con respecto a las lipasas 1.3 específicas, que solamente hidrolizan los ácidos grasos de un triglicérido en las posiciones 1 y 3 dejando el 2-monoglicérido como producto de reacción, el 2-monoglicérido resultante se reconfigura fácilmente a 1-monoglicérido, que puede ser hidrolizado por las lipasas 1.3 específicas.

45 Durante la degradación enzimática de los triglicéridos por las lipasas convencionales se forman monoglicéridos, diglicéridos, ácidos grasos libres y glicerol.

50 Típicamente, el aumento de monoglicéridos en la masa tratada con una o más lipasas es inferior al 0,1% (referido al peso de harina) con o sin grasa o aceite añadidos. Sin embargo, la dosis convencional de monoglicérido requerida en la masa para que produzca una mejora, por ejemplo, en la suavidad del pan resultante está comprendida típicamente aproximadamente entre 0,3 y 0,8% referido al peso de la harina (Krog, N. Cereal Food World, **24**, 10, 1979). Por lo tanto, cualquier efecto beneficioso de la adición de lipasas convencionales a la masa, tal como se sugirió en los documentos EP 0 585 988 y WO 94/04035, no es un resultado de un contenido creciente de monoglicérido solo.

55 Algunas lipasas además de presentar un efecto hidrolizante del triglicérido, son capaces de hidrolizar lípidos polares tales como glucolípidos, p. ej. digalactosildiglicérido (DGDG) y fosfolípidos (véase por ejemplo el documento WO 01/39602).

60 El sustrato para las lipasas en la harina de trigo es del 2 al 3% de lípidos de trigo endógenos, que son una mezcla compleja de lípidos polares y no polares. 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 superficial 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 conocido que emulsionantes, tales como DATEM, con gran actividad superficial son muy operativos cuando se añaden a la masa.

ES 2 284 897 T3

Se ha descubierto, sin embargo, que la utilización de lipasas (E.C. 3.1.1.3) en la masa en determinadas condiciones puede tener consecuencias perjudiciales, tales como la producción de harinas en mal estado, un impacto perjudicial sobre la actividad de la levadura y/o un efecto negativo sobre el volumen del pan. El efecto negativo sobre el volumen del pan se denomina con frecuencia sobredosis. La sobredosis puede conducir a una disminución en la elasticidad del gluten que produce una masa que es demasiado dura y por tanto produce volúmenes reducidos. Además, o alternativamente, dichas lipasas pueden degradar la materia grasa, el aceite o la grasa de la leche añadida a la masa.

El documento WO 00/32758 describe variantes de enzima lipolítica.

El documento GB 2 358 784 A describe un procedimiento de preparación de masa que comprende añadir a una masa una enzima que puede hidrolizar un lípido no polar, un glucolípido y un fosfolípido.

El documento WO 02/00852 A2 describe un grupo de genes de enzima que codifican enzimas lipolíticas con alta homología aislados de cepas de *Fusarium* y *Acremonium*.

El documento WO 02/03805 A describe la adición a la masa de una combinación de dos enzimas lipolíticas con diferentes especificidades.

El documento WO 02/065854 A2 describe el tratamiento de materias primas para productos alimenticios amiláceos tales como fideos, frituras y productos para refrigerio con enzima lipolítica.

El documento WO 02/066622 A2 describe nuevos genes aislados con alta homología al gen de la lipasa.

Aspecto del sumario

Un descubrimiento con potencial para desarrollos futuros de la presente invención consiste en que, sorprendentemente, la utilización de una enzima, que en las condiciones de la masa es capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, pero que es incapaz, o sustancialmente incapaz, de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido, presenta ventajas, y supera los inconvenientes relacionados con la utilización de lipasas (E.C. 3.1.1.3) que son capaces de hidrolizar lípidos no polares en una masa.

Aspectos detallados

La presente invención proporciona en primer aspecto un procedimiento de preparación de una masa de harina, comprendiendo dicho procedimiento añadir a los componentes de la masa una cantidad eficaz de una enzima que en las condiciones de la masa es capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en el que dicha enzima es incapaz, de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5, y mezclar los componentes de la masa para obtener la masa.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento de preparación de una masa o producto de panadería preparado a partir de una masa que comprende:

- (a) probar la actividad hidrolítica de por lo menos una enzima para con un triglicérido, un 1-monoglicérido, un fosfolípido y un glucolípido;
- (b) seleccionar una enzima con actividad hidrolítica para con un fosfolípido y un glucolípido y que no tenga actividad hidrolítica para con un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5; y
- (c) añadir la enzima seleccionada a la masa.

La presente invención proporciona en un tercer aspecto una masa que mejora la composición que comprende una cantidad eficaz de una enzima con actividad hidrolítica para con un fosfolípido y un glucolípido y que no tiene actividad hidrolítica para con un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5 y, opcionalmente, un componente de la masa adicional.

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona una masa que puede obtenerse por el procedimiento según la presente invención.

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una masa obtenida por el procedimiento según la presente invención.

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un producto de panadería que puede obtenerse horneando una masa según la presente invención.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un producto de panadería obtenido horneando una masa según la presente invención.

ES 2 284 897 T3

La presente invención proporciona además, en un octavo aspecto, un producto de fideos preparado a partir de una masa según la presente invención.

5 En un noveno aspecto, la presente invención proporciona un producto de pasta preparado a partir de una masa según la presente invención.

10 En un décimo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de una masa que mejora la composición en la que una cantidad eficaz de una enzima con actividad hidrolítica para con un fosfolípido y un glucolípido y que no presenta actividad hidrolítica para con un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5, se mezcla, opcionalmente, con un componente adicional de la masa.

En un decimoprimer aspecto, un procedimiento según la presente invención puede comprender las etapas siguientes:

- 15 (a) probar la actividad hidrolítica de por lo menos una enzima para con un triglicérido, un 1-monoglicérido, un fosfolípido y un glucolípido;
- (b) seleccionar una enzima con actividad hidrolítica para con un fosfolípido y un glucolípido y que no tenga actividad hidrolítica para con un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5.
- 20

La presente invención proporciona en su decimosegundo aspecto un procedimiento de preparación o desarrollo de una enzima con actividad hidrolítica para con un fosfolípido y un glucolípido y que no presenta actividad hidrolítica para con un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5, que comprende:

- 25 (a) seleccionar una lipasa con actividad hidrolítica para con un fosfolípido, un glucolípido y un triglicérido y/o un 1-monoglicérido,
- (b) modificar por inserción, delección o sustitución de por lo menos un aminoácido en la secuencia de aminoácidos, típicamente cerca o en el sitio activo, a fin de alterar la actividad de la lipasa de tal forma que la lipasa se modifica para no tener ninguna, o sustancialmente ninguna, actividad contra un triglicérido y/o un 1-monoglicérido.
- 30

35 En un decimoterter aspecto, la presente invención proporciona la utilización de una cantidad eficaz de una enzima que en las condiciones de la masa es capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en la que dicha enzima es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5, en la preparación de una masa para proporcionar una masa con aumento de volumen de la masa y/o aumento de la consistencia del gluten en comparación con una masa sin dicha enzima.

40 En un decimocuarto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para eliminar los lípidos polares de un aceite comestible, comprendiendo dicho procedimiento la adición a un aceite comestible de una enzima que es capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en la que dicha enzima es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5.

45 En un decimoquinto aspecto, la presente invención proporciona un aceite comestible, tal como un aceite de soja o un aceite de colza, que se puede obtener o se obtiene por el procedimiento según la presente invención.

En un decimosexto aspecto, la presente invención proporciona una proteína que en las condiciones de la masa presenta una o más de las características siguientes:

- 50 i) es capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en la que dicha enzima es incapaz, o sustancialmente incapaz, de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5.
- 55 ii) un peso molecular de aproximadamente 57 y/o aproximadamente 87 kDa cuando se determina por análisis SDS-PAGE;

en la que dicha proteína puede obtenerse a partir de *Vigna unguiculata*.

60 En un decimoséptimo aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de preparación de una masa de harina, comprendiendo dicho procedimiento la adición a los componentes de la masa de una enzima que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID n°: 12, o una variante, homóloga o derivada de la misma y mezclar los componentes de la masa para obtener la masa.

65 Para facilitar la referencia, éstos y otros aspectos de la presente invención se exponen a continuación en los encabezamientos de los apartados apropiados. Sin embargo, lo dado a conocer en cada apartado no está limitado necesariamente a cada apartado concreto.

Aspectos preferidos

Preferentemente la enzima capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en la que dicha enzima es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5 es una acil hidrolasa lipolítica (LAH) (E.C. 3.1.1.26).

Obsérvese que la enzima E.C. 3.1.1.26 según las recomendaciones de la International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) para Nomenclatura Enzimática (1992) se refiere a una “galactolipasa” que actúa también en 2,3-di-*O*-acil-1-*O*-(6-*O*- α -D-galactosil- β -D-galactosil)-D-glicerol, y fosfatidilcolina y otros fosfolípidos. En la bibliografía (como por ejemplo, Biochemica et Biophysica Acta 1215 (1994) 66-73) las enzimas comprendidas en el número de enzima E.C. 3.1.1.26 se han denominado acil hidrolasas lipolíticas (LAH) y otras de dichas denominaciones. Las expresiones galactolipasa y acil hidrolasa lipolítica (LAH) tal como se utiliza en la presente memoria se consideran que son sinónimos de la misma enzima, es decir, la que está comprendida en la clasificación E.C. 3.1.1.26 y que presenta actividad tanto en galactolípidos como en fosfolípidos.

Preferentemente la enzima capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en el que dicha enzima es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5, se aísla del extracto soluble de la hoja de judía de vaca y/o se aísla de los tilacoides de la hoja del trigo.

De manera apropiada, la enzima capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en la que dicha enzima es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5 puede presentar la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID n°: 1 y puede ser una variante, homóloga o derivada de la misma.

De manera apropiada, la enzima capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en la que dicha enzima es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5 puede presentar la secuencia de aminoácidos que es por lo menos el 75%, más preferentemente por lo menos el 85%, más preferentemente por lo menos el 90%, homóloga a la SEC. ID n°: 1.

De manera apropiada, la enzima capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en la que dicha enzima es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5 puede ser codificado por la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC. ID n°: 2 o puede ser una variante, homóloga o derivada de la misma.

De manera apropiada, la enzima capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en la que dicha enzima es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5 puede ser codificada por una secuencia de nucleótidos mostrada en la SEC ID n° 2 que es por lo menos el 75%, más preferentemente por lo menos el 85%, más preferentemente por lo menos el 90%, homóloga a la SEC. ID n°: 2.

De manera apropiada, la enzima capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en la que dicha enzima es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5 puede ser una proteína que tenga un peso molecular de aproximadamente 57 kDa y/o aproximadamente 87 kDa cuando se determina por análisis SDS-PAGE y que puede obtenerse a partir de *Vigna unguiculata*.

Preferentemente, la proteína que tiene un peso molecular de aproximadamente 57 y/o aproximadamente 87 kDa se aísla utilizando el mismo procedimiento que se detalla en la presente memoria.

La expresión “una enzima que en las condiciones de la masa es capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en la que dicha enzima es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5” incluye una enzima que en las condiciones de la masa hidroliza un glucolípido y un fosfolípido, pero que no hidroliza, un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5.

Para algunas formas de realización la enzima puede añadirse en forma de una composición que comprende dicha enzima.

Una cantidad eficaz de la enzima debería añadirse, de modo que la enzima, en las condiciones de la masa o en condiciones de descrudimiento, es capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, y es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5. Alternativamente o además, una cantidad eficaz de una composición que contiene dicha enzima puede añadirse a la masa ya sea directamente a una masa ya mezclada o como componente de uno o más componentes de la masa.

La expresión “cantidad eficaz” en la presente memoria significa una cantidad de la enzima añadida que es suficiente para efectuar, en las condiciones de la masa o en las condiciones de descrudimiento, la hidrólisis detectable de uno o más glucolípidos y de uno o más fosfolípidos presentes en la masa, mientras que la enzima añadida no afecte, o no afecte significativamente, a las concentraciones de triglicérido y/o 1-monoglicérido. Más específicamente, la expresión puede referirse a una cantidad de la enzima añadida que no produzca únicamente hidrólisis detectable de un glucolípido y fosfolípido, mientras que no afecte de manera sustancial a la concentración de triglicéridos y/o 1-monoglicéridos, pero que, además, produzca la formación de productos enzimáticos finales por hidrólisis de glucolípidos y fosfolípidos,

ES 2 284 897 T3

o la falta de formación de productos enzimáticos finales mediante ninguna, o sustancialmente ninguna, actividad sobre los triglicéridos y/o 1-monoglicéridos en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5, a un nivel que produzca propiedades mejoradas de la masa o si la masa se hornea, una calidad mejorada del producto de panadería, tal como el aumento de volumen del pan, aumento de suavidad o mejora de la estructura de la miga o la eliminación de lípidos polares del aceite comestible.

De manera ventajosa, por lo menos uno de entre el triglicérido, el 1-monoglicérido, el glucolípido y el fosfolípido en la masa es un componente lípido natural que aparece en la harina utilizada para la masa.

Propiamente, el fosfolípido es fosfatidilcolina (PC) y/o el glucolípido es digalactosildiglicérido (DGDG).

Cuando se da el caso que se añade un lípido polar, propiamente el lípido polar puede ser un fosfolípido, tal como uno o más seleccionados del grupo constituido por fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE).

Preferentemente, la masa es una masa fermentada por levadura. Aunque, se prefiere utilizar el procedimiento de la presente invención para la preparación de productos de pan fermentados con levadura tales como barras de pan, panecillo o pan tostado, se contempla asimismo la utilización del procedimiento para cualquier otro tipo de masa y de productos a base de masa tales como fideos y productos de pasta y pasteles, la calidad de los cuales puede mejorarse mediante la adición de la enzima según la presente invención.

Preferentemente, la enzima se añade en una cantidad que está comprendida en el intervalo entre 0,1 y 1.000 unidades de enzima/kg de harina. Más preferentemente, la enzima se añade en una cantidad que está comprendida en el intervalo entre 1 y 100 unidades de enzima/kg de harina.

Preferentemente, cuando la masa es una masa de pan, el procedimiento comprende como una etapa adicional que la masa esté horneada para obtener un producto de panadería. Una propiedad particularmente deseada de los productos de pan horneados es un volumen muy específico como el definido en los ejemplos. Por consiguiente, la adición de la enzima de la invención produce preferentemente un aumento del volumen específico del producto de panadería que es por lo menos el 10%, con respecto a un producto de panadería preparado en condiciones idénticas excepto que no se añade la enzima. Más preferentemente, el aumento del volumen específico es por lo menos del 20% tal como por lo menos el 30%, p. ej., por lo menos el 40%. Alternativamente, la masa es una masa seleccionada de entre el grupo constituido por masa para pasta, masa para tallarines y una masa para pastel o mezcla para panificación.

Preferentemente, la enzima se añade en una cantidad que produzca un aumento del volumen específico del producto de panadería que es por lo menos del 10%, con respecto a un producto de panadería preparado en condiciones idénticas excepto que no se añade la enzima.

La adición de la enzima de la invención produce preferentemente un aumento en el índice de gluten en la masa de por lo menos el 5%, con respecto a una masa sin adición de la enzima, determinándose el índice de gluten mediante un aparato Glutomatic 2200.

El índice de gluten puede medirse mediante un Glutomatic 2200 de Perten Instruments (Suecia) utilizando el procedimiento detallado a continuación: inmediatamente después de la impermeabilización, 15 g de masa deben pesarse y colocarse en el Glutomatic 2200 y lavarse con 500 ml de solución de NaCl al 2% durante 10 min. La masa lavada debe transferirse a continuación a Gluten Index Centrifuge 2015 y las dos fracciones de gluten deben pesarse y el índice de gluten calcularse según la siguiente ecuación:

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

Se ha descubierto que la enzima de la invención puede ser particularmente activa contra determinados glucolípidos tales como por ejemplo galactolípidos incluyendo el digalactodiglicérido (DGDG) que se transforma en digalactomonoglicérido (DGMG) que es un tensioactivo eficaz. Preferentemente, por lo menos el 25% de glucolípido inicialmente presente en la masa se hidroliza y preferentemente por lo menos el 35% del glucolípido está hidrolizado, más preferentemente por lo menos el 50%, por lo menos el 60% o por lo menos el 75% del mismo.

Alternativamente o además de esto, se ha descubierto que la enzima de la invención puede ser activa frente a determinados fosfolípidos que se transforman en lisofosfolípidos. Preferentemente, por lo menos el 25% de fosfolípido inicialmente presente en la masa se hidroliza y preferentemente por lo menos el 35% del fosfolípido está hidrolizado, más preferentemente por lo menos el 50%, por lo menos el 60% o por lo menos el 75% del mismo.

La actividad de una lipasa sobre el triglicérido puede depender del pH del sustrato. La enzima presenta actividad hidrolítica frente a un fosfolípido y un glucolípido pero no actividad hidrolítica frente a un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5.

Preferentemente, la enzima tal como se define en la presente memoria es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido.

ES 2 284 897 T3

Preferentemente, la enzima es incapaz de hidrolizar tanto un triglicérido como un 1-monoglicérido. Preferentemente la enzima es incapaz de hidrolizar tanto un triglicérido como un 1-monoglicérido. Alternativamente, la enzima puede ser capaz de hidrolizar un triglicérido y un diglicérido, pero es incapaz, o sustancialmente incapaz, de hidrolizar un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5. Propiamente, la enzima es incapaz de hidrolizar un 1-monoglicérido.

Es conocido en la técnica que otras enzimas aparte de las lipasas pueden contribuir a mejorar las propiedades de la masa y la calidad de los productos de panadería. Dentro del alcance de la invención está comprendido que, además de la enzima de la invención, pueda añadirse a la masa por lo menos otra enzima o pueda estar presente en la composición para la mejora de la masa. Dichas otras enzimas incluyen las enzimas que degradan el almidón tales como las endo- o exoamilasas, pululanasa, enzimas que degradan el almidón, enzimas desramificadoras, hemicelulasas incluyendo xilanasas, celulasas, lipoxigenasas y oxidorreductasas, p. ej. glucosa oxidasa, fosfolipasas y hexosa oxidasa.

Preferentemente, el componente adicional de la masa en la composición, cuando está presente, se selecciona de entre el grupo constituido por harina de cereales, levadura, un agente de fermentación químico, un agente para consistencia de la masa, un emulsionante, un azúcar, un acilglicerol, un fosfolípido, un glucolípido y una sal.

Propiamente, la masa puede ser una masa reciente, opcionalmente envasada en una atmósfera controlada, la masa puede estar congelada.

Propiamente, una o más enzimas según la presente invención pueden añadirse a la masa y/o estar presentes en la composición que mejora la masa y/o añadirse al aceite comestible. Propiamente, dos o más, tres o más o cuatro o más, enzimas según la presente invención pueden añadirse a la masa y/o estar presentes en la composición que mejora la masa y/o añadirse al aceite comestible.

Preferentemente, el procedimiento de selección de enzimas según la presente invención puede comprender la identificación de la actividad de las enzimas en placas con agar-agar conteniendo cada una galactolípidos, fosfolípidos, triglicéridos o 1-monoglicéridos como sustrato. Se seleccionan las enzimas que son activas para con los fosfolípidos y glucolípidos pero que no presentan ninguna, o sustancialmente ninguna, actividad para con triglicéridos y/o 1-monoglicéridos.

Propiamente, la etapa (a) y/o (b) del procedimiento de selección de una enzima según la presente invención se realiza a un pH entre 4,5 y 6,5.

Preferentemente, la enzima probada por el procedimiento que consiste en seleccionar una enzima según la presente invención es una lipasa (E.C. 3.1.1.3) o una acil hidrolasa lipídica (E.C. 3.1.1.26).

Preferentemente, en el procedimiento de preparación o desarrollo de una enzima según la presente invención la inserción, delección o sustitución de por lo menos un aminoácido está en la región externa y/o cerca del sitio activo y/o en el terminal C de la secuencia de aminoácidos.

Preferentemente, se elimina la región externa.

Pueden prepararse enzimas adecuadas modificando las lipasas (E.C. 3.1.1.3) y las acil hidrolasas lipolíticas (E.C. 3.1.1.26) para producir enzimas que son activas para con los fosfolípidos y glucolípidos pero que no presentan ninguna actividad para con los triglicéridos y/o 1-monoglicéridos en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5.

Las sustituciones de aminoácidos adecuados incluyen las sustituciones de aminoácidos en el sitio activo o cerca del mismo que cambian las propiedades hidrófilas en torno al sitio activo. A título de ejemplo únicamente, las sustituciones de aminoácidos pueden aumentar el número de aminoácidos polares en el sitio activo o cerca del mismo.

Preferentemente, se prepara una enzima según la presente invención, la cual es capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido y en la que dicha enzima es incapaz, o sustancialmente incapaz, de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH entre 4,5 y 6,5.

Propiamente, la enzima según la presente invención puede presentar una actividad mayor hacia los glucolípidos en comparación con los fosfolípidos. Propiamente, la relación del % de hidrólisis de los glucolípidos iniciales (es decir DGDG) en la masa: el % de hidrólisis de los fosfolípidos iniciales (es decir, fosfatidilcolina) en la masa debe ser superior a 10:1, por ejemplo, superior a 15:1, superior a 20:1, superior a 30:1 o superior a 40:1.

Alternativamente, la enzima según la presente invención puede presentar una actividad mayor hacia los fosfolípidos en comparación con los glucolípidos. Por ejemplo, la relación del % de hidrólisis de los glucolípidos iniciales (es decir DGDG) en la masa: el % de hidrólisis de los fosfolípidos iniciales (es decir, fosfatidilcolina) en la masa debe ser superior a 1:3, tal como, superior a 1:5, superior a 1:8, superior a 1:10 o superior a 1:15, por ejemplo.

La mayoría de las harinas de cereales contienen lípidos no polares que incluyen triglicéridos y lípidos polares que incluyen fosfolípidos y glucolípidos. Los lípidos polares pueden servir como sustratos para la enzima de la invención. Por lo tanto, en una forma de realización del procedimiento, por lo menos uno de los glucolípidos, tal como un

ES 2 284 897 T3

galactolípido, incluyendo el digalactosildiglicérido (DGDG) y uno de los fosfolípidos, tal como fosfatidilcolina (PC), es un componente lipídico natural (o endógeno) que aparece en la harina utilizada para la masa.

Sin embargo, la masa de harina puede no contener suficientes cantidades de estos sustratos lipídicos para la enzima de la invención. Por lo tanto está comprendida en el alcance de la invención para enriquecer la masa con por lo menos un glucolípido y un fosfolípido que proporcione suficientes sustratos para la enzima. Se apreciará que la expresión “suficiente sustrato” implica que ninguno de estos sustratos lipídicos sea limitativo para obtener una masa o un producto de panadería que mejore el efecto descrito anteriormente.

Además o alternativamente a esto, puede añadirse un lípido no polar complementario tal como un acilglicerol. Según la invención puede utilizarse una variedad de dichos lípidos tales como p. ej. aceites vegetales, grasas vegetales, aceites animales, grasas animales, tales como por ejemplo mantequilla y manteca. En relación con esto, un lípido especialmente útil es un aceite o un derivado de grasa de cereales tales como aceite de avena. El aceite de avena contiene típicamente, además de triglicéridos, 5 a 25% de fosfolípidos y 5 a 12% de glucolípidos. El aceite de avena puede fraccionarse para proporcionar fracciones con un gran contenido de lípidos polares (E. G. Hammond en *Lipid in Cereal Technology* editado por P. J. Barnes, Academic Press).

Por tanto un aspecto del procedimiento de la invención consiste en que uno o más fosfolípidos pueden añadirse a la masa. En relación con esto, los fosfolípidos útiles incluyen fosfatilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC), lecitina y fosfatidiletanolamina (PE).

Por lo menos uno de entre el triglicérido, el 1-monoglicérido, el glucolípido y el fosfolípido pueden añadirse a la masa.

Sorprendentemente, se ha descubierto que la adición de una cantidad eficaz de una enzima capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, en el que dicha enzima es incapaz de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5 junto con un glucolípido, en particular digalactosildiglicérido (DGDG), produce un volumen del pan y/o una estructura de la miga mejorados. Las mejoras observadas con la enzima más el glucolípido son aún mayores que las mejoras observadas con la enzima sola. Por tanto, propiamente, una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede utilizarse en combinación con un glucolípido.

Los aceites comestibles, tales como los aceites vegetales, por ejemplo aceite de soja o aceite de colza, comprenden típicamente triglicéridos con un contenido inferior de lípidos polares, tales como fosfolípidos y glucolípidos. Se desea con frecuencia eliminar los lípidos polares del aceite vegetal con el fin de proporcionar un producto de aceite transparente, de gran calidad. El procedimiento para eliminar los lípidos polares se denomina con frecuencia descrudimiento. Por tanto, según el decimoquinto aspecto de la presente invención el aceite comestible, por ejemplo un aceite vegetal, puede descrudirse utilizando una enzima según la presente invención. El descrudimiento es la primera etapa del proceso de refinado del aceite comestible que elimina los lípidos polares, tales como fosfolípidos, procedentes del aceite en bruto. Normalmente el descrudimiento se realiza mediante agua o un proceso en húmedo. Por ejemplo, los fosfolípidos se transforman en liso-fosfolípidos solubles en agua mediante una hidrólisis enzimática catalizada, los liso-fosfolípidos solubles en agua se separan a continuación del aceite por centrifugación. El contenido en fósforo residual en el aceite descrudimiento enzimático puede ser tan bajo como 2 ppm de fósforo.

Preferentemente, el aceite comestible según los aspectos decimocuarto y decimoquinto de la presente invención es un aceite vegetal.

Ventajas de la presente invención

Una ventaja de la presente invención consiste en que la enzima de la presente invención, que es activa frente a glucolípidos y fosfolípidos, pero que es incapaz de hidrolizar triglicéridos y/o 1-monoglicéridos en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5, cuando se utiliza en una masa, produce ácidos grasos poliinsaturados, debido a que los glucolípidos y fosfolípidos de trigo endógenos contienen grandes cantidades (>70%) de ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3). Estos ácidos grasos son sustratos para la lipoxigenasa y contribuyen a aumentar la consistencia del gluten y una miga más blanca.

Una ventaja adicional o alternativa de la presente invención consiste en que los lípidos polares endógenos pueden modificarse sin producción de ácidos grasos en exceso. Por tanto, se evita que la masa se vuelva demasiado dura y/o el volumen de pan resultante pueda aumentar y/o la producción de harinas en mal estado pueda reducirse y/o los efectos negativos sobre la actividad de la levadura puedan aliviarse o superarse. Una ventaja adicional o alternativa todavía de la presente invención consiste en que la manteca, el aceite o la grasa de la leche añadida a la masa no se hidroliza.

Descripción detallada de la presente invención

Enzimas según la presente invención

Las enzimas que presentan las propiedades definidas en la presente memoria pueden proceder de una variedad de fuentes que incluye plantas, animales y microorganismos tales como especies bacterianas y de hongos incluyendo especies de levaduras. La enzima de la invención puede proceder de un organismo que produce de forma natural la

enzima o puede producirse de manera recombinante transformando una célula hospedadora apropiada con un gen que codifica la enzima. La enzima puede ser una enzima que comprenda en sí misma zonas activas para todas las actividades enzimáticas, pero también es posible construir enzimas híbridas con actividades enzimáticas tal como se define en la presente memoria por síntesis o utilizando tecnología de ADN recombinante.

5 Alternativamente, una enzima que no tenga, inicialmente por lo menos, las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede modificarse, por ejemplo alterando la secuencia de aminoácidos de la misma, para proporcionar una enzima con las propiedades definidas en la presente memoria y con la especificidad del sustrato deseada. Es conocido en la técnica el modificar enzimas por mutagénesis al azar (US nº 4.814.331, WO 93/91285 y WO 95/22615) y el modificar enzimas lipolíticas por mutagénesis específica al punto (patente WO 97/04079) para obtener mejor rendimiento de la misma. El concepto generalmente utilizado ha sido insertar, eliminar o sustituir los aminoácidos en la parte estructural de la cadena de aminoácidos de una enzima lipolítica en cuestión. Una enzima adecuada para la modificación es aquella que puede hidrolizar enlaces éster. Dichas enzimas incluyen, por ejemplo, lipasas, tales como triacilglicerol lipasa (E.C. 3.1.1.3), lipoproteína lipasa (E.C. 3.1.1.34), monoglicérido lipasa (E.C. 3.1.1.23), lisofosfolipasa, ácido ferúlico esterasa y esterasa (E.C. 3.1.1.1, E.C. 3.1.1.2) y acil hidrolasas lipolíticas (E.C. 3.1.1.26) y fosfatidilinositol desacilasa (E.C. 3.1.1.52).

Las enzimas adecuadas para modificación pueden proceder de una variedad de fuentes incluyendo plantas, animales y microorganismos, tales como especies bacterianas y micóticas incluyendo especies de levadura. Ejemplos de enzimas adecuadas para modificación son las *Pseudomonas* lipasas, por ejemplo de *P. cepacia* (patente US nº 5.290.694), *P. glumae* (Frenken N. *et al.* (1992) *Appl. Envir. Microbiol.* 58 3787-3791), *P. pseudoalcaligenes* (EP 0 334 462) o *Pseudomonas sp.* cepa SD 705 (WO 95/06720, EP 0 721 981, WO 96/27002, EP 0 812 910). Alternativamente, las enzimas adecuadas para la modificación pueden ser por ejemplo enzimas lipolíticas micóticas, tales como las enzimas lipolíticas de la familia *Humicola* y de la familia *Zygomycetes* y cutinasas micóticas. La familia *Humicola* de las enzimas lipolíticas está constituida por la lipasa de la cepa DSM 4109 de *H. lanuginosa* y lipasas con más del 50% de homología con esta lipasa. La lipasa de *H. lanuginosa* (sinónimo de *Thermomyces lanuginosus*) se describe en las patentes EP 0 258 068 y EP 0 305 216, y tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las posiciones 1 a 269 de la SEC. ID nº: 2 de la patente US nº 5.869.438.

Withers-Martinez *et al.* (*Structure* 1996, 4:1363-1374) estudiaron una proteína 2 relacionada con la lipasa pancreática de cobaya (GPLRP2) que tiene actividad sobre galactolípidos y fosfolípidos de actividad reducida sobre triglicéridos. La estructura cristalina de esta enzima se presenta y se compara con la lipasa pancreática humana (HPL) con actividad únicamente sobre triglicéridos y un mutante híbrido de la proteína 2 relacionada con lipasa (GPLRP2) constituido por el dominio catalítico de GPLRP2 y el dominio C-terminal de HPL (GPLRP2/HPL). El mutante GPLRP2/HPL tiene actividad contra fosfolípidos y galactolípidos, pero con actividad reducida adicional sobre triglicéridos en comparación con la enzima GPLRP2. Asimismo se analizó el veneno (PLA1) del avispon para comparación. Withers-Martinez *et al.* (*Structure* 15 de nov. de 1996; 4(11): 1363-74) estudiaron los bucles situados por encima del sitio activo de la proteína 2 relacionada con la lipasa pancreática de cobaya, la lipasa pancreática humana y una fosfolipasa A1 del veneno del avispon y encontraron una relación entre la configuración del bucle y la actividad para el triglicérido y los fosfolípidos.

En GPLRP2 el dominio externo está reducido de tamaño en comparación con HPL, y solamente se conserva el bucle β 9 y por consiguiente se observa una superficie hidrófoba menor alrededor del sitio activo. Esto puede explicar la actividad reducida sobre el triglicérido de GPLRP2 y GPLRP2/HPL en comparación con HPL.

Únicamente a título de ejemplo, una variante de lipasa sin actividad sobre monoglicéridos puede obtenerse por sustitución de los aminoácidos específicos en el punto catalítico o alrededor del mismo de una lipasa. Por ejemplo, la lipasa de *Aspergillus tubingensis* que presenta la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC. ID nº: 3 y como se da a conocer en la publicación de la patente europea nº 0 977 869, y que está modificada por la secuencia nucleotídica mostrada en la SEC. ID nº: 4, puede alterarse al proporcionar dicha variante de lipasa para la utilización según la presente invención.

La triada catalítica de SEC. ID nº: 3 es serina 173 (Ser173), ácido aspártico 228 (Asp228) e histidina 285 (His285). Propiamente, uno o más de estos aminoácidos de la triada catalítica puede sustituirse para cambiar las propiedades hidrófilas de la triada catalítica.

Uno o más de los siguientes aminoácidos en el punto catalítico de la SEC. ID nº: 3 o alrededor del mismo puede sustituirse para cambiar las propiedades hidrófilas en torno al sitio activo: Phe107 - Phe123; Gly171 - Gly175; Tyr198 - Ile203; Thr224 - Gly239; Ser270 - Leu297.

Por ejemplo, el procedimiento para mutar una lipasa "precursora" para proporcionar una variante de lipasa con actividad del sustrato alterada según la presente invención puede incluir las etapas siguientes.

A. Construcción del vector de expresión

Un vector, por ejemplo pYEL, puede construirse sustituyendo el activador inducible, *Gall_p*, con el activador constitutivo, *ADH_p*, y un gen de lipasa (por ejemplo el gen de lipasa de *Aspergillus tubingensis* como se da a conocer en

ES 2 284 897 T3

la patente EP 0 977 869) puede incorporarse por recombinación *in vivo* en *S. cerevisiae*. La Figura 11 presenta dicho vector de expresión derivado de pYES2.

B. Mutagénesis al azar por PCR propensa a error (EP-PCR)

A continuación pueden crearse bancos de mutagénesis al azar, utilizando, por ejemplo, dos procedimientos de EP-PCR; kit de mutagénesis para PCR GeneMorph™ y kit para mutagénesis al azar por PCR Diversify™, referidos a continuación como Genemorph y Diversify, respectivamente.

La frecuencia de la mutación puede utilizarse para obtener 1 a 2 sustituciones de aminoácidos por gen de lipasa, por ejemplo por el gen *LipA*. La optimización de la frecuencia de la mutación puede realizarse variando las cantidades iniciales de la plantilla de ADN (~0,65-40 ng) en el procedimiento Genemorph de EP-PCR y variando las concentraciones de MnSO₄ (0-640 μM) y dGTP (40-120 μM) en el procedimiento de EP-PCR con Diversify. Los procedimientos de EP-PCR optimizados pueden contener: 0,65 ng de plantilla de ADN, 2,5 U de Mutazyme ADN polimerasa, 125 ng de cada cebador, 1x tampón de reacción Mutazyme y mezcla de dNTP 200 μM en el procedimiento de EP-PCR con Genemorph. En el procedimiento de EP-PCR con Diversify se aplicaron 1 ng de plantilla de ADN, 2 U de Titanium™ *Taq* ADN polimerasa, 10 μM de cada cebador, MgCl₂ 3,5 mM, MnSO₄ 480 μM, mezcla de dNTP 200 μM y dGTP 40 μM. Ambos procedimientos de EP-PCR se ejecutaron en un volumen total de 50 μl.

Los cebadores diseñados para ambos procedimientos EP-PCR se presentan en la tabla siguiente. El cebador JOM1 introduce además tres A (subrayados) corriente arriba del codón de iniciación.

Cebador	Secuencia nucleotídica	T _m [°C]	Sitio del cebador [bp]	
JOM1	5'CAAGCTATACCAAGCATA CAATCAACTCCAAAATGTT CTCTGGACGGTTTG3'	77,6	380-398 (<i>ADH_p</i>)→ 1-20 (<i>LipA</i>)	SEC. ID n°: 5
JOM2	5'CAAACCTCTGGCGAAGAA GTCCAAAGCTG3'	69,3	400→428 (<i>ADH3</i>)	SEC. ID n°: 6

La EP-PCR puede realizarse utilizando un ciclador térmico programable en las siguientes condiciones; kit para mutagénesis por PCR GeneMorph™: 94°C durante 30 segundos, seguido de 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 55°C durante 30 segundos y 72°C durante 2 minutos. Por último se aplicó una prolongación adicional de 10 minutos a 72°C. Kit para mutagénesis al azar por PCR Diversify™: 94°C durante 30 segundos, seguido de 25 ciclos de 94°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto.

C. Transformación y expresión

Pueden prepararse células transformadas y competentes mediante una modificación del procedimiento de transformación descrito en el protocolo pYES2 (n° de catálogo V825-20, Invitrogen, CA, USA), por ejemplo. Una única colonia de CEN.PK113-5D de *Saccharomyces cerevisiae* puede inocularse en 20 ml de YPD y se cultiva durante la noche a 30°C en agitación a 200 RPM. El cultivo de la noche puede diluirse con YPD hasta una D.O₆₀₀ entre 0,2 y 0,3 e incubarse durante tres horas más a 30°C y 200 RPM. Las células pueden recogerse por centrifugación a 4.750 g y 20°C durante 5 minutos. El sedimento puede lavarse por resuspensión en 1 ml de 1xTrisEDTA (1xTE), pH 8,0 y centrifugarse durante 5 minutos a 10.000 g. Las células resultan competentes añadiendo 0,5 ml de 1xTE de acetato de litio 100 mM, pH 7,5.

La transformación puede realizarse mezclando suavemente 100 μg de ADN con 50 μl de células competentes de *Saccharomyces cerevisiae*, 5 μl de Yeastmaker Carrier DNA y 300 μl de acetato de litio 100 mM, 40% de polietilenglicol 3350 y 1xTE. La mezcla puede incubarse a 30°C en agitación a 1.000 RPM durante 30 minutos seguido de incubación a 42°C durante 15 minutos. Después las células pueden transferirse a hielo y a continuación sedimentarse a 11.300 g durante 5 segundos. El sedimento puede ponerse en suspensión en 1 ml de YPD e incubarse durante 45 minutos a 30°C y 200 RPM. Un volumen de suspensión de 150 μl se transfirió a placas que contenían SC-ura y se incubó durante 3 días a 30°C. La transformación en células competentes de *Saccharomyces cerevisiae* se continuó utilizando con fines de clonación utilizando la recombinación *in vivo*, en la que 100 ng de la lipasa (por ejemplo *LipA*) o variantes de la misma pueden cotransfectarse con 50 ng de pYEA linealizada con BamHI.

D. Aislamiento del ADN

El ADN plásmido de *Escherichia coli* puede aislarse por lisis alcalina utilizando el kit de aislamiento del plásmido muy puro.

ES 2 284 897 T3

El ADN plásmido de *Saccharomyces cerevisiae* puede aislarse de la forma siguiente: las células pueden sedimentarse por centrifugación a 1.100 g durante 15 minutos y volverse a poner en suspensión en 1 ml de STET y 1,5 ml de perlas de vidrio (425 a 600 micras). Además se añadió un volumen de 1 ml de STET y la mezcla se incubó a 100°C durante 5 minutos. La solución puede centrifugarse a continuación durante 15 minutos a 6.500 g y el sobrenadante puede transfectarse en un tubo eppendorf, que se centrifugó durante 15 minutos más a 27.000 g. El ADN puede extraerse y purificarse del sobrenadante utilizando Qiagen-tip 20 del kit de purificación Plasmid Mini.

E. Secuenciado del ADN

Las variantes de lipasa (p. ej. *LipA*) pueden secuenciarse según el procedimiento terminador de la cadena didesoxi [Sanger *et al.*, 1977]. El ADN plásmido para secuenciado puede prepararse utilizando una modificación del kit de purificación Plasmid Mini. De esta forma puede realizarse una lisis alcalina estándar en lugar de utilizar Qiagen-tip 20 a. Cuando se utilizó ADN ampliado por PCR para el secuenciado, se aisló ADN por el sistema de purificación de ADN Wizard® PCR Preps.

La reacción de secuenciado puede realizarse utilizando el kit de secuenciado de ciclo ABI Prism® BigDye™ Terminators v3.0 (Danisco Biotechnology) o el kit ABI Prism™ dRhodamine Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction (AAU) con plantilla de ADN y concentraciones de cebador de 500 ng y 3,2 pmoles, respectivamente. Las reacciones de secuenciado pueden realizarse utilizando un ciclador térmico programable en las siguientes condiciones: 25 ciclos de 96°C durante 30 segundos, 50°C durante 15 segundos y 60°C durante 4 minutos. La purificación de los productos de PCR puede realizarse mediante precipitación con etanol y el sedimento puede volverse a poner en suspensión en 12 µl de HIDI formamida (Danisco Biotechnology) o 12 µl de reactivo para supresión de la plantilla (AAU) y puede transferirse a un tubo de muestra del analizador genético con tabiques. Las muestras pueden introducirse en un analizador genético ABI Prism® 3100 (Danisco Biotechnology) o un analizador genético ABI Prism® 310 (AAU). Los cebadores adecuados para secuenciar una variante *LipA* se presentan en la tabla a continuación. Estos cebadores se hibridan internamente en *LipA*.

Cebador	Secuencia de nucleótidos	Sitio del cebador [bp]	T _m [°C]
JOM3	5' GCTCGTGGTTCGCCTTCCGGGG 3' (SEC. ID. n°: 7)	306-326 (<i>LipA</i>)	68,2
JOM4	5' GCCGGTGCAGAGGTCGTCG 3' (SEC. ID. n°: 8)	399-381 (<i>LipA</i>)	58,1
JOM5	5' CCTCGAATCGGAAACTATGCGC 3' (SEC. ID. n°: 9)	601-622 (<i>LipA</i>)	61,6
JOM13	5' TGTCACGGCGTCCGATATCG 3' (SEC. ID. n°: 10)	768-787 (<i>LipA</i>)	78
JOM14	5' CTCATCCAACGTGGAAGTCG 3' (SEC. ID. n°: 11)	108-89 (<i>LipA</i>)	77

F. Cribado de variantes de lipasa (propiamente lipasa 3): especificidad alterada del sustrato

Las variantes que presentan actividad de DGDG y de fosfolipasa, pero no actividad de triglicéridos pueden identificarse utilizando, por ejemplo, un tamiz plano de alto rendimiento preliminar seguido de un tamiz cuantitativo, en el que el incremento está verificado y cuantificado.

G. Producción y purificación de variantes mejoradas

Una colonia aislada de variantes seleccionadas puede inocularse en 50 ml de medio SC-ura e incubarse a 30°C y 250 rpm durante dos días, tras los cuales puede transferirse 25 ml a 500 ml de medio YPD e incubarse durante dos días más a 30°C y 200 rpm. La lipasa producida puede separarse del cultivo por centrifugación durante 15 min. El sobrenadante puede almacenarse a -18°C hasta su utilización posterior.

60 Cromatografía de interacción hidrófoba

Un volumen de 250 ml de sobrenadante puede equilibrarse con (NH₄)₂SO₄ para obtener una concentración final de (NH₄)₂SO₄ 1,0 M. La suspensión se inyectó en una columna SOURCE15PHE que contenía ligandos hidrófobos de fenilo acoplados a una matriz de poliestireno/divinilbenceno rígida monodispersada de 15 µm. La columna puede rellenarse hasta un volumen de lecho final de 5,1 ml. La elución puede realizarse con tampón NaAc 20 mM pH 5,5 y un gradiente decreciente lineal de (NH₄)₂SO₄ 1,0 M - 0 M a una caudal de 5 ml/min durante 20 min.

La identificación de las fracciones que contienen lipasa (por ejemplo lipasa 3) y variantes de la misma según la presente invención puede realizarse aplicando 15 μ l de cada fracción en los pocillos en una placa que contiene sustratos adecuados para identificar la actividad de fosfolipasa, la actividad de galactolipasa y la hidrólisis de triglicéridos.

5 Desalado

Las fracciones seleccionadas pueden desalarse utilizando columnas PD-10 de desalado que contienen una matriz de Sephadex G-25 rellena hasta un volumen de lecho final de 8,3 ml. La columna puede preequilibrarse con tampón TEA 20 mM pH 7,3, tras lo cual se aplicó un volumen de muestra de 2,5 ml. La elución puede realizarse aplicando 10 3,5 ml de tampón TEA 20 mM pH 7,3.

Cromatografía de intercambio aniónico

Las fracciones seleccionadas pueden inyectarse en una columna SOURCE15Q que contiene ligandos de amonio cuaternario acoplados a una matriz de poliestireno/divinilbenceno rígida monodispersada de 15 μ m. La columna puede rellenarse hasta un volumen de lecho final de 5,1 ml. La elución puede realizarse con tampón TEA 20 mM pH 7,3 y un gradiente creciente lineal de NaCl 0 M - 1,0 M a un caudal de 2 ml/min durante 20 min.

20 H. Caracterización de variantes mejoradas

SDS-PAGE/gel natural

Las proteínas pueden separarse por tamaño mediante SDS-PAGE utilizando 1 \times tampón de serie, un gel de separación al 12% y un gel de acilamiento al 4% preparados según Laemmli (1970).

25 Cantidades equivalentes de muestra y de tampón de muestra SDS, que contienen 2-mercaptoetanol, pueden incubarse a 95°C durante 5 min. Como patrón se empleó un marcador de bajo peso molecular que contenía 0,64 μ g de fosforilasa b, 0,83 μ g de albúmina de suero bovino, 1,47 μ g de ovoalbúmina, 0,83 μ g de anhidrasa carbónica, 0,88 μ g de inhibidor tripsina de soja y 1,21 μ g de α -lactoalbúmina. Las bandas de proteína se observaron utilizando tinción Coomassie® G250.

Para PAGE natural: las proteínas pueden separarse según su movilidad por PAGE natural, en la que no se aplicó SDS.

35 Las lipasas solamente con actividad frente a galactolípidos y fosfolípidos no se han utilizado anteriormente para soporte. Estos tipos de lipasas se mencionan raras veces en la bibliografía. Sin embargo, Matos A. R. *et al.* (*FEBS Lett* 2 de marzo de 2001; 491(3): 188-92) aisló una proteína de 43 kDa de la judía de vaca estresada por la sequía que se expresó en un sistema de baculovirus. Esta enzima presentaba preferentemente actividad de galactolípido acil hidrolasa y alguna actividad de fosfolípido pero ninguna actividad sobre triacilglicerol (triglicérido). La secuencia de aminoácidos de esta enzima se presenta en la SEC. ID. n°: 1 y la secuencia de nucleótidos que codifica esta enzima se presenta en la SEC. ID. n°: 2. Estos tipos de enzimas son diferentes de las lipasas normales (EC. 3.1.1.3) y la expresión acil hidrolasa lipolítica (LAH) (E.C. 3.1.1.26) se aplica habitualmente a estas enzimas, las cuales se han descrito solamente en el reino vegetal. La galactolípido acil hidrolasa descrita en Matos *et al.* es adecuada para su utilización según la presente invención.

45 La enzima según la presente invención puede ser lipasa (E.C. 3.1.1.3) o una acil hidrolasa lipolítica (E.C. 3.1.1.26), siempre que posea las propiedades especificadas.

50 Sahsay *et al.* (*Biochem Biophys Acta* 17 nov. 1994;1215(1-2):66-73) aislaron una acil hidrolasa lipolítica a partir del extracto soluble de la hoja de la judía de vaca. La actividad hidrolítica de esta enzima en diferentes sustratos presentó la actividad relativa siguiente digalactosildiglicérido>monogalactosildiglicérido>fosfatidilcolina>fosfatidilglicerol. La enzima no presentó ninguna actividad sobre triacilglicerol (triglicérido). La enzima dada a conocer en Sahsay *et al.* es adecuada para su utilización según la presente invención.

55 O'Sullivan *et al.* (*J. Plant Physiol.* vol. 131, págs. 393-404 1987) da a conocer una galactolipasa unida a la membrana asociada con tilacoides de las hojas del trigo.

60 Como ilustran anteriormente los ejemplos, las lipasas o las acil hidrolasas lipolíticas con actividad sobre fosfolípidos y galactolípidos solos, aunque aparentemente poco frecuentes, existen en la naturaleza y pueden utilizarse según la presente invención. Además o alternativamente existen otros medios de preparación de una lipasa con actividad frente a fosfolípidos y galactolípidos pero sin actividad frente a triglicéridos y/o 1-monoglicéridos.

65 Como se mencionó anteriormente, Withers-Martinez (*Structure* 1996, 4:1363-1374) demostraron que una proteína 2 relacionada con la lipasa de cobaya (GPLRP 2) tenía actividad sobre fosfolípidos y galactolípidos y reducía la actividad sobre el triglicérido. Se indica también que la hidrofilia en torno a la zona activa puede controlar la actividad en el triglicérido. Esto abre la posibilidad de sustituciones de aminoácidos en la zona activa o cerca de ella que reduciría más la actividad de triglicérido cambiando las propiedades hidrofílicas alrededor de la zona activa.

Es bien sabido que la actividad de las lipasas puede alterarse cambiando los aminoácidos específicos en la enzima. Cordle *et al.* (*J. Lipid Res.* septiembre de 1998 39 (9): 1759-67) sustituyó la tirosina con el ácido aspártico más polar y obtuvo una actividad reducida en los ácidos grasos de cadena larga.

5 Carriere *et al.* (*Biochemistry* 7 ene 1997 36(1): 239-48) eliminó el final de una lipasa pancreática humana con el fin de eliminar la activación interfacial y descubrió que su actividad específica para con los triglicéridos se reducía drásticamente. Este artículo también informa que el terminal C de una lipasa pancreática humana es importante para la estabilidad interfacial.

10 Una lipasa preferida para soporte con actividad sobre fosfolípidos y galactolípidos pero sin actividad sobre triglicéridos puede obtenerse también modificando el pH óptimo de actividad de triglicérido. En condiciones normales el pH en una mezcla está comprendido en el intervalo entre 4,5 y 6,5. Ching T. Hou (*Journal of Industrial Microbiology*, 13 (1994) 242-248) identificó numerosas lipasas diferentes y descubrió numerosas lipasas con actividad de triglicérido a pH 7,5 pero sin actividad a pH 5,5.

15 Seleccionando una lipasa sin actividad es decir a pH 5,5 y modificando el área en torno a la zona activa mediante mutagénesis al azar dirigida a la zona o localizada para alterar las propiedades hidrófilas de la superficie alrededor de la zona activa y modificando la cubierta mediante mutagénesis al azar dirigida a la zona o localizada, es posible obtener una lipasa con afinidad sobre fosfolípidos y galactolípidos y siendo la actividad sobre el triglicérido restante
20 activa a pH 7,5 o superior, pero sin actividad a pH 6,5 o inferior, tal como a pH 5,5.

Las lipasas pueden presentar diferentes tipos de especificidad (informe vol. 8, nº 6 640-650). La especificidad para graso acilo de una lipasa tendrá un impacto sobre el tipo de ácido graso producido. Algunas lipasas son muy específicas para los ácidos grasos insaturados, que en un sistema de mezcla es preferido, ya que el ácido graso poliinsaturado es un sustrato para la lipoxigenasa endógena o añadida. Preferentemente, la enzima según la presente invención hidroliza de forma preferida los ácidos grasos insaturados. Propiamente, en el procedimiento de preparación o desarrollo de una enzima según la presente invención, la inserción, delección o sustitución altera la especificidad graso de acilo de la enzima, de modo que la enzima produce preferentemente ácidos grasos poliinsaturados en el grupo lípido.

30 Se presentan ejemplos adecuados de enzimas con actividad hidrolítica para con un fosfolípido y un glucolípido y que no presentan, o sustancialmente no presentan, actividad hidrolítica para con un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el apartado titulado Ejemplos a continuación.

Clonación de una secuencia nucleotídica que codifica una enzima según la presente invención

35 Una secuencia nucleotídica que codifica una enzima que tiene propiedades específicas como las definidas en la presente memoria o una enzima que es adecuada para la modificación puede aislarse de cualquier célula u organismo que produzca dicha enzima. Varios procedimientos son bien conocidos en la materia para el aislamiento de secuencias nucleotídicas.

40 Por ejemplo, un ADN genómico y/o un banco de ADNc pueden construirse utilizando ADN cromosómico o ARN mensajero a partir del organismo que produce la enzima. Si la secuencia de aminoácidos de la enzima es conocida, pueden sintetizarse sondas de oligonucleótido marcadas y utilizarse para identificar clones que codifican enzimas a partir del banco genómico preparado procedente del organismo. Alternativamente, una sonda de oligonucleótidos
45 marcada que contiene secuencias homólogas con otro gen de enzima conocido podría utilizarse para identificar los clones que codifican la enzima. En este último caso, se utilizan las condiciones de hibridación y lavado de severidad inferior.

Alternativamente, los clones que codifican enzimas podrían identificarse insertando fragmentos de ADN genómico
50 en un vector de expresión, tal como un plásmido, bacterias negativas para enzimas transformantes con el banco de ADN genómico resultante, y a continuación colocando en placas las bacterias transformadas sobre un sustrato que contiene agar-agar para la enzima (es decir, fosfolípidos o galactolípidos), permitiendo de este modo que los clones expresen la enzima que ha de identificarse.

55 En una alternativa más todavía, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima puede prepararse por síntesis mediante los procedimientos normalizados establecidos, p. ej. el procedimiento de la fosforoamidita descrito por Beucage S. L. *et al.* (1981) *Tetrahedron Letters* 22, pág. 1859-1869, o el procedimiento descrito por Matthes *et al.* (1984) *EMBO J.* 3, pág. 801-805. En el procedimiento de la fosforoamidita, se sintetizan oligonucleótidos, p. ej. en un sintetizador de ADN automático, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

60 La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico mixto y sintético, sintético mixto y de origen de ADNc genómico mixto y de origen de ADNc, preparada ligando fragmentos de origen de ADNc sintético o genómico (como proceda) según técnicas normalizadas. 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 (PCR) utilizando
65 cebadores específicos, por ejemplo como los descritos en la patente US nº 4.683.202 o en Saiki R. K. *et al.* (*Science* (1988) 239, págs. 487-491).

Secuencias nucleotídicas

La presente invención comprende asimismo las secuencias nucleotídicas que codifican enzimas que presentan las propiedades específicas definidas en la presente memoria. La expresión “secuencia nucleotídica” tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una secuencia de oligonucleótidos o a una secuencia de polinucleótidos, y sus variantes, homólogos, fragmentos y derivados (tales como partes de la misma). La secuencia nucleotídica puede ser de origen genómico, sintético o recombinante, la cual puede ser bicatenaria o monocatenaria, tanto represente la cadena transcrita como la complementaria.

La expresión “secuencia nucleotídica” en relación con la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN, preferentemente significa ADN, más preferentemente ADNc para la secuencia de codificación de la presente invención.

En una forma de realización preferida, la secuencia de nucleótidos *per se* que codifica una enzima que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria no comprende la secuencia nucleotídica natural en su medio natural cuando está ligada a su(s) secuencia(s) asociada(s) de forma natural que está(n) también en su(s) medio(s) natural(es). Para facilitar la referencia, los solicitantes denominarán a esta forma de realización preferida “secuencia nucleotídica no natural”. A este respecto, la expresión “secuencia nucleotídica natural” significa una secuencia nucleotídica completa que está en su medio natural y cuando está ligada operativamente a su activador completo con el que está asociada de forma natural, cuyo activador está también en su medio natural. Así, la enzima de la presente invención puede ser expresada por una secuencia nucleotídica en su organismo natural pero en el que la secuencia nucleotídica no está bajo el control del activador con el que está asociada de forma natural en este organismo.

Preferentemente la enzima no es una enzima natural. A este respecto, la expresión “enzima natural” significa una enzima completa que está en su medio natural y cuando ha sido expresada por su secuencia nucleotídica natural.

Típicamente, la secuencia nucleotídica que codifican las enzimas que presentan las propiedades específicas definidas en la presente memoria 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 podría sintetizarse, en conjunto o en parte, utilizando procedimientos químicos bien conocidos en la materia (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).

Secuencias de aminoácidos

La presente invención comprende asimismo secuencias de aminoácidos de enzimas que presentan las propiedades específicas 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 sinónimo del término “enzima”.

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

Propiamente, las secuencias de aminoácidos pueden obtenerse a partir de las enzimas aisladas dadas a conocer en la presente memoria por técnicas normalizadas.

Un procedimiento adecuado para determinar las secuencias de aminoácidos de enzimas aisladas es el siguiente:

La enzima purificada puede liofilizarse y 100 μ g del material liofilizado pueden disolverse en 50 μ l de una mezcla de urea 8 M y de bicarbonato amónico 0,4 M, pH 8,4. La proteína disuelta puede desnaturalizarse y reducirse durante 15 minutos a 500°C seguido de inertización con nitrógeno y adición de 5 μ l de ditiotreitol 45 mM. Tras el enfriamiento a temperatura ambiente, pueden añadirse 5 μ l de yodoacetamida 100 mM para que los restos de cisteína se modifiquen durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad bajo nitrógeno.

Pueden añadirse 135 μ l de agua y 5 μ g de endoproteinasa Lys-C en 5 Hl de agua a la mezcla de reacción anterior y la digestión puede realizarse a 37°C en nitrógeno durante 24 horas.

Los péptidos resultantes pueden separarse por HPLC en fase inversa en una columna VYDAC C18 (0,46×15 cm; 10 μ m; The Separation Group, California, USA) utilizando disolvente A: 0,1 t de TFA en agua y disolvente B: 0,1 k de TFA en acetonitrilo. Los péptidos seleccionados pueden volverse a cromatografiar en una columna Develosil C18 utilizando el mismo sistema disolvente, antes del secuenciado N-terminal. El secuenciado puede realizarse utilizando un secuenciador Applied Biosystems 476A que utiliza ciclos rápidos de líquido pulsado según las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, California, USA).

Variantes/homólogos/derivados

La presente invención comprende asimismo la utilización de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de una enzima que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifica dicha enzima. En esta memoria, el término “homólogo” significa una entidad que presenta una determinada homología con las presentes secuencias de aminoácidos y las presentes secuencias nucleotídicas. En esta memoria, el término “homología” puede ser sinónimo de “identidad”.

La secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos variante, homóloga o derivada debería proporcionar y/o codificar una enzima que conserve la actividad funcional y/o aumente la actividad enzimática.

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser por lo menos 75, 85 ó 90% idéntica, preferentemente por lo menos 95 ó 98% idéntica a la presente secuencia. Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas zonas activas, etc. que la presente secuencia de aminoácidos. Aunque la homología puede considerarse también desde el punto de vista de la similitud (es decir, restos de aminoácidos con propiedades/funciones químicas similares), en el contexto de la presente invención es preferible expresar la homología desde el punto de vista de identidad de secuencia.

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de nucleótidos que puede ser por lo menos 75, 85 ó 90% idéntica, preferentemente por lo menos 95 ó 98% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima de la presente invención (la secuencia sujeto). Típicamente, los homólogos comprenderán las mismas secuencias que codifican para los sitios activos, etc., como para la secuencia sujeto. Aunque la homología puede considerarse asimismo desde el punto de vista de la similitud (es decir, 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 identidad de secuencia.

Las comparaciones de homologías pueden realizarse a simple vista, o más frecuentemente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse en las secuencias contiguas, es decir, se alinea una secuencia con 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 una alineación “sin huecos”. Típicamente, dichas alineaciones sin huecos se realizan únicamente en un número relativamente corto de restos.

Aunque éste es un procedimiento muy sencillo y consistente, falla al considerar que, por ejemplo, en un par de secuencias de otro modo idénticas, una inserción o deleción dará lugar a que los restos de aminoácidos siguientes se coloquen fuera de la alineación, dando como resultado potencialmente de este modo una gran reducción del % de homología cuando se realiza una alineación global. Por consiguiente, la mayoría de procedimientos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineaciones óptimas que tengan en cuenta posibles inserciones y deleciones sin penalizar de forma indebida la puntuación de la homología global. Esto se consigue insertando “huecos” en la secuencia de alineamiento para tratar de maximizar la homología local.

Sin embargo, estos procedimientos más complejos asignan “penalizaciones de huecos” 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 la de muchos huecos. Se utilizan típicamente “costes de huecos afines” que cargan un coste relativamente alto para la existencia de un hueco y una penalidad más pequeña para cada resto posterior en el hueco. Éste es el sistema de puntuación de huecos utilizado más frecuentemente. Las penalizaciones altas por hueco producirán desde luego alineaciones optimizadas con menos huecos. La mayoría de los programas de alineación permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se utiliza dicho programa informático para las comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se utiliza el paquete GCG Wisconsin Bestfit la penalización de hueco por defecto para las secuencias de aminoácidos es -12 y para un hueco y -4 para cada prolongación.

El cálculo del % de homología máximo por consiguiente requiere en primer lugar la producción de una alineación óptima, teniendo en cuenta las penalizaciones por hueco. Un programa informático adecuado para realizar 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 secuencias incluyen, pero no se limita, al paquete BLAST (véase Ausubel *et al.* 1999 *Short Protocols in Molecular Biology*, 4^a ed. - capítulo 18), FASTA (Altschul *et al.* 1990 *J. Mol. Biol.* 403-410) y el GENWORKS continuación de las herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para la investigación fuera de línea y en línea (véase Ausubel *et al.*, 1999, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, para algunas aplicaciones, resulta preferido utilizar el programa GCG Bestfit. Una nueva herramienta, denominada secuencias de BLAST 2 está también disponibles para comparar la secuencia de proteínas y 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 % de homología final puede medirse desde el punto de vista de identidad, el propio procedimiento de alineación no está basado típicamente en una comparación del par todo o nada. En su lugar, se utiliza generalmente una matriz de puntuación de similitud a escala para asignar puntuaciones a cada comparación por pares basándose en la similitud química o en la distancia progresiva. Un ejemplo de dicha matriz utilizada normalmente es la matriz BLOSUM62, matriz por defecto para la continuación BLAST de los programas. Los programas GCG Wisconsin utilizan generalmente los valores publicados por defecto o una tabla de comparación de símbolos habitual, si se suministra (véase manual del usuario para más detalles). En algunas aplicaciones, resulta preferido utilizar los valores publicados por defecto para el paquete GCG, o en el caso de otro programa informático, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

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

Las secuencias pueden presentar también deleciones, inserciones o sustituciones de restos de aminoácidos que producen un cambio imperceptible y dan como resultado una sustancia operativamente equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden realizarse basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobia, hidrofilia y/o la naturaleza anfipática de los restos siempre que se conserve la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos con carga negativa comprenden el ácido aspártico y el ácido glutámico. Los aminoácidos con carga positiva comprenden la lisina y la arginina. Los aminoácidos con grupos polares principales sin carga que presentan valores de hidrofilia similares comprenden leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Pueden realizarse sustituciones conservadoras, por ejemplo según la Tabla siguiente. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y preferentemente la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICA	No polar	G A P I L V
	Polar sin carga	C S T M N Q
	Polar con carga	D E K R
AROMÁTICA		H F W Y

La presente invención comprende asimismo la sustitución homóloga (sustitución y reemplazamiento son utilizados ambos en la presente memoria para significar el intercambio de un resto de aminoácido existente, con un resto alternativo) que puede tener lugar, es decir, sustitución semejante por semejante tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución no homóloga puede también producirse, es decir, de una clase de resto a otra o alternativamente que implica la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (en lo sucesivo denominada Z), ácido diaminobutírico ornitina (en lo sucesivo denominado B), norleucina ornitina (en lo sucesivo denominado O), piriilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Los reemplazamientos que pueden realizarse también mediante aminoácidos no naturales incluyen; aminoácidos alfa* y alfa-disustituidos*, aminoácidos N-alquilo*, ácido láctico*, derivados de haluro de aminoácidos naturales tales como trifluorotirosina*, p-Cl-fenilalanina*, p-Br-fenilalanina*, p-I-fenilalanina*, L-alil-glicina*, β -alanina*, ácido L- α -amino butírico*, ácido L- γ -amino butírico*, ácido L- α -amino isobutírico*, ácido L- ϵ -amino caproico*, ácido 7-amino heptanoico*, L-metionina sulfona**, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina*, derivados metílicos de fenilalanina (Phe) tal como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (metil)*, L-Phe (4-isopropil)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico)*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-bencilo)*. La notación * se ha utilizado en aras de la exposición anterior (en relación con la sustitución homóloga o no homóloga), para indicar la naturaleza hidrófoba del derivado mientras que # se ha utilizado para indicar la naturaleza hidrófila del derivado, ** indica características anfipáticas.

Las secuencias de variante aminoácido pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden estar insertados entre cualquier restos de dos aminoácidos de la secuencia incluyendo grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos tales como restos de glicina o β -alanina. Una forma más de variación, implica la presencia de uno o más restos de aminoácidos en forma peptoide, serán bien comprendidos por los expertos en la materia. Para evitar dudas, "la forma peptoide" se utiliza para referirse a restos variantes de aminoácidos en los que el grupo sustituyente carbono α está en el átomo de nitrógeno el resto en lugar de en el carbono α . Los procedimientos para preparar péptidos en la forma peptoide son conocidos en la materia, 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 que codifican una enzima que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. Numerosos tipos diferentes de modifi-

cación para los oligonucleótidos son reconocidos en la materia. Éstos comprenden los ejes centrales de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para el objetivo de la presente invención, debe entenderse que las secuencias nucleotídicas descritas en la presente memoria pueden modificarse por cualquier procedimiento disponible en la materia. Dichas modificaciones pueden realizarse a fin de aumentar la actividad *in vivo* o la vida de las secuencias nucleotídicas.

La presente invención comprende asimismo la utilización de secuencias nucleotídicas que son complementarias con las secuencias expuestas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o modificación de las mismas. Si la secuencia es complementaria con un fragmento de la misma entonces esta secuencia puede utilizarse como sonda para identificar secuencias de codificación similares en otros organismos, etc.

Los polinucleótidos que no son 100% homólogos con las secuencias de la presente invención pero están comprendidos en el alcance de la invención pueden obtenerse de numerosas formas. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria pueden obtenerse por ejemplo sondando bancos de ADN preparados a partir de una gama de individuos, por ejemplo individuos de diferentes poblaciones. Además, otros homólogos víricos, bacterianos o celulares particularmente homólogos celulares conservados en células de mamíferos (p. ej. células de rata, ratón, bovinas y de primates), pueden obtenerse y dichos homólogos y sus fragmentos en general serán capaces de hibridarse selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias en la presente memoria. Dichas secuencias pueden obtenerse sondando bancos de ADNc preparados a partir de bancos de ADN genómico de otras especies animales y sondando dichos bancos con sondas que comprenden toda o parte de cualquiera de las secuencias en los listados de secuencias adjuntos en condiciones del medio de alta severidad. Consideraciones similares se aplican a la obtención de especies homólogas y de variantes alélicas de las secuencias polipeptídicas o nucleotídicas de la invención.

Pueden obtenerse también variantes y homólogos de cepas/especies utilizando PCR degenerada que utilizará cebadores diseñados para secuencias diana en las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas en las secuencias de la presente invención. Pueden preverse secuencias conservadas, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos de varios variantes/homólogos. Las alineaciones de la secuencia pueden realizarse utilizando programas informáticos conocidos en la materia. Por ejemplo se utiliza ampliamente el programa GCG Wisconsin PileUp.

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

Alternativamente, dichos polinucleótidos pueden obtenerse por mutagénesis dirigida al sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieran cambios imperceptibles de la secuencia del codón para optimizar las preferencias de codón para una célula hospedadora concreta en la que las secuencias de polinucleótido se están expresando. 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, p. ej., un cebador de PCR, un cebador para una reacción de ampliación alternativa, una sonda p. ej. marcada con un marcador visible por medios convencionales utilizando marcadores radioactivos o no radiactivos, o los polinucleótidos pueden ser clonados en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos serán 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 el término polinucleótidos de la invención como se utiliza en la presente memoria.

Los polinucleótidos tales como los polinucleótidos de ADN y las sondas según la invención pueden producirse de manera recombinante, sintética, o por cualquier medio disponible para los expertos en la materia. Pueden también clonarse por técnicas normalizadas.

En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, lo que implica una preparación por etapas de un nucleótido a la vez de la secuencia de ácidos nucleicos deseadas. Las técnicas para su realización que utilizan técnicas automáticas están disponibles fácilmente en la materia.

Los polinucleótidos más largos generalmente se producirán utilizando medios recombinantes, por ejemplo utilizando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implicará preparar un par de cebadores (p. ej., de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) que flanquean una zona de la secuencia de direccionamiento de lípidos que se desea clonar, poniendo los cebadores en contacto con ARNm o ADNc obtenidos de un animal o célula humana, realizando una reacción en cadena de la polimerasa en condiciones que realicen la ampliación de la zona deseada, el aislamiento del fragmento ampliado (p. ej. purificando la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperando el ADN ampliado. Los cebadores pueden diseñarse para que contengan zonas de reconocimiento de la enzima de restricción adecuada de modo que el ADN ampliado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado.

Hibridación

La presente invención comprende asimismo secuencias que son complementarias con las secuencias de la presente invención o secuencias que son capaces de hibridarse con las secuencias de la presente invención o con secuencias que son complementarias con éstas.

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

La presente invención comprende asimismo la utilización de secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridarse con las secuencias que son complementarias con las presentes secuencias expuestas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o modificación de las mismas.

El término “variante” comprende asimismo las secuencias que son complementarias con las secuencias que son susceptibles de hibridarse con las secuencias de nucleótidos expuestas en la presente memoria.

Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (T_m) del complejo que se une al nucleótido, tal como se da a conocer en Berger y Kimmel (1987, *Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology*, vol. 152, Academic Press, San Diego, CA), y proporcionan una “severidad” definida como se explica a continuación.

La máxima severidad tiene lugar típicamente a aproximadamente una T_m de -5°C (5°C inferior a la T_m de la sonda); la alta severidad a aproximadamente 5°C a 10°C inferior a T_m ; la severidad intermedia a aproximadamente 10°C a 20°C inferior a T_m ; y la baja severidad a aproximadamente 20°C a 25°C inferior a T_m . Como apreciarán los expertos en la materia, puede utilizarse una hibridación a severidad máxima para identificar o detectar secuencias nucleotídicas idénticas mientras que puede utilizarse una hibridación a severidad intermedia (o baja) para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas.

Preferentemente, el término “variante” comprende las secuencias que son complementarias con las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones de alta severidad o en condiciones de severidad intermedia con secuencias nucleotídicas que codifican enzimas que presentan las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

Más preferentemente, el término “variante” comprende las secuencias que son complementarias con las secuencias que son capaces de hibridarse en condiciones de alta severidad (p. ej. 65°C y $0,1\times\text{SSC}$ { $1\times\text{SSC} = \text{NaCl } 0,15 \text{ M}$, citrato-Na $0,015 \text{ M}$ pH $7,0$ }) con secuencias nucleotídicas que codifican enzimas que presentan las propiedades específicas definidas en la presente memoria.

La presente invención se refiere asimismo a secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos expuestas en la presente memoria (incluyendo las secuencias complementarias de las expuestas en la presente memoria).

La presente invención se refiere asimismo a secuencias de nucleótidos que son complementarias con las secuencias que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos expuestas en la presente memoria (incluyendo las secuencias complementarias de las expuestas en la presente memoria).

Asimismo están incluidas dentro del alcance de la presente invención las secuencias de polinucleótidos que son capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos expuestas en la presente memoria en condiciones de severidad intermedia a máxima.

En un aspecto preferido, la presente invención comprende secuencias nucleotídicas que son capaces de hibridarse con las secuencias nucleotídicas expuestas en la presente memoria, o con el complemento de las mismas, en condiciones de severidad (p. ej. 50°C y $0,2\times\text{SSC}$).

En un aspecto más preferido, la presente invención comprende secuencias nucleotídicas que pueden hibridarse con las secuencias nucleotídicas expuestas en la presente memoria, o con el complemento de las mismas, en condiciones de alta severidad (p. ej. 52°C y $0,1\times\text{SSC}$).

Mutagénesis dirigida al sitio

Una vez se ha aislado una secuencia nucleotídica que codifica enzimas y/o una secuencia de aminoácidos de la enzima, puede ser deseable mutar la secuencia para preparar una enzima con las propiedades deseadas de la presente invención o para mejorar las propiedades naturales de la enzima.

Pueden introducirse mutaciones utilizando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias nucleotídicas que flanquean los puntos de mutación deseados.

Un procedimiento adecuado se da a conocer en Morinaga *et al.* (*Biotechnology* (1984) 2, pág. 646-649), en el que un hueco de ADN monocatenario, la secuencia que codifica la enzima, se crea en un vector que lleva el gen de

la enzima. El nucleótido sintético, que lleva la mutación deseada, se hibrida a continuación con una parte homóloga del ADN monocatenario. El hueco restante se rellena a continuación con ADN polimerasa I (fragmento de Klenow) y el montaje se liga utilizando T4 ligasa. Otros procedimientos adecuados incluyen el procedimiento de mega prima mutagénesis de Sarkar G. y Sommer S. S. (1990 *BioTechniques* 1 8, 404-407) y el procedimiento QuickChange de Papworth *et al.* (1985 *Nucleic. Acids Res.* 13: 8765-8785).

La patente US nº 4.760.025 da a conocer la introducción de oligonucleótidos que codifican mutaciones múltiples realizando alteraciones menores de la casete. Sin embargo, una variedad aún mayor de variaciones puede introducirse en cualquier momento mediante el procedimiento de Morinaga mencionado anteriormente, debido a que puede introducirse una multitud de oligonucleótidos de varias longitudes.

Otro procedimiento para introducir mutaciones en las secuencias nucleotídicas que codifican enzimas se describe en Nelson y Long (*Analytical Biochemistry* (1989), 180, pág. 147-151). Este procedimiento implica la generación en 3 etapas de un fragmento de PCR que contiene la mutación deseada introducida utilizando una cadena de ADN sintetizada químicamente como uno de los cebadores en las reacciones de PCR. A partir del fragmento generado por PCR, puede aislarse un fragmento de ADN que lleva la mutación mediante escisión con endonucleasas de restricción y reinsertarse en un plásmido de expresión.

Además, Sierks *et al.* (*Protein Eng.* (1989) 2, 621-625 y *Protein Eng.* (1990) 3, 193-198) describen la mutagénesis dirigida al punto en glucoamilasa de *Aspergillus*.

Propiamente, una secuencia nucleotídica que codifica una lipasa (E.C. 3.1.1.3) o una acil hidrolasa lipolítica (E.C. 3.1.1.26) puede someterse a mutagénesis dirigida al sitio en la región externa y/o cerca del sitio activo y/o en el terminal C de la secuencia de aminoácidos.

Preferentemente, una secuencia nucleotídica que codifica una lipasa (E.C. 3.1.1.3) o una acil hidrolasa lipolítica (E.C. 3.1.1.26) puede someterse a mutagénesis dirigida al sitio cerca del sitio activo para alterar las propiedades hidrófilas de la superficie en torno al sitio activo.

30 *Mutagénesis al azar*

La PCR propensa a error puede realizarse, utilizando por ejemplo el kit de mutagénesis al azar por PCR Diversify™ de CLONTECH.

35 *Mutagénesis al azar localizada*

Puede sintetizarse un cebador mutágeno (oligonucleótido) el cual corresponde a la parte de la secuencia de ADN que debe mutarse excepto para el/los nucleótido(s) correspondiente(s) a el/los codón o codones de los aminoácidos que han de mutarse. El cebador contendrá, en el extremo 5' y 3', nucleótidos correspondientes a la secuencia que rodea la secuencia que ha de mutarse. En los codones que deben mutarse estarán presentes diferentes porcentajes de los cuatro nucleótidos diferentes en cada posición, proporcionando la posibilidad de codones para diferentes aminoácidos en las posiciones seleccionadas.

Posteriormente, el cebador mutágeno resultante puede utilizarse en una reacción de PCR con un cebador opuesto adecuado. El fragmento de PCR resultante puede clonarse, quizás después de alguna modificación adicional, en un vector adecuado, que contiene el resto de la zona de codificación del gen de interés.

Propiamente, una secuencia nucleotídica que codifica una lipasa (E.C. 3.1.1.3) o una acil hidrolasa lipolítica (E.C. 3.1.1.26) puede someterse a mutagénesis al azar localizada en la región externa y/o cerca del sitio activo y/o en el terminal C de la secuencia de aminoácidos.

Preferentemente, una secuencia nucleotídica que codifica una lipasa (E.C. 3.1.1.3) o una acil hidrolasa lipolítica (E.C. 3.1.1.26) puede someterse a mutagénesis dirigida al sitio cerca del sitio activo para alterar las propiedades hidrófilas de la superficie en torno al sitio activo.

55 *Expresión de enzimas*

Una secuencia nucleotídica que codifica una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria 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 que incluyen activadores/potenciadores y otras señales de regulación de la expresión. Pueden utilizarse activadores procarióticos y activadores funcionales en células eucarióticas. Puede utilizarse tejido específico o activadores específicos a los estímulos. Pueden utilizarse también activadores híbridos que comprenden elementos de la secuencia de dos o más activadores diferentes descritos anteriormente.

La enzima producida por una célula hospedadora recombinante mediante la expresión de la secuencia nucleotídica puede ser segregada o puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o del vector utilizado.

Pueden diseñarse secuencias de diversificación con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias que codifican la sustancia a través de una membrana de una célula procariótica o eucariótica determinada.

Vector de expresión

5 La expresión “vector de expresión” significa un montaje susceptible de expresión *in vivo* o *in vitro*.

Preferentemente, el vector de expresión está incorporado en el genoma del organismo. El término “incorporado” comprende preferentemente la incorporación estable en el genoma.

10 Preferentemente, el vector de la presente invención comprende un montaje según la presente invención. Expresado de otra forma, preferentemente una secuencia nucleotídica que codifica una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria está presente en un vector y en la que la secuencia nucleotídica está operativamente unida a las secuencias reguladoras de modo que las secuencias reguladoras son capaces de proporcionar la expresión de la secuencia nucleotídica por un organismo hospedador adecuado, es decir el vector es un vector de expresión.

Los vectores de la presente invención pueden transformarse en una célula hospedadora adecuada como se describe a continuación para proporcionar la expresión de un polipéptido o enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria. Así, en un aspecto adicional la invención proporciona un procedimiento para preparar polipéptidos para su utilización posterior según la presente invención que comprende cultivar una célula hospedadora transformada o transfectada con un vector de expresión tal como se describió anteriormente en condiciones que proporcionen la expresión por el vector de una secuencia de codificación que codifica los polipéptidos, y recuperando los polipéptidos expresados.

25 Los vectores pueden ser por ejemplo, vectores de plásmido, virus o fago provistos de un origen de replicación, opcionalmente un activador de la expresión de dicho polinucleótido y opcionalmente un regulador del activador. La selección del vector dependerá con frecuencia de la célula hospedadora en la que debe introducirse.

Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables. Los sistemas de selección más adecuados para los microorganismos industriales son los formados por el grupo de marcadores de selección que no requieren una mutación en el organismo hospedador. Los marcadores de selección adecuados pueden ser los genes *dal* procedentes de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o el que confiere resistencia a antibióticos tales como resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Los marcadores de selección alternativos pueden ser los marcadores de selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *sC*, o un marcador que da lugar a resistencia a la higromicina. Ejemplos de otros marcadores de selección micóticos son los genes para ATP sintetasa, subunidad 9 (*oliC*), orotidina-5'-fosfato-d Descarboxilasa (*pvrA*), resistencia a la fleomicina y benomilo (*benA*). Ejemplos de marcadores de selección no micóticos son el gen con resistencia a G418 bacteriano (éste puede utilizarse también en levadura, pero no en hongos filamentosos), el gen con resistencia a la ampicilina (*E. coli*), el gen con resistencia a la neomicina (*Bacillus*) y el gen *uidA* de *E. coli*, que codifican β -glucuronidasa (GUS). Los marcadores de selección adecuados adicionales incluyen los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*. Alternativamente, la selección puede realizarse por cotransformación (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 o transformar una célula hospedadora.

45 Así, las enzimas que codifican secuencias nucleotídicas con las propiedades específicas definidas en la presente memoria pueden incorporarse en un vector recombinante (típicamente un vector replicable) por ejemplo un vector de clonación o expresión. El vector puede utilizarse para replicar el ácido nucleico en una célula hospedadora compatible. Así en una forma de realización adicional, la invención proporciona un procedimiento de preparación de secuencias nucleotídicas que codifican enzimas con las propiedades específicas definidas en la presente memoria introduciendo una secuencia nucleotídica que codifica dicha enzima en un vector replicable, introduciendo el vector en una célula hospedadora compatible y cultivando la célula hospedadora en condiciones que llevan a cabo la replicación del vector. El vector puede recuperarse en la célula hospedadora. Las células hospedadoras adecuadas son las descritas a continuación en relación con los vectores de expresión.

Los procedimientos utilizados para ligar un montaje de ADN de la invención que codifica una enzima que presenta las propiedades específicas definidas en la presente memoria, y las secuencias reguladoras, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, son bien conocidos por los expertos en la materia (por ejemplo véase Sambrook *et al. Molecular Cloning: A laboratory Manual*, 2ª ed. (1989)).

El vector puede comprender además una secuencia nucleotídica que permite al vector replicarse en la célula hospedadora en cuestión. Ejemplos de dichas secuencias son los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

65 Secuencias reguladoras

En algunas aplicaciones, una secuencia nucleotídica que codifica una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede estar operativamente unida a una secuencia reguladora que es capaz de pro-

porcionar la expresión de la secuencia nucleotídica, tal como por 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.

5 La expresión “operativamente unida” se refiere a la yuxtaposición en la que los componentes descritos están 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.

10 La expresión “secuencia reguladora” comprende activadores y potenciadores y otras señales de regulación de la expresión.

El término “activador” se utiliza en el sentido normal de la técnica, p. ej. un punto de fijación de la ARN polimerasa.

15 La expresión mejorada de la secuencia nucleotídica que codifica la enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede conseguirse también mediante la selección de zonas reguladoras heterólogas, p. ej. zonas del activador, principal de secreción y terminadora, que sirven para aumentar la expresión y, si se desea, niveles de secreción de la proteína de interés procedentes del hospedador de expresión seleccionado y/o proporcionar el control inducible de la expresión de la enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria. En las eucariotas, las secuencias de poliadenilación pueden estar conectadas operativamente a la secuencia nucleotídica que codifica la enzima.

Preferentemente, la secuencia nucleotídica de la presente invención puede estar operativamente ligada por lo menos a un activador.

25 Aparte del activador natural para el gen que codifica la secuencia nucleotídica que codifica una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria, pueden utilizarse otros parámetros para dirigir la expresión de la enzima. El activador puede seleccionarse por su eficacia para dirigir la expresión de la secuencia nucleotídica de la presente invención en el hospedador de expresión deseado.

30 En otra forma de realización, puede seleccionarse un activador constitutivo para dirigir la expresión de la secuencia nucleotídica deseada. Dicho montaje de expresión puede proporcionar ventajas adicionales ya que soslaya la necesidad de cultivar los hospedadores de expresión en un medio que contiene un sustrato de inducción.

35 Ejemplos de activadores potentes constitutivos y/o inducibles que se prefieren para su utilización en hospedadores de expresión micótica son los que se pueden obtener a partir de los genes micóticos para los activadores de xilanas (*xlnA*), fitasa, ATP-sintetasa, subunidad 9 (*oliC*), triosa fosfato isomerasa (*tpi*), alcohol deshidrogenasa (*AdhA*), α -amilasa (*amy*), amiloglucosidasa (AG, del gen *glaA*), acetamidasa (*amdS*) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*gpd*). Otros ejemplos de activadores útiles para la transcripción en un hospedador micótico son los derivados del gen que codifica TAKA amilasa de *A. oryzae*, el activador de TPI (triosa fosfato isomerasa) de *S. cerevisiae* (Alber *et al.* (1982) *J. Mol. Appl. Genet.* 1, pág. 419-434), aspártico proteinasa de *Rhizomucor miehei*, α -amilasa neutra de *A. niger*, α -amilasa ácida estable de *A. niger*, glucoamilasa de *A. niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae* o acetamidasa de *A. nidulans*.

45 Ejemplos de activadores potentes de levadura son los que pueden obtenerse a partir de los genes para alcohol deshidrogenasa, lactasa, 3-fosfoglicerato cinasa y triosafosfato isomerasa.

50 Ejemplos de activadores bacterianos potentes son los activadores de α -amilasa y de *SP02* así como los activadores de genes de proteasa extracelular. Ejemplos de otros activadores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia nucleotídica especialmente en un hospedador bacteriano son los activadores del operón *lac* de *E. coli*, los activadores del gen *dagA* de agarasa de *Streptomyces coelicolor*, los activadores del gen de α -amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los activadores del gen de amilasa maltógeno (*amyM*) de *Bacillus starothermophilus*, los activadores de α -amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, los activadores de *xylA* de *Bacillus subtilis* y los genes *xylB*.

55 Pueden utilizarse también activadores híbridos para mejorar la regulación inducible del montaje de expresión.

60 El activador puede incluir además propiedades para asegurar o para aumentar la expresión en un hospedador adecuado. Por ejemplo, las propiedades pueden ser zonas conservadas tales como la secuencia de Pribnow o la secuencia TATA. El activador puede incluso contener otras secuencias que afecten (tal como que mantengan, aumenten, disminuyan) los niveles de expresión de la secuencia nucleotídica de la presente invención. Por ejemplo, otras secuencias adecuadas incluyen el intrón Sh1 o un intrón ADH. Otras secuencias incluyen elementos inducibles, tal como temperatura, producto químico, luz o elementos inducibles por estrés. Asimismo, elementos adecuados para aumentar la transcripción o traducción pueden estar presentes. Un ejemplo de este último elemento es la secuencia señal TMV 5' (véase Sleat 1987 *Gene* 217, 217-225 y Dawson 1993 *Plant Mol. Biol.* 23: 97).

65

Montajes

El término “montaje”, que es sinónimo de los términos tales como “conjugado”, “casete” e “híbrido”, incluye una secuencia nucleotídica que codifica una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria para su utilización según la presente invención directa o indirectamente unido a un activador. Un ejemplo de un acoplamiento indirecto es el aporte de un grupo espaciador adecuado tal como una secuencia de intrón, tal como la Sh1-intrón o el intrón ADH, intermedio del activador y la secuencia nucleotídica de la presente invención. Lo mismo vale 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 al activador del gen natural y cuando existen ambos en su medio natural.

El montaje puede contener o expresar incluso un marcador que permita la selección del montaje genético, por ejemplo, en una bacteria, preferentemente del género *Bacillus*, tal como *Bacillus subtilis*, o plantas en las que se haya transferido. Existen varios marcadores que pueden utilizarse, tales como por ejemplo los que codifican la manosa-6-fosfato isomerasa (especialmente para plantas) o los marcadores que proporcionan resistencia a antibióticos, p. ej. resistencia a G418, higromicina, bleomicina, kanamicina y gentamicina.

Para algunas aplicaciones, el montaje comprende preferentemente por lo menos una secuencia nucleotídica que codifica una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria operativamente unida a un activador.

Células hospedadoras

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

Así, una forma de realización adicional de la presente invención proporciona células hospedadoras transformadas o transfectadas con una secuencia nucleotídica que expresa una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria. Preferentemente dicha secuencia nucleotídica se lleva a cabo en un vector para la replicación y expresión de la secuencia nucleotídica. Las células se seleccionarán para que sean compatibles con dicho vector y pueden ser por ejemplo células procarióticas (por ejemplo bacterianas), micóticas, de levadura o vegetales.

La bacteria *E. coli* gram negativa se utiliza ampliamente como hospedadora para la expresión del gen heterólogo. Sin embargo, grandes cantidades de proteína heteróloga tienden a acumularse dentro de la célula. La purificación posterior de la proteína deseada procedente de del conjunto de proteínas intracelulares de *E. coli* puede a veces ser difícil.

A diferencia de *E. coli* las bacterias gram positivas del género *Bacillus*, tales como *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. brevis*, *B. stearothermophilus*, *B. alkalophilus*, *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. circulans*, *B. lautus*, *B. megaterium*, *B. thuringiensis*, *Streptomyces lividans* o *S. murinus*, pueden ser adecuadas como hospedadoras heterólogas debido a su capacidad para segregar proteínas en el medio de cultivo. Otras bacterias que pueden ser adecuadas como hospedadoras son las del género *Pseudomonas*.

Dependiendo de la naturaleza de la secuencia nucleotídica que codifica una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria, y/o el deseo de procesar más la proteína expresada, las hospedadoras eucarióticas tales como levaduras u otros hongos pueden resultar preferidas. En general, se prefieren células de levadura sobre células micóticas porque son más fáciles de manipular. Sin embargo, algunas proteínas se segregan muy poco en la célula de levadura, o en algunos casos no se procesan apropiadamente (p. ej. hiperglucosilación en levaduras). En estos casos, se debería seleccionar un organismo hospedador micótico diferente.

Los organismos de levaduras adecuados pueden seleccionarse de entre las especies de *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, p. ej. *Saccharomyces cerevisiae*, o *Hansenula* (dadas a conocer en la solicitud de patente UK n° 9927801.2).

Hongos filamentosos adecuados pueden ser por ejemplo una cepa que pertenece a una especie de *Aspergillus*, tal como *Aspergillus oryzae* o *Aspergillus niger*, o una cepa de *Fusarium oxysporium*, *Fusarium graminearum* (en estado perfecto denominada *Gibberella zeae*, anteriormente *Sphaeria zeae*, con *Gibberella roseum* y *Gibberella roseum* f. sp. *Cerealis*), o *Fusarium sulphureum* (en estado perfecto denominada *Gibberella puricaris*, sinónimo de *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium sambucium*, *Fusarium roseum* y *Fusarium roseum* var. *graminearum*), *Fusarium cerealis* (sinónimo de *Fusarium crockwellense*) o *Fusarium venenatum*.

A título de ejemplo, los hospedadores de expresión típica pueden seleccionarse de entre *Aspergillus niger*, *Aspergillus niger* var. *tubigenis*, *Aspergillus niger* var. *awamori*, *Aspergillus aculeatis*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula polymorpha*.

La utilización de células hospedadoras adecuadas (tales como células de levadura, micóticas y vegetales) puede proporcionar modificaciones después de la traducción (p. ej. miristoilación, glucosilación, truncamiento, lapidación y fosforilación de tirosina, serina o treonina) en la medida que pueda ser necesario para proporcionar actividad biológica óptima en los productos de expresión recombinante de la presente invención.

La célula hospedadora puede ser una cepa insuficiente de proteasa o con menos proteasa. Ésta puede ser por ejemplo la cepa insuficiente en proteasa JaL 125 de *Aspergillus oryzae* que tiene el gen de la proteasa alcalina denominado "alp" eliminado. Esta cepa se describe en el documento WO 97/35956.

Organismo

El término "organismo" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que pueda comprender una secuencia nucleotídica que codifique una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria y/o los productos obtenidos de la misma.

Los organismos adecuados pueden incluir un procarionta, hongo, levadura o un vegetal.

El término "organismo transgénico" en relación con la presente invención incluye cualquier organismo que comprenda una secuencia nucleotídica que codifique una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria y/o los productos obtenidos de la misma y/o en el que un activador puede permitir la expresión de la secuencia nucleotídica que codifica una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria dentro del organismo. Preferentemente la secuencia nucleotídica se incorpora en el genoma del organismo.

La expresión "organismo transgénico" no comprende las secuencias de codificación del nucleótido natural 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 cualquiera de entre una secuencia nucleotídica que codifica una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria, montajes como los definidos en la presente memoria, vectores como los definidos en la presente memoria, plásmidos como los definidos en la presente memoria, células como las definidas en la presente memoria o las combinaciones o los productos de las mismas. Por ejemplo el organismo transgénico puede comprender también una secuencia nucleotídica que codifica una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria bajo el control de un activador heterólogo.

Transformación de células hospedadoras/organismo

Como se indicó al principio, el organismo hospedador puede ser un organismo procariótico o eucariótico. Ejemplos de hospedadores procarióticos adecuados incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Las enseñanzas sobre la transformación de hospedadores procarióticos están bien documentadas en la técnica, por ejemplo véase Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) y Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995), John Wiley & Sons, Inc.

Si se utiliza un hospedador procariótico entonces puede ser necesario modificar propiamente la secuencia nucleotídica antes de la transformación, tal como por eliminación de intrones.

En otra forma de realización el organismo transgénico puede ser una levadura. A este respecto, se han utilizado ampliamente levaduras como vehículo para la expresión génica heteróloga. La especie *Saccharomyces cerevisiae* tiene un largo historial de utilización industrial, que incluye su utilización para la expresión del gen heterólogo. La expresión de genes heterólogos en *Saccharomyces cerevisiae* ha sido estudiada por Goodey *et al.* (1987, *Yeast Biotechnology*, D. R. Berry *et al.*, eds., págs. 401-429, Allen y Unwin, Londres) y por King *et al.* (1989, *Molecular and Cell Biology of Yeast*, E. F. Walton y G. T. Yarronton, eds., págs. 107-133, Blackie, Glasgow).

Por varias razones, *Saccharomyces cerevisiae* es muy aconsejable para la expresión génica heteróloga. En primer lugar, no es patógena para el hombre y es incapaz de producir determinadas endotoxinas. En segundo lugar, tiene un largo historial de utilización segura después de siglos de explotación comercial con varios fines. Esto ha conducido a una amplia aceptación por el público. En tercer lugar, la gran utilización comercial y la investigación dedicada al organismo ha dado como resultado un gran conocimiento sobre la genética y la fisiología así como de las características de la fermentación a gran escala de *Saccharomyces cerevisiae*.

Un estudio de los principio de la expresión génica heteróloga en *Saccharomyces cerevisiae* y de la secreción de productos génicos se da en 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, eds., 2ª edición, Academic Press Ltd.).

Varios tipos de vectores de levadura están disponibles, incluyendo los vectores integradores, que requieren combinación con el genoma del hospedador para su mantenimiento, y vectores plásmido de replicación automática.

A fin de preparar los *Saccharomyces* transgénicos, se preparan montajes de expresión insertando la secuencia nucleotídica de la presente invención en un montaje diseñado para la expresión en levaduras. Se han desarrollado varios tipos de montajes utilizados para la expresión heteróloga. Los montajes contienen un activador activo en levadura fusionado con la secuencia nucleotídica de la presente invención, normalmente se utiliza un activador de origen levadura, tal como el activador GAL1. Normalmente se utiliza una secuencia señal procedente de levadura, tal como la secuencia que codifica el péptido señal SUC2. Un terminador activo en la levadura finaliza el sistema de expresión.

Para la transformación de varias levaduras se han desarrollado protocolos de transformación. Por ejemplo, puede prepararse un *Saccharomyces* transgénico según la presente invención siguiendo las instrucciones 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 levaduras transformadas se seleccionan utilizando varios marcadores selectivos. Entre los marcadores utilizados para la transformación existen numerosos marcadores auxotróficos tales como LEU2, HIS4 y TRP1, y marcadores con resistencia a antibióticos dominantes tales como marcadores de antibióticos de aminoglucósido, p. ej. G418.

Las células de hongos filamentosos pueden transformarse mediante un procedimiento que implica la formación de protoplastos y la transformación de los protoplastos seguida de regeneración de la pared celular de una manera conocida. La utilización de *Aspergillus* como microorganismo hospedador se describe en el documento EP 0 238 023.

Otro organismo hospedador es una planta. El principio básico en la construcción de plantas modificadas genéticamente consiste en insertar información genética en el genoma de la planta para obtener un mantenimiento estable del material genético insertado. Existen varias técnicas para insertar la información genética, siendo los dos principios principales la introducción directa de la información genética y la introducción de la información genética mediante la utilización de un sistema de vector. Un estudio de las técnicas generales puede encontrarse en los artículos por 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). En el documento EP-A-0449375 pueden encontrarse más instrucciones sobre la transformación de plantas.

Las células huésped transformadas con la secuencia nucleotídica pueden cultivarse en condiciones que conduzcan a la producción de la enzima codificada y que faciliten la recuperación de la enzima de las células y/o del medio de cultivo.

El medio utilizado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar la célula hospedadora en cuestión y obtener la expresión de la enzima. Están disponibles medios adecuados en los proveedores comerciales o pueden prepararse según las recetas publicadas (p. ej. las descritas en los catálogos de la American Type Culture Collection).

La proteína producida por una célula recombinante puede presentarse en la superficie de la célula. Si se desea, y como deben apreciar los expertos en la materia, los vectores de expresión que contienen las secuencias de codificación pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias de codificación a través de una membrana de célula procariótica o eucariótica determinada. Otras construcciones recombinantes pueden unir la secuencia de codificación a la secuencia nucleotídica que codifica un dominio de polipéptidos que facilitará la purificación de las proteínas solubles (Kroll D. J. *et al.* (1993) *DNA Cell Biol.* 12:441-53).

La enzima puede ser segregada en las células hospedadoras y puede ser recuperada de manera conveniente del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos, que incluyen la separación de las células del medio por centrifugación o filtración, y que precipitan los componentes proteicos del medio mediante una sal tal como sulfato amónico, seguido de la utilización de procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad o similares.

Secreción

Con frecuencia, es deseable que la enzima sea segregada a partir del hospedador de expresión en el medio de cultivo del que la enzima puede recuperarse más fácilmente. Según la presente invención, la secuencia principal de secreción puede seleccionarse basándose en el hospedador de expresión deseado. Las secuencias señal híbridas pueden utilizarse también en el contexto de la presente invención.

Ejemplos típicos de secuencias principales de secreción heteróloga son los que se originan en el gen de amiloglucosidasa (AG) micótica (*glaA*, ambas versiones de 18 y 24 aminoácidos, p. ej. de *Aspergillus*), el gen del factor a (levaduras, p. ej. *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Hansenula*) o el gen de α -amilasa (*Bacillus*).

Proteínas de fusión

Una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede producirse como proteína de fusión, por ejemplo para ayudar en la extracción y purificación de la misma. Ejemplos de proteína de fusión asociada incluyen la glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de fijación y/o activación de la transcripción del

ADN) y (β -galactosidasa). Puede también ser conveniente incluir un punto de escisión proteolítico entre la proteína de fusión asociada y la secuencia proteica de interés para permitir la eliminación de las secuencias de la proteína de fusión. Preferentemente la proteína de fusión no ocultará la actividad de la secuencia proteica.

5 La proteína de fusión puede comprender un antígeno o un determinante antigénico fusionado con la enzima. En esta forma de realización, la proteína de fusión puede ser una proteína de fusión no natural que comprenda una sustancia que puede actuar como adyuvante en el sentido de proporcionar una estimulación generalizada del sistema inmunitario. El antígeno o determinante antigénico puede estar unido a ambos terminales amino o carboxi de la enzima.

10 En otra forma de realización de la invención, la secuencia de aminoácidos de una enzima con las propiedades específicas definidas en la presente memoria puede estar ligada a una secuencia heteróloga para codificar una proteína de fusión.

Ejemplos

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

la Figura 1, que presenta un gel de PAGE natural;

20 la Figura 2, que presenta un zimograma de galactolípido (DGDG);

la Figura 3, que presenta un gel de SDS-PAGE;

25 la Figura 4, que presenta un gráfico del efecto de la LAH 1 de la judía de vaca en la masa;

la Figura 5, que presenta un gráfico del análisis por HPLC de galactolípidos en la masa tratada con LAH de judía de vaca;

30 la Figura 6, que presenta un gráfico del análisis por HPLC de fosfolípidos en la masa tratada con LAH de judía de vaca;

la Figura 7, que presenta un gráfico del análisis por GLC de lípidos no polares en la masa tratada con LAH de judía de vaca;

35 la Figura 8, que presenta una fotografía de minipan en la que la barra 14 tenía 2% de aceite de soja y la barra 15 tenía 2% de aceite de soja + 1,07 unidades/kg de LAH de judía de vaca añadida;

40 la Figura 9, que presenta una fotografía de minipan en la que la barra 9 es la referencia; a la barra 10 se había añadido 1,07 unidades/kg de LAH de judía de vaca; a la barra 11 se había añadido 1,07 unidades/kg de LAH de judía de vaca + 0,1% de galactolípidos; a la barra 12 se había añadido 1,07 unidades/kg de LAH de judía de vaca + 0,2% de galactolípido; y a la barra 13 se había añadido 1,07 unidades/kg de LAH de judía de vaca + 0,4% de galactolípido;

45 la Figura 10, que presenta una fotografía de minipan en la que la barra 1 es la referencia; a la barra 2 se había añadido 0,4% de DGDG; a la barra 3 se había añadido 0,4% de DGDG + 0,4 unidades/g de LAH de judía de vaca y a la barra 4 se había añadido 0,4 unidades/g de LAH de judía de vaca;

50 la Figura 11, que presenta un vector de expresión que fue derivado del pYES2. El activador Gal1 de pYES2 se eliminó y sustituyó por el activador ADH constitutivo. Se incorporó *LipA* mediante recombinación *in vivo* en *Saccharomyces cerevisiae*. Abreviaturas: Amp, gen resistente a la ampicilina; ADH^{3'}, zona 3' de alcohol deshidrogenasa; ADH_p, activador del gen de alcohol deshidrogenasa; bps, pares de bases; *CYC1*, terminador de transcripción; *f1 ori*, origen de *f1*; *Gallp*, activador del gen de galactosa; *LipA*, gen de lipasa de *Aspergillus tubigensis*; MCS, punto de clonación múltiple; pMB1 ori, origen derivado de pUC, *ura3*, gen que codifica uracilo, *2 μ ori*, origen de *2 μ*;

55 la Figura 12, que presenta un perfil Maldi-TOF de la enzima acil hidrolasa lipolítica de la judía de vaca identificado utilizando el procedimiento detallado en la presente memoria; y

la Figura 13, que presenta un perfil de péptido para VUPAT 1 (Matos *et al. FEBS Letters* 491 (2001) 188-192).

60 Materiales y Procedimientos

Enzimas:

65 Acil hidrolasa lipídica (LAH) purificada de judía de vaca

Galactolipasa aislada unida a la membrana de tilacoides de trigo

ES 2 284 897 T3

Harina:

Harina "Sølvmel" de Danish n° 2001084

5 Sustrato:

Digalactosildiglicérido, DGDG (pureza del 55%) lote KGL01013, de Lipid Technologies Provider, Karlshamn, Suecia.

10 *Procedimientos*

Enzima acil hidrolasa lipolítica de judía de vaca (E.C. 3.1.1.26)

Material vegetal

15

Una acil hidrolasa lipolítica (LAH) capaz de hidrolizar un glucolípido y un fosfolípido, pero incapaz, o sustancialmente incapaz, de hidrolizar un triglicérido y/o un 1-monoglicérido, se aisló de la judía de vaca. Se obtuvieron acil hidrolasas lipolíticas por un procedimiento basado en el descrito en Sahrah et al. (*Biochemica et Biophysica Acta* 1215 (1994) 66-73). Un procedimiento adecuado alternativo puede ser el descrito en Matos et al. (*FEBS Letters* 491 (2001) 188-192).

20

Se adquirieron judías de vaca de Morelos, Méjico. Se cultivaron las plantas en piedras Leca y se regaron con solución nutriente mineral según Ellfolk, *Biochim. Biophys. Acta* 192 (1969) 486-493 (enriquecido con nitrato de potasio 6 mM), en una cámara de cultivo, en vasijas de 35 × 50 cm de dimensión (aprox. 50 plantas en cada vasija), en condiciones controladas de temperatura y luz (16 horas a la luz del día a 22°C y 8 horas en la oscuridad a 18°C con una humedad relativa del aire del 72%). Se recogieron las hojas después de 21 días de cultivo. En el momento del cultivo las plantas tenían 4 a 7 hojas maduras totalmente abiertas y 3 a 8 hojas jóvenes.

25

Extracción de enzimas de acil hidrolasa lipolítica de las hojas

30

Se homogeneizaron en un mezclador industrial 215 g de hojas frescas congeladas en nitrógeno líquido y se extrajeron en 500 ml de tampón TRIS 5 mM (pH 7,0), utilizando un mezclador industrial (3 minutos de mezclado). Los materiales insolubles se eliminaron mediante centrifugación de 20 minutos a 15.000 g. El sobrenadante resultante se filtró por último a través de un filtro de 0,45 µm (se recogieron 605 ml de extracto en bruto).

35

Purificación de enzimas acil hidrolasa lipolíticas

Etapa 1

40

Ultrafiltración

Esta etapa se realizó, utilizando una unidad de ultrafiltración Amicon de 50 kDa. Se recogieron 122 ml de extracto en bruto concentrado.

45

Etapa 2

Precipitación con sulfato amónico

50

Se añadió sulfato amónico sólido (68,5 g) al extracto en bruto hasta una concentración final del 80% de saturación. Se dejó agitando la mezcla durante 60 minutos a temperatura ambiente (25°C). La proteína precipitada se recogió por centrifugación a 15.000 g durante 20 minutos. Se redisolvió el precipitante en 30 ml de tampón TEA 20 mM (pH 7,3). El material insoluble se separó por centrifugación a 15.000 g durante 20 minutos.

55

Etapa 3

Desalado (GFC)

60

Se desaló el sobrenadante en una columna Sephadex G-25 (5 × 25 cm, Pharmacia, Suecia), que se equilibró con TEA 20 mM (pH 7,3) a un caudal de 15 ml/min. Las fracciones que contienen actividad de galactolipasa, (pico de proteína) se mezclaron (100 ml).

Etapa 4

65

Cromatografía por intercambio iónico (IEC)

La muestra desalada se aplicó a continuación a Q-Sepharose Fast Flow (5 × 6 cm, Pharmacia, Suecia), se equilibró con TEA 20 mM (pH 7,3) a un caudal de 16 ml/minuto. Para eliminar las proteínas no unidas, se lavó la columna con 250 ml del mismo tampón, y las proteínas unidas se eluyeron mediante un gradiente lineal de NaCl 0-0,6 M en

ES 2 284 897 T3

el mismo tampón. Se recogieron fracciones de 16 ml y se analizó la actividad de galactolipasa. Las fracciones que contenían actividad de galactolipasa se mezclaron (128 ml).

Etapa 5

Ultrafiltración

Esta etapa se realizó como se describe en la etapa 1.

Se recogió una muestra desalada/concentrada de 16 ml ($V_{\text{máx}}$: 5,6 m D.O./min. o 0,010 U/ml).

Se realizaron pruebas de horneado con una muestra procedente de esta etapa.

Etapa 6

Cromatografía de intercambio iónico (IEC)

La muestra desalada/concentrada (11 ml) se aplicó a continuación a una Poros Q10 (0,5 × 5 cm, Applied Biosystem, USA), equilibrada con el mismo tampón utilizado en la etapa 4, a un caudal de 1,5 ml/minuto. Las proteínas unidas se eluyeron mediante un gradiente lineal de NaCl 0-0,65 M en el mismo tampón. Se recogieron fracciones de 1,5 ml y se analizó la actividad de galactolipasa. Las fracciones que contenían actividad de galactolipasa se mezclaron (6 ml).

Caracterización de la enzima acil hidrolasa lipolítica de judía de vaca

Análisis SDS-PAGE, determinación de la pureza y peso molecular:

Acil hidrolasa lipolítica purificada procedente de IEC (etapa 6) se aplicó a un gel (NU-PAGE, 4 al 12%, tampón MES, Novex, USA) y el gel se tiñó a continuación con coomassie. El gel puso de manifiesto la existencia de varias bandas (véase Figura 1). Intentos para purificar más la acil hidrolasa lipolítica utilizando varias técnicas cromatográficas tales como filtración en gel, cromatografía, cromatografía con interacción hidrófoba, cromatoenfoque, etc. no mejoraron la pureza de la acil hidrolasa lipolítica.

Determinación del peso molecular y electroelución de acil hidrolasa lipolítica después de PAGE natural:

Se purificó acil hidrolasa lipolítica procedente de judía de vaca (*Vigna unguiculata*) según Sahrah et al. (*Biochim. Biophys. Acta* 1215 (1994) 66-73). La acil hidrolasa lipolítica eluida por difusión se sometió a continuación a una SDS-PAGE en gel. El gel se tiñó con coomassie. Este gel puso de manifiesto 2 bandas principales a 57 y 84 kDa (véase la Figura 3).

Esta preparación se sometió a digestión con tripsina utilizando el protocolo siguiente:

1. Se añaden 50 μ l de urea 8 M en tampón de bicarbonato amónico 0,4 M pH 8,1 (24,04 g de urea, 1,581 g de bicarbonato amónico para 50 ml)
2. Se cubre con nitrógeno y se incuban a 50°C durante 5 minutos.
3. Se añaden 5 μ l de DTT 50 mM (8 mg/ml de agua)
4. Se mezcla bien, se cubre con nitrógeno y se incuba a 50°C durante 15 minutos.
5. Se enfría a temperatura ambiente.
6. Se añaden 5 μ l de yodoacetamida 100 mM (19 mg/ml de agua).
7. Se mezcla bien, se cubre con nitrógeno y se incuban en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos.
8. Se añaden 140 μ l de agua, se mezcla bien y se añade tripsina a 1:25 (la tripsina se almacena a -20°C a 1 μ g/ μ l en TFA al 0,1%).
9. Se cubre con nitrógeno y se incuba durante la noche a 37°C.
10. Se interrumpe la reacción por congelación a -20°C.
11. Se recuperan los péptidos por HPLC en fase inversa utilizando una columna C18.

ES 2 284 897 T3

Identificación del péptido después de la digestión utilizando puntas de desalado C18 ZipTip™:

- A. Se humedece la punta aspirando en metanol $4 \times 10 \mu\text{l}$.
- 5 B. Se equilibra la punta lavando con $5 \times 10 \mu\text{l}$ con TFA al 0,1% en agua.
- C. Se unen los péptidos aspirando $20\times$ en la solución de digestión de la proteína.
- 10 D. Se eliminan las sales lavando con $10 \times 10 \mu\text{l}$ de TFA al 0,1% en agua.
- E. Se eluyen los péptidos directamente en una placa diana Maldi-TOF con $2 \mu\text{l}$ de 10 mg/ml de ácido α -ciano-4-hidroxycinnámico en TFA al 0,1% en 60% de acetonitrilo/agua.
- 15 F. Se determina el peso molecular de los péptidos utilizando un espectrómetro de masas Voyage DE Maldi-TOF.

Los resultados del análisis Maldi-TOF se representan en la Figura 12.

20 Una comparación entre el perfil del péptido teórico (véase la Figura 13) para VUPAT 1 (como se da a conocer en Matos *et al.* *FEBS Letters* 491 (2001) 188-192) y el perfil del péptido obtenido experimentalmente para la acil hidrolasa lipolítica de la judía de vaca obtenida en la presente memoria demuestra que la acil hidrolasa lipolítica purificada en la presente memoria es una proteína diferente de la dada a conocer en Matos *et al.* Esto se confirma también mediante los pesos moleculares determinados por SDS-PAGE. En este estudio se determina un peso molecular de 57 y 84 kDa contrario a un peso molecular de 40 kDa publicado por Sahseh *et al.*

25 *Acil hidrolasa lipolítica unida a la membrana procedente de tilacoides de hojas de trigo*

Material vegetal

30 Se adquirió trigo (Herward) en Pajbjergfonden, Odder, Dinamarca. Se cultivaron los granos de trigo en papel a 25°C y se regaron regularmente. Después de una semana se recogieron las hojas de trigo.

Tampón de homogeneización

35 HEPES 50 mM, sorbitol 350 mM, EDTA 1 mM, MgCl_2 1 mM, MnCl_2 1 mM de DTT 1 mM, pH 8,3/NaOH). El tampón se mantuvo en hielo antes de su utilización.

Extracción de acil hidrolasa lipolítica unida a la membrana

40 Se cortaron 26 g de hojas de trigo en pequeñas piezas (1/2 cm). Se añadieron 78 ml de tampón de homogeneización enfriado en hielo. Se homogeneizaron las hojas en un Ultra Turrax Mixer durante 12 segundos.

Se separaron las partículas grandes por filtración a través de 3 capas de tejido Kleenex. Se centrifugó el filtrado en 250 g durante 1 minuto y se aisló el sobrenadante.

45 Se aislaron los cloroplastos por centrifugación durante 5 minutos a 1.000 g. Los sedimentos (que comprenden acil hidrolasa lipolítica unida a la membrana) se volvieron a poner en suspensión en 1 ml de tampón de homogeneización (el análisis al microscopio mostró claramente los cloroplastos).

50 Se utilizaron los sedimentos para experimentación en el sistema de masa del modelo de trigo.

Prueba de mini horneado

55 Se añadieron los siguientes ingredientes a una vasija de mezclado Brabender de 50 g y se amasaron durante 5 minutos a 30°C : 50 g de harina, 1,0 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 10 min. a 34°C . Se pesaron 15 g de masa por masa. A continuación se moldearon en un dispositivo especial donde la masa se aplanó entre una lámina de madera y un bastidor de Plexiglas. Las masas se sumergieron en recipientes de aluminio durante 45 min. a 34°C , y se hornearon en un horno doméstico Voss durante 8 min. a 225°C .

60 Tras el horneado se enfriaron los panes a temperatura ambiente y después de 20 min. Se pesaron los panes y se determinó el volumen por el procedimiento de desplazamiento de la colza.

65 Se cortaron también los panes y se evaluó la miga y la corteza.

ES 2 284 897 T3

Masa del modelo

Se mezclaron 10 g de harina y 0,020 g de cloruro sódico en una vasija de mezclado Farinograph de 10 g durante 1 minuto con o sin enzimas. Posteriormente se añadió agua (500 unidades Brabender) y se mezclaron durante 5 minutos a 30°C. Tras el mezclado se colocó la masa a 32°C durante 1 hora, y a continuación se congeló y se liofilizó antes del análisis posterior.

Pruebas de horneado (panecillos daneses)

1.500 g de harina, reforma danesa, 90 g de levadura comprimida, 24 g de azúcar, 24 gramos de sal, 400 unidades Brabender de agua + 2% se amasaron en un mezclador Hobart™ con gancho durante 2 minutos a baja velocidad y 9 minutos a alta velocidad. La temperatura de la masa fue de 26°C. Se pesaron 1.350 gramos de masa. Se dejaron en reposo 10 min. a 30°C y se moldearon en un moldeador Fortuna. Se sumergió la masa 45 min. a 34°C. Se horneó la masa en un horno Bago 18 min. a 220°C y se coció al vapor durante 12 s.

Después de enfriar los panecillos se pesaron y se midió el volumen de los panecillos por el procedimiento de desplazamiento de la colza.

Volumen específico del pan

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

Se evaluaron también los parámetros de calidad de la masa

Elasticidad de la masa	1-10
Adhesividad	1-10

Pruebas de horneado (pan tostado)

2.000 g de harina, reforma danesa, 30 g de levadura seca, 30 g de azúcar, 30 gramos de sal, 400 unidades Brabender de agua + 3% se amasaron en un mezclador Hobart™ con gancho durante 2 min a baja velocidad y 10 min a alta velocidad. La temperatura de la masa tras el mezclado fue de 25°C. El tiempo de reposo fue de 10 min a 30°C. Se pesaron 750 gramos de masa. Se dejaron en reposo durante 5 min. a 33°C y 85% HR. Se moldeó la masa en un moldeador Glimik. Se sumergieron las masas en latas durante 50 min. a 33°C y se horneó en un horno Wachtel 40 min. a 220°C e inyección de vapor durante 16 s.

Después de enfriar el pan se pesó y se midió el volumen del pan por el procedimiento de desplazamiento de la colza.

Asimismo se evaluó subjetivamente la miga en una escala 1 a 10, en la que 1 = claramente no homogénea y 10 = muy homogénea.

Tres panes horneados en latas con tapas se almacenaron a 20°C y se utilizaron para mediciones de consistencia.

Consistencia

Se midió la consistencia del pan en un Instron™ M modelo 4301 conectado a un ordenador.

Condiciones para la medición de la consistencia del pan:

Celda cargada	100 N máx.
Diámetro del pistón	50 mm
Velocidad del cabezal cruzado	200 mm/min.
Compresión	25%
Espesor de la rebanada de pan	11 mm

La fuerza se convierte a N/dm².

El resultado fue una media de la medida en 10 rebanadas de pan para cada pan.

Extracción de lípidos y análisis de ácidos grasos

Se congeló inmediatamente 10 g de masa totalmente sumergida y se liofilizó. La masa liofilizada se molió en un molinillo de café y se pasó a través de un tamiz de 800 micras. Se pesaron 1,5 g de masa liofilizada en un tubo

ES 2 284 897 T3

de centrifugadora de 15 ml con tapa superior de tornillo. Se añadieron 7,5 ml de butanol saturado de agua (WSB). Se colocó el tubo de centrifugadora en un baño de agua hirviendo durante 10 minutos. Se colocaron los tubos en un Rotamix y se dieron vueltas a 45 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente y a continuación se colocaron en un baño de agua hirviendo de nuevo durante 10 minutos más antes de darles vueltas en el Rotamix durante 30 minutos más a temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos a 3.500 g durante 5 minutos. Se transfirieron 5 ml de sobrenadante a un vial y el WSB se evaporó a sequedad bajo una corriente de nitrógeno.

Los ácidos grasos libres en el extracto se analizaron como sales de Cu en isoocetano medidos a 715 nm y cuantificados según la curva de calibración basada en el ácido oleico (Kwon D. Y. y Rhee J. S. (1986), *A simple and rapid Colourimetric Method for Determination of Free Fatty Acids for Lipase Assay*, JAOCS 63:89).

Determinación de glucolípidos y fosfolípidos por HPLC

1. Condiciones cromatográficas

15

20

25

30

35

40

Sistema	Waters 600					
Columna	(LiChrospher®100 DIOL 5 µl) LiChroCART®	L×D: 250×4,0 mm id.			Temp.: 50°C	
Inyector	Waters 717 más automuestreador					Vol.: 15 µl
Detector	Alltech 500 ELSD, dispersión evaporativa de la luz					Temp.: 80°C Caudal de gas: 1,50 l/min m/MFC
Integrador	Waters Millennium					
Fase móvil	A: 1.000 heptano/15 CH ₃ COOH B: 500 heptano/500 isopropanol/15 CH ₃ COOH C: 300 heptano/600 isopropanol/100 H ₂ O/15 CH ₃ COOH					Caudal: 1,25 ml/min Presión: 1.000-2.500 psi
Gradiente	Caudal	Tiempo (min.)	% A	% B	% C	Comentarios
	1,25	0	100	0	0	
	1,25	10	60	40	0	
	1,25	25	20	30	50	
	1,25	35	0	0	100	
	1,25	38	0	90	10	
	1,25	40	30	70	0	
	1,25	45	100	0	0	
	1,25	55	100	0	0	nueva inyección

2. Solución madre

45

Se disolvió ILPS* patrón en CHCl₃/CH₃OH (75/25) ~2 mg/ml PC

Dilución de la solución madre: 0,7, 0,14 y 0,028,

50

*ácido fosfatídico	PA	5,13%
fosfatidiletanolamina	PE	12,74%
fosfatidilcolina	PC	14,76%
fosfatidilinositol	PI	10,13%

55

*ILPS (International Lecithin and Phospholipid Society) patrón se adquiere en Spectral Service GmbH Colonia, Alemania.

60

3. Preparación de la muestra

Se disolvieron las muestras en CHCl₃/CH₃OH (75/25), se trataron con ultrasonidos y se filtraron a través de un filtro 0,45 µm.

65

ES 2 284 897 T3

4. Modelo de calibración

Modelo de calibración: calibración lineal log-log

5 Se utilizó la curva de calibración para PC para calcular las cantidades de glucolípidos y fosfolípidos.

Cromatografía de gases

10 Cromatografía de gases capilar Perkin Elmer 8420 equipada con columna de sílice fundida WCOT 12,5 m × 0,25 mm DI × fenil-metil-silicona al 5% de 0,1 μm (CP Sil 8 CB de Crompack).

Portador: helio.

Inyección: 1,5 μl con reparto.

15 Detector: FID. 385°C.

Programa del horno:

	1	2	3	4
Temperatura del horno, °C.	80	200	240	360
Isoterma, tiempo, min.	2	0	0	10
Ritmo de temperatura, °C/min.	20	10	12	

25 Preparación de la muestra: Se disolvieron 50 mg de lípido de trigo en 12 ml de heptano:piridina 2:1 que contenía un patrón interno de heptadecano, 2 mg/ml. Se transfirieron 500 μl de la muestra a un vial embutido. Se añadieron 100 μl de MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) y se incubó la reacción durante 15 minutos a 90°C.

30 Cálculo: se determinaron los factores de respuesta para los mono-di-triglicéridos y los ácidos grasos libres a partir de las mezclas de referencia de estos componentes. Basándose en estos factores de respuesta se calcularon los mono-di-triglicéridos y los ácidos grasos libres en los lípidos de trigo.

Ensayo de zimograma (placa de siembra) de galactolípido (DGDG)

Preparación de las placas

35 Solución 1

Se disolvieron 2 g de agarosa en 100 ml de agua por calentamiento entre 90 y 100°C.

40 Solución 2

Se dispersaron 1,2 g de galactolípido en 40 ml de agua desmineralizada. Se añadieron 50 ml de tampón fosfato 0,1 M pH 7, posteriormente se añadió también 0,6 ml de rodamina B al 0,2%.

45 Se enfrió la solución 1 a aprox. 70°C y se añadió la solución 2 en agitación. Se transfirieron 12 ml de la mezcla final a una placa Petri de 7 cm.

Se almacenaron las placas a 5°C hasta su utilización.

50 Ensayo

Se punzaron pequeños agujeros de 1 mm de diámetro del gel y se transfirieron 10 μl de la solución enzimática al orificio. Se hizo seguimiento de la formación de halos en los geles de agarosa en función del tiempo.

55 Se añadió también un blanco sin enzima a uno de los orificios para comparación.

Ensayo de actividad enzimática

60 Preparación del sustrato para el ensayo enzimático: se disolvió el sustrato, pNP-caprato (C10), en etanol y se diluyó en tampón de fosfato Na 100 mM (pH 6,3) hasta una concentración final de 0,1 mg/ml de sustrato y 30% de etanol respectivamente, y se mantuvo a temperatura ambiente.

65 Procedimiento de ensayo: la mezcla de ensayo enzimático contenía 30 μl de muestra/blanco y 250 μl de sustrato. Se incubó la mezcla a 35°C durante 30 minutos (420 nm) mientras se realizaba simultáneamente un programa cinético ELISA-lector (420 nm). El valor $V_{\text{máx}}$ se utilizó para el cálculo de la actividad enzimática (U/ml). Se convirtió $V_{\text{máx}}$ en μmoles de una curva patrón para las soluciones de pNP medidas en las mismas condiciones que la muestra. La actividad enzimática se define como la cantidad de enzima que produce 1 μmol de pNP por min. a 35°C.

ES 2 284 897 T3

Procedimiento de cribado para mutagénesis al azar

Bancos de enzimas obtenidos en mutagénesis aleatoria o mutagénesis aleatoria localizada pueden extenderse sobre filtros de acetato de celulosa en placas de agar-agar que contienen medio de cultivo e incubarse.

Los filtros de acetato de celulosa se transfieren a continuación a las placas de selección y se incuban a 37°C durante 2 a 6 horas. Las celdas que albergan enzima activa en las condiciones dadas desarrollarán zonas claras alrededor de las colonias. Las variantes positivas pueden purificarse y analizarse más a continuación.

10 *Resultados*

Ejemplo 1

En la primera serie de experimentos de la masa se ensayó LAH de judía de vaca purificada en 10 g de masa a diferentes concentraciones para probar la actividad de la enzima en la masa y para encontrar una dosis adecuada para los experimentos de horneado. Se midió la actividad de la enzima analizando la concentración de ácido graso libre en la masa. En la Tabla 1 y en la Fig. 4 se presentan los resultados.

TABLA 1

Efecto de LAH de judía de vaca en la masa del modelo

LAH de judía de vaca	Ácido graso en la masa
Unidades/kg de harina	‰
3	3,44
0,6	2,55
0,12	2,13
0,024	1,78
0,0048	1,66
0	1,77

Los resultados detallados en la Tabla 1 y en la Fig. 4 demuestran claramente que LAH de judía de vaca es activa en la masa durante la producción de ácidos grasos libres.

Los lípidos extraídos de la masa se continuaron analizando por HPLC para estudiar el efecto sobre los lípidos polares en la masa.

Los resultados de los análisis de HPLC de los lípidos de la masa se presentan en la Tabla 2 y en las Figuras 5 y 6.

TABLA 2

Análisis HPLC de lípidos polares en la masa

LAH de judía de vaca	‰	‰	‰	‰
Unidades/kg de harina	DGDG	PC	DGMG	LPC
0	2,11	0,37	0,19	1,36
0,0048	2,22	0,52	0,20	1,50
0,024	2,12	0,48	0,23	1,51
0,12	1,84	0,35	0,26	1,37
0,6	1,08	0,29	0,30	1,30
3,0	0,30	0,00	0,11	1,19

Los lípidos apolares se analizaron por GLC. En la Fig. 7 se presentan los resultados de este análisis.

El análisis HPLC presenta claramente el efecto de LAH de judía de vaca sobre los galactolípidos, y a una dosis alta de enzima el digalactosildiglicérido (DGDG) está casi completamente hidrolizado. Los resultados también presentan un pequeño aumento en la concentración del correspondiente monoéster, DGMG. A un aumento de concentración de LAH de judía de vaca, DGMG está sin embargo también hidrolizado. En la misma fotografía se observa también para fosfatidilcolina (PC) que está hidrolizada, seguido de un pequeño aumento en la lisofosfatidilcolina correspondiente. A un aumento de concentración de LAH de judía de vaca, la lisofosfatidilcolina está también hidrolizada en la masa.

ES 2 284 897 T3

En conclusión, se observa que tanto los galactolípidos como los fosfolípidos en la masa son degradados por LAH de la judía de vaca.

El análisis por GLC no indica ninguna actividad de LAH de judía de vaca sobre el triglicérido en comparación con la actividad sobre los lípidos polares y la formación de ácido graso libre.

Es muy evidente que 3 unidades/kg de LAH de judía de vaca es una sobredosis potente de esta enzima, que produce la hidrólisis casi completa de todos los galactolípidos en la masa.

10 Ejemplo 2

Se analizó LAH de judía de vaca en análisis de minipan a dos concentraciones diferentes y se comparó con una referencia (sin añadir LAH de judía de vaca). Se evaluó el volumen del pan así como una evaluación de la estructura y aspecto de la miga. La masa completamente sumergida de esta prueba se congeló y se liofilizó y se extrajo el lípido de la masa. Los lípidos aislados de la masa se analizaron por análisis HPLC y GLC.

Los resultados de la prueba de horneado se muestran en la Tabla 3.

20 TABLA 3

Prueba de horneado con LAH de judía de vaca

Prueba nº	LAH de judía de vaca % en la masa	Volumen del pan ml/g	Ácido graso en la masa, ‰
1	0	3,09	2,63
2	0,05	3,11	2,75
3	0,15	3,3	2,96

LAH de judía de vaca contribuyó claramente a aumentar el volumen del pan horneado en comparación con la referencia, y la enzima contribuyó asimismo a mejorar la miga, con una estructura más homogénea y un aspecto mejor.

Los resultados del análisis de lípidos y de los lípidos extraídos se presentan en la Tabla 4.

40 TABLA 4

Análisis por GLC y HPLC de los lípidos de la masa

Prueba nº	Monoglicérido ‰	Diglicérido ‰	Triglicérido ‰	DGDG	DGMG
1	0,43	0,99	4,94	2,09	0,22
2	0,43	0,95	4,98	2,03	0,27
3	0,43	0,96	5,11	1,92	0,28

El análisis de los lípidos indica que LAH de judía de vaca no hidroliza los lípidos apolares. La concentración de triglicérido parece aumentar un poco, pero está dentro del error experimental. Sin embargo, la enzima tiene claramente un efecto sobre el galactolípidos en la masa al degradar el digalactolildiglicérido (DGDG). Se observa un aumento en la concentración correspondiente de DGMG. El grado de hidrólisis del galactolípidos no es muy elevado, pero suficiente para explicar una mejora de la calidad de la panificación de la enzima.

Ejemplo 3

Se evaluó la LAH aislada de la judía de vaca en las pruebas de horneado de la manera siguiente. Se evaluó la LAH en panecillos de corteza dura.

Se ensayó LAH a una dosis de 0, 0,25, 0,5, 1 ó 1,5 unidades de enzima/kg de harina. Los resultados iniciales demuestran que la adición de 1,5 mg de LAH aumentó el volumen de la barra de pan en más del 10% en comparación con el pan sin enzima y mejoró las propiedades de manipulación de la masa.

ES 2 284 897 T3

Ejemplo 4

Se ensayó LAH en el pan según el procedimiento para pan danés tostado utilizando harina de reforma danesa. Se determinó LAH a 0, 0,1, 0,25, 0,5, 1 ó 1,5 unidades de enzima/kg de harina. Como referencia se preparó una masa sin adición de enzima. Después del horneado, se enfriaron las barras y se midió el volumen de la barra. El pan panificado en lata con tapa se almacenó a temperatura ambiente y se evaluó la blandura de la miga después de 1,3 y 7 días de almacenamiento a 22°C envueltos en bolsas de plástico dobles.

Los resultados iniciales demuestran que la adición de 1 a 1,5 unidades de LAH aumenta el volumen de la barra.

Los resultados iniciales de consistencia y elasticidad demuestran que LAH proporciona miga significativamente más blanda después de 7 días de almacenamiento en comparación con la referencia (sin enzima).

Los resultados preliminares demuestran también que LAH produce pan con una estructura de la miga muy buena y homogénea.

Ejemplo 5

Se analizó LAH de judía de vaca en minipanes a diferentes concentraciones según la Tabla 5.

TABLA 5

Prueba de horneado con LAH de judía de vaca y análisis de ácidos grasos de la masa

LAH de judía de vaca Unidades/kg	Volumen específico del pan, ml/g	Ácido graso libre en la masa, ‰
0	3,09	2,57
0,1195	3	2,72
0,239	3,2	2,81
0,478	3,15	3,07
0,956	3,15	3,28

LAH de judía de vaca contribuye claramente a aumentar el volumen a baja concentración (hasta 0,239 unidades/kg). A dosis mayores no hay ningún aumento de volumen pero la estructura de la miga se hace más homogénea. Se extrajeron las masas de este experimento y se aislaron los lípidos de la masa y se analizaron por HPLC y GLC como se muestra en la Tabla 6.

TABLA 6

Análisis por GLC y HPLC de los lípidos de la masa

LAH de judía de vaca %	Monoglicérido ‰	Diglicérido ‰	Triglicérido ‰	DGDG ‰	DGMG ‰
0	0,43	0,99	4,94	2,15	0,21
0,1195	0,40	0,96	5,04	2,08	0,23
0,239	0,41	1,23	5,21	2,01	0,20
0,478	0,43	0,90	5,09	1,89	0,24
0,956	0,41	1,01	5,23	1,60	0,20

El análisis de lípidos confirma claramente que LAH de judía de vaca no es activa en los lípidos apolares de la masa (mono-di y triglicérido), pero la funcionalidad se explica por el efecto sobre los lípidos polares como digalactosildiglicérido (DGDG), que están claramente hidrolizados. Los resultados indican algunas variaciones en la concentración de di- y triglicérido, pero las variaciones son aleatorias y no existe ninguna indicación de la actividad enzimática.

ES 2 284 897 T3

Ejemplo 6

Se evaluó la LAH de judía de vaca en análisis de minipan. En este experimento se ensayó la enzima sola y también en combinación con un galactolípido aislado de la avena. Los resultados de la prueba de panificación y la determinación del ácido graso libre se presentan en la Tabla 7.

TABLA 7

LAH de judía de vaca y galactolípido (DGDG) en minipanes

Prueba nº	DGDG, 55% de pureza %	LAH de judía de vaca Unidades/kg de harina	vol. esp. del pan ml/g	Ácido graso libre ‰
1	0	0	3	2,39
2	0,2	0	3,28	2,50
3	0	0,357	3,22	3,07
4	0,2	0,357	3,69	3,00

En este experimento se demuestra que tanto LAH de judía de vaca como el galactolípido (DGDG al 55%) tienen un efecto positivo sobre el volumen del pan. Combinando los dos ingredientes contribuyen a un efecto sinérgico claro como se ilustra en la Tabla 7. Tanto el volumen del pan como la estructura de la miga están significativamente mejorados cuando se añaden LAH y DGDG.

La masa de este experimento de panificación se congeló y se liofilizó y el lípido de la masa se extrajo con butanol saturado de agua. Los lípidos aislados se expusieron a análisis de GLC y HPLC. En la Tabla 8 se presentan los resultados de estos análisis.

TABLA 8

Análisis de GLC y HPLC de lípidos de la masa

Prueba nº	DGDG, 55% de pureza %	LAH de judía de vaca Unidades/kg de harina	DGDG ‰	DGMG ‰	Triglicérido ‰
1	0	0	2,07	0,15	5,94
2	0,2	0	2,81	0,15	5,60
3	0	0,357	1,93	0,23	no detectado
4	0,2	0,357	2,4	0,25	5,82

Cuando se añaden galactolípidos (prueba nº 2) a la masa se detectan también más galactolípidos (DGDG) por análisis HPLC. La LAH de judía de vaca presenta un fuerte efecto hidrolizante sobre DGDG.

El efecto hidrolizante es muy claro tanto sin DGDG añadido (prueba nº 3) como especialmente cuando se añade DGDG (prueba nº 4). Se observa también que la concentración del producto de la hidrólisis, es decir DGMG, aumenta cuando se añade LAH de judía de vaca. Como se observa en los demás experimentos LAH de judía de vaca no presenta ningún efecto hidrolizante sobre los triglicéridos.

Ejemplo 7

Se evaluó LAH de judía de vaca en análisis de minipanes en combinación con aceite de soja (Tabla 9).

TABLA 9

LAH de judía de vaca y aceite de soja en minipanes

Prueba nº	Aceite de soja %	LAH de judía de vaca Unidades/kg de harina	vol. esp. del pan ml/g	Ácido graso libre ‰
14	2	0	3,3	2,00
15	2	1,07	3,3	3,35
16	2	2,14	3,12	3,75

ES 2 284 897 T3

En este experimento la LAH de judía de vaca no contribuyó a mejorar el volumen de pan en comparación con el pan horneado con aceite de soja solo, pero LAH de judía de vaca mejoró claramente la estructura de la miga y el aspecto del pan (Fig. 8).

Ejemplo 8

Se evaluó la LAH de judía de vaca por análisis del minipan en combinación con diferentes concentraciones de galactolípido (55% de pureza) (Tabla 10).

TABLA 10

LAH de judía de vaca y galactolípido (pureza del 55%) en minipanes

Prueba nº	DGDG, 55% de pureza %	LAH de judía de vaca Unidades/kg de harina	vol. esp. del pan ml/g	Ácido graso libre ‰
9	0	0	3,03	2,60
10	0	1,07	3,11	3,52
11	0,1	1,07	3,3	3,42
12	0,2	1,07	3,73	3,64
13	0,4	1,07	4,13	3,92

La Tabla 10 demuestra que la adición de galactolípido en combinación con 1,07 unidades/kg de galactolípido contribuye a una fuerte mejora tanto en el volumen del pan como en la estructura de la miga (Fig. 9).

Ejemplo 9

Se ensayó LAH purificada de judía de vaca en minipanes en combinación con galactolípido DGDG.

La adición de ingredientes de la masa se resume en la Tabla 11, así como el volumen del pan de los panes de estos experimentos de horneado.

TABLA 11

Prueba de panificación con LAH de judía de vaca y galactolípido DGDG

Prueba nº	DGDG, 55% de pureza %	LAH de judía de vaca Unidades/kg de harina	Volumen esp. del pan ml/g
1	0	0	2,92
2	0,4	0	4,11
3	0,4	0,71	4,36
4	0	0,71	3,14

A partir de los resultados de la Tabla 11 se demuestra claramente que DGDG presenta un efecto muy positivo sobre el volumen del pan del pan horneado. LAH de judía de vaca contribuye también al volumen mejorado del pan. La combinación de LAH de judía de vaca y DGDG proporcionó una mejora adicional en el volumen del pan y se observó una estructura mejor de la miga (Fig. 10).

Ejemplo 10

En este experimento se ensayó LAH aislada unida a la membrana de cloroplastos de la hoja de trigo en un sistema de masa modelo de 10 gramos. La masa se dejó en reposo durante 1 hora a 26°C y a continuación se congeló y se liofilizó.

ES 2 284 897 T3

La masa liofilizada se extrajo con butanol saturado con agua (WSB) y los lípidos de la masa aislados se expusieron a análisis de GLC y HPLC. En la Tabla 12 se presentan los resultados del análisis de lípidos.

5

TABLA 12

Efecto de LAH unida a la membrana en cloroplastos de trigo en la masa. Análisis GLC de lípidos

10

LAH unida a la membrana % en la masa	Ácido graso libre ‰	Monoglicérido ‰	Diglicérido ‰	Triglicérido ‰	DGDG ‰
0,1	3,06	0,32	0,84	4,20	0,82
0,5	4,40	0,30	0,57	3,80	0,00
1	4,38	0,30	0,51	3,96	0,00
2	5,70	0,27	0,37	4,12	0,00

15

20

Los resultados de la Tabla 12 confirman la actividad lipolítica de la enzima LAH unida a la membrana procedente de los cloroplastos de trigo en la masa medida como un fuerte aumento de ácido graso libre en la masa. Los resultados también han demostrado que la enzima LAH unida a la membrana procedente de cloroplastos de trigo casi no tiene efecto sobre los lípidos apolares, y la concentración de triglicérido está inalterada. Los resultados indican también un efecto hidrolítico potente de la enzima LAH unida a la membrana procedente de cloroplastos de trigo sobre la hidrólisis de galactolípidos como el galactosil diglicérido (DGDG), que está completamente hidrolizado a dosis mayores de enzima LAH unida a la membrana.

25

30 Ejemplo 11

En este experimento una enzima LAH aislada que comprende la secuencia mostrada en la SEC. ID. n°: 12 se ensayó en un sistema de masa modelo de 10 gramos. La masa se dejó en reposo durante 1 hora a 26°C y a continuación se congeló y se liofilizó.

35

Los resultados preliminares demuestran que la enzima que comprende la secuencia presentada en la SEC. ID. n°: 12 reduce las cantidades de lípidos polares en el aceite mientras que no afecta significativamente las concentraciones de triglicérido del aceite.

40 *Conclusión*

Las enzimas LAH de judía de vaca se han aislado y caracterizado y ensayado en el modelo de masa y en experimentos de minihorneado. Esta enzima es activa en galactolípidos polares y fosfolípidos en la masa pero no se observó ninguna actividad sobre los triglicéridos en la masa. Una LAH unida al cloroplasto de las hojas de trigo se ha aislado también y ensayado en la masa del modelo. Esta enzima es también activa frente a galactolípidos y fosfolípidos en la masa, pero no mostró ninguna actividad sobre los triglicéridos.

45

Ejemplo 12

50

Se trató aceite vegetal, en especial aceite de colza, con LAH aislada de judía de vaca para efectuar el descrudamiento del aceite. El procedimiento utilizado fue esencialmente como para el procedimiento de descrudamiento catalizado por enzimas de aceite vegetal dado a conocer generalmente en Buchold, H. (*Fat. Sci. Technol.* 95 enero, n° 8, 1993, págs. 300-305), excepto que se utilizó LAH.

55

Los resultados preliminares demuestran que LAH reduce las cantidades de lípidos polares en el aceite aunque no afecta significativamente las concentraciones de triglicérido del aceite.

60

65

ES 2 284 897 T3

SEC. ID. nº 1

5 MAATQTPSKVDDGALITVLSIDGGGIRGIIPGILLAFLESELQK
LDGADARLADYFDVIAGTSTGGLVTAMLTAPNENNRPLYAAKDIKDFYLEHTPKIFPQ
10 SSSWNLIATAMKKGRSLMGPQYDGKYLHKLVRKLGNTKLEHTLTNVVIPAFDIKNLQ
PAIFSSFQVKKRPYLNAALSDICISTSAAPTYLPAHCFETKTSTASFKFDLVDGGVAA
15 NNPALVAMAIEVSNEIRNEGSCASLKVKPLQYKKFLVISLGTGSQQHEMRYSDKASTW
GLVGWLSSSGGTPLIDVFSHASSDMVDFHISSVFQARHAEQNYLRIQDDTLTGDLGSV
20 DVATEKNLNLVQVAEALLKKPVSKINLRTGIHEPVESNETNAEALKRFAARLSNQRR
FRKSQTFA

SEC. ID nº 2

1 caaattctat ataaaatata atacattagg aagttagaaa atacttgacc tactctccaa
30 61 ttatttgatt cacgttcaaa atatatcatt acgattctag attaataaag attcctataa
121 agtttcaaat cacaaatgtg accattcaat atctcacatg caaccaaaat aaggaaaaag
181 ccttaagttt aaaaaataaa taaaagttt actcaaaacc aaaacttaat aagataaact
241 tttcttataat tctgttaaat tttattcccc atactttaat aaaagaaagg ataagaaaca
35 301 actacttttt attttacttt gtattttata gagataaaat agtttagata attgaaaagt
361 gaattagttt tacattatat ataactttta catactaaaa catttatttt tgttttaaat
421 taaagaaagg tacttacact agaaataacg tttataaatg aatgaaaatt acattcaatt
481 tcttaaaagt actgtgaata gaaaaatgat aacaaagaag aaaaatataat agtgaattat
40 541 attacaagaa aaaaaaagt gtcaattaat tattaataca ttgcatcaat aataaataaa
601 ggttctcatt tttgtagtga aatctcaaat aagttttctc atttttattt gactcaattg
661 agttactaat ttggaaaatt cattgcaatt agatcatttt cgttagtact acactagcga
721 tgttaactat gtgtcatgtg tcagcaagtg atttttttta taattttttt gaaaaaata

ES 2 284 897 T3

781 aaaaaaaatt atcatgtggt aatctgacat tgtgtcacat gttagagata atgtgatgtg
 841 acagtaatag taccacatgt cactattgaa tgtgaaaagt cttaatataa tccttgtatt
 901 tattattttg tttcaattta acattttttt aacataaaa caatttaatt aattttttta
 5 961 atttcatatt ttctaaatat tttagataag taaaaaataa taataatacg attaaacctt
 1021 aattttgtac tttacaacta ctatttgatg gttatgcttt taagttgtgg ttgaaatagt
 1081 ggtgaagagc atacgtgaat atgacaaata aagaaacaaa cgcaattatg acattcctat
 1141 ccttttctaa gtattttctt ataattacag tcttttgaaa ttattgtgta tgaattataa
 10 1201 gtaggtatgt gggaatgtga caataataat aactaaggag actctgaaaa gttctgagaa
 1261 tttaatgaat taattataat ttaaacaagt cagacaagaa aattataaag ttctctaacc
 1321 tagtacgtgc ctcataaaat aatagtcag ctattataaa ataattaatt atgggtgggtg
 1381 gaatgttcat tgacacaatt atttagatat tttctcattg actcattgac acatggttca
 15 1441 ttgctatcca tctattacca atgaatatta ccttttgctg tctatgataa tttattttta
 1501 taattttaat actctatcaa agtaaaaata ttgtccagga aaaatgggtt ttattaataa
 1561 ttaattgaag gtgaattaac tatactaaat attataccaa tggataatta cattgcaaaa
 1621 gaataccttt gtagtatttt gaaatagat attttaaagt aacttgttgt tcattaaaaa
 1681 attaaaaatt taaatataag ttttaagtctt acactaaaaa aaataaaaaa atataaagtt
 20 1741 gagtacata taaagatgaa aactcataaa acatattaga gttgaagggtt aatagtctat
 1801 ttagacaaat tttgtatcg agaaagaaat accgatggga catactcatg ggataaatca
 1861 aaactaagtg aaaataaaat ttgaggtaaa gaaaatacat atttaataaa tttaaaagtg
 1921 aaatttttaa tgtgtgtcca aaatatttgt taaataataa taaacatatt ttacatcacc
 25 1981 taatccatgc gtttttcatc ggatttacgg gccggtccga cgggccagat cctaattgtc
 2041 accccttatg tattttatat atggtatata tgactaacat gagaaaatgt gaccgttaaa
 2101 agcagagttt taatcaaaca taagtaaaaa tgagtatagt taaaccaaaa cttgatttac
 2161 catatataac tcataacaga gactttaaca cagatctgca aaccttcta gtatgtacac
 30 2221 tgcaaaaaca agggaacaca aagggtgccc tacgcattca atctcattaa tctctgtggt
 2281 ccaaaacact ttgtgtgtat atgatttgaa tattactatt atacatcaa caatagtaat
 2341 tcttgtcttt tgtgtctata tgatttgaac gctagtatta cattctctat caactcttcc
 2401 atacatttat tgatcgcccc accatcaaaa aaccataact aacacgtgaa aactgataaa
 35 2461 aataacgtca gcatagaagt tctgaacgtt caatattatt cacagaaaaa agatattatc
 2521 catttgcacg tttttgtggt aattaactta acatggtgct aagattttgg tataggagat
 2581 gatgttatat aggttacctt aattatgatt gaagtgagtg aagaattctt attcattgaa
 2641 agtgttttta actgaggttt tagacaaaact atacctaat ttactagttt aatccctctt
 2701 aagaaaaaaa aaccaactcc tggaacacca acaaacacca taagtaacac gtttgaaaac
 40 2761 ggactaaaat aatggtgaag ctctcgacaa ttaaataagggt ttcatggaaa catattatcc
 2821 atttccctgt tttgtggca actaattgaa cacgctaaaa acaagacaag taaactcacc
 2881 aacatcttca ctctttacac ggtttggtt tatatataaa tatgcagttt ctctcatca
 2941 aatcaacca tgaaaaccag atttttctga ataagtttgt gtaagagttc agtagtttc
 45 3001 tttgtctctt cctaagttca ttccatctct ctttcttct ctttcttct agtagtttc
 3061 gtctctctct ttctctttga cttagtaagt catcaattca gatccatggc agcaactcaa
 3121 actccaagca aagttgatga tggagcactg attactgtgc tgagtattga tgggtggggc
 3181 attcgtggaa tcattcccgg aattttgctt gcttctctcg aatcagaact tcaggaata
 3241 ataacttatg gtaaccaaga gaaaacgttt atatgtaaat taatgcagga aagtaactaa
 50 3301 taatggtgca tatgcagaaa ctggatggtg ctgatgcaag actcgcagat tactttgatg
 3361 tgattgcagg aacaagcacc ggtggattag tcaactgcaat gctcactgct ccaaatgaaa
 3421 ataactgacc cttgtatgca gccaaagata taaaggattt ctaccttgag catacccaa
 3481 aaatcttccc gcagagtagg taaataccac actttacacc ataaacttctg taccaaatca
 55 3541 ttcaaatcta aatacacact gtgtactaat ttacagtgtg attttttccc aaatacagta
 3601 gctggaattt gattgcaaca gcgatgaaga aaggcagaag tctgatggga ccacagtacg
 3661 atggcaagta tttacacaag ctcgttaggg aaaaactagg gaacacaaaa ttggaacaca
 3721 cattaaccaa tgtcgttatc ccagcatttg atatcaaaaa ccttcaacc gccatctttt
 3781 ccagcttcca ggttcacccc tcctctctc aattgcaaaa agtcactcac ttgaaagcaa
 60 3841 aaattgcagc tttttgtttt tctetaacga aattattact ctgcaatag atgtcacagg
 3901 tgaagaagag gccatatttg aatgcggcgt tgtctgatat atgcatttca acctcggcag
 3961 caccaacctt tctcccagct cattgctttg aaactaaaac cagcactgct agtttcaaat
 4021 tgcaccttgt agatggtggt gtagcagcaa ataaccgggt attgtattat acagtctcag

65

ES 2 284 897 T3

4081 aactaatctt aatcattcat aacataatca cacacacaaa cactataatt aacaagtata
 4141 aatttaatcg ataacagaag aagggtgatag atatgttata atctggcatt ttccaggctc
 5 4201 tgggtggcgat ggcagaagtg tcgaacgaaa tccgcaatga aggggtcatgt gcaagcttga
 4261 aagtaaaacc gttgcaatac aaaaagtttt tgggtgatatc gttgggaaca ggttctcagc
 4321 aacacgaaat gagatacagt gctgataagg catcgacatg gggccttgtg ggttggcttt
 4381 cctcctccgg tggcactcct ctcacgatg ttttcagcca tgctagttct gacatggttg
 4441 atttccacat ctctcctcgtt ttccaagcac gccatgctga acaaaactac ctccgaatcc
 10 4501 aggttctttc cgaacatata tataaacatc ttcaatgatt ctctgtgctg caaatgaaaa
 4561 ctcacgatg caatctttat attcaaatc tgcaggatga tactttaact ggggacttag
 4621 gttcgggtgga cgtggccacg gagaagaatc tgaatggcct cgtccaagt gcggaagcat
 4681 tgtaaagaa accagtttca aagattaact tgaggaccgg tattcatgaa cctggtgagt
 15 4741 ctaacgaaac caacgcagaa gccttgaaga ggtatatata tatcaaaacc ctactcatac
 4801 acacacatga taatggaaag aatttaagaa aaactgtgta agaaattaa gtatatatac
 4861 aataaaaaa tcatgtgttc atcgtactaa tgttttatta acaacgtatt ttttatcaaa
 4921 cgaatccat atatgagttg taacttcttc gaatcacagt ttcacgttca cttcacttca
 20 4981 ctatcttttt atacaggtt tgcggcacga ctatccaacc agaggagatt tcggaatct
 5041 caaacgtttg cgtagaatgg gaatcttcga aagatgaaga tatacgagac acgtgttget
 5101 tggccaatat gataaatgat tgggtgtagtg tttatcttaa ttttatatat ttttctttat
 5161 atttcgtagt gttcattaca gtgaagatat attcattgta ctgaatcaca ataattagtg
 5221 tccctacaat attaaatctc atgtgctgta aacgctttgt gtttctttgt tttcatttca
 25 5281 caatgtaatc agtttggttc actatattgt ctctaattca ttttatttta a

SEC. ID n° 3

30 1 M F S G R F G V L L T A L A A L G A A A P A P L A V R S V S
 31 T S T L D E L Q L F A Q W S A A A Y C S N N I D S K D S N L
 61 T C T A N A C P S V E E A S T T M L L E F D L T N D F G G T
 91 A G F L A A D N T N K R L V V A F R G S S T I E N W I A N L
 35 121 D F I L E D N D D L C T G C K V H T G F W K A W E S A A D E
 151 L T S K I K S A M S T Y S G Y T L Y F T G H S L G G A L A T
 181 L G A T V L R N D G Y S V E L Y T Y G C P R I G N Y A L A E
 211 H I T S Q G S G A N F R V T H L N D I V P R V P P M D F G F
 241 S Q P S P E Y W I T S G N G A S V T A S D I E V I E G I N S
 40 271 T A G N A G E A T V S V V A H L W Y F F A I S E C L L

SEC. ID n° 4

45 1 ATGTTCTCTG GACGGTTTGG AGTGCTTTG ACAGCGCTTG CTGCGCTGGG
 51 TGCTGCCGCG CCGGCACCGC TTGCTGTGCG GAGTGTCTCG ACTTCCACGT
 101 TGGATGAGTT GCAATTGTTT GCGCAATGGT CTGCCGACGC TTATTGCTCG
 151 AATAATATCG ACTCGAAAGA CTCCAACCTG ACATGCACGG CCAACGCCTG
 50 201 TCCATCAGTC GAGGAGGCCA GTACCACGAT GCTGCTGGAG TTCGACCTGA
 251 CGAACGACTT TGGAGGCACA GCCGGTTTCC TGGCCGCGGA CAACACCAAC
 301 AAGCGGCTCG TGGTCGCCTT CCGGGGAAGC AGCACGATTG AGAACTGGAT
 351 TGCTAATCTT GACTTCATCC TGGAAGATAA CGACGACCTC TGCACCGGCT
 401 GCAAGGTCCA TACTGGTTTC TGGAAGGCAT GGGAGTCCGC TGCCGACGAA
 55 451 CTGACGAGCA AGATCAAGTC TGCGATGAGC ACGTATTCGG GCTATACCTT
 501 ATACTTCACC GGGCACAGTT TGGGCGGCGC ATTGGCTACG CTGGGAGCGA
 551 CAGTTCTGCG AAATGACGGA TATAGCGTTG AGCTGTACAC CTATGGATGT
 601 CCTCGAATCG GAAACTATGC GCTGGCTGAG CATATACCA GTCAGGGATC
 60 651 TGGGGCCAAC TTCCGTGTTA CACACTTGAA CGACATCGTC CCCCAGGTTG

 701 CACCCATGGA CTTTGGATTC AGTCAGCCAA GTCCGGAATA CTGGATCACC
 751 AGTGGCAATG GAGCCAGTGT CACGGCGTCG GATATCGAAG TCATCGAGGG
 65 801 AATCAATCA ACGGCGGGAA ATGCAGGCGA AGCAACGGTG AGCGTTGTGG
 851 CTCACCTGTG TACTTTTTT GCGATTTCCG AGTGCCTGCT ATAA

ES 2 284 897 T3

SEC. ID n°5

CAAGCTATACCAAGCATACAATCAACTCCAAAATGTTCTCTGGACGGTTTG

5

SEC. ID n°6

CAAACCTCTGGCGAAGAAGTCCAAAGCTG

10

SEC. ID n°7

GCTCGTGGTCGCCTTCCGGGG

15

SEC. ID n°8

GCCGGTGCAGAGGTCGTCTG

20

SEC. ID n°9

CCTCGAATCGGAAACTATGCGC

25

SEC. ID n°10

TGTCACGGCGTCGGATATCG

30

SEC. ID n°11

CTCATCCAACGTGGAAGTCG

35

SEC. ID n°12

40

			5		10		15		20		25		30																			
	1	M	C	S	Q	A	D	P	T	L	T	C	P	P	P	S	Q	G	R	L	I	T	V	L	S	I	D	G	G	G	I	
	31	R	G	L	I	P	S	T	I	L	A	C	L	E	S	K	L	Q	E	L	D	G	P	D	A	R	I	A	D	Y	F	
	61	D	V	I	A	G	T	S	T	G	A	L	V	T	S	M	L	A	A	P	G	E	N	K	R	P	L	F	E	A	K	
45	91	D	I	N	K	F	Y	L	D	N	G	P	K	I	F	P	Q	K	G	W	G	V	L	T	P	M	A	N	L	F	G	
	121	A	V	T	G	P	K	Y	D	G	K	F	L	H	D	K	I	K	S	L	T	N	D	V	T	V	A	D	T	V	T	
	151	N	I	I	V	P	T	F	D	I	K	Y	L	Q	P	I	I	F	N	T	Y	E	A	K	V	D	P	L	K	N	A	
	181	H	L	S	D	I	C	I	S	T	S	A	A	P	T	Y	F	P	A	H	Y	F	T	T	R	D	P	A	G	K	L	
50	211	P	D	R	E	Y	H	L	I	D	G	G	V	A	A	N	N	P	T	M	A	A	M	S	M	I	T	K	E	V	L	
	241	R	R	N	P	D	F	T	H	G	K	P	A	E	Y	G	N	Y	L	I	I	S	I	G	T	G	S	A	K	M	A	
	271	E	K	Y	T	A	P	D	C	A	K	W	G	V	L	R	W	L	Y	D	G	G	F	T	P	L	I	D	I	F	S	
	301	H	A	S	A	D	M	V	D	I	Q	A	S	V	L	F	Q	V	L	D	C	T	K	S	Y	V	R	I	Q	H	A	
	331	E	L	T	G	E	M	A	S	V	Y	V	S	T	S	K	S	L	N	G	F	I	S	V	G	K	A	L	L	K	K	
55	361	Q	V	C	K	V	N	V	E	T	G	K	N	E	P	D	L	E	R	G	A	Y	E	E	E	L	A	R	F	V	R	
	391	M	L	S	K	E	R	K	A	R	K	E	A	Y	K	L	V															

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Procedimiento de preparación de una masa de harina, comprendiendo dicho procedimiento añadir a los componentes de la masa una cantidad eficaz de una enzima que en las condiciones de la masa hidroliza un glucolípido y un fosfolípido, pero no hidroliza un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5, y mezclar los componentes de la masa para obtener la masa.
- 10 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cantidad eficaz de enzima no hidroliza tanto un triglicérido como un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5.
3. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que la cantidad eficaz de enzima hidroliza un triglicérido y un diglicérido pero no hidroliza un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5.
- 15 4. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos uno de entre el triglicérido, el 1-monoglicérido, el glucolípido y el fosfolípido es un componente lipídico natural que se produce en la harina utilizada para la masa.
- 20 5. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el fosfolípido es la fosfatidilcolina (PC).
6. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el glucolípido es el digalactosildiglicérido (DGDG).
- 25 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos uno de entre el triglicérido, el 1-monoglicérido, el glucolípido y el fosfolípido se añade a la masa.
8. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el triglicérido se selecciona de entre el grupo constituido por un aceite vegetal, una grasa vegetal, una grasa animal, una manteca y grasa de leche.
- 30 9. Procedimiento según la reivindicación 8, en el que el aceite vegetal es un aceite de cereal natural que comprende el aceite de avena.
- 35 10. Procedimiento según la reivindicación 7, en el que el líquido polar que se añade es un fosfolípido seleccionado de entre el grupo constituido por fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidiletanolamina (PE).
- 40 11. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la masa es una masa fermentada con levadura.
12. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima se añade en una cantidad que está comprendida en el intervalo entre 0,1 y 1.000 unidades de enzima/kg de harina.
- 45 13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la enzima se añade en una cantidad que está comprendida en el intervalo entre 1 y 100 unidades de enzima/kg de harina.
14. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la masa es una masa de pan, comprendiendo el procedimiento como etapa adicional que se hornea la masa para obtener un producto de panadería.
- 50 15. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que la masa es una masa seleccionada de entre el grupo constituido por masa para pasta, masa para tallarines y masa para pasteles o mezcla de masa.
- 55 16. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enzima se añade en una cantidad que produce un aumento del volumen específico del producto de panadería que es por lo menos el 10%, con relación a un producto de panadería preparado en condiciones idénticas con la excepción de que no se añade la enzima.
17. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se añade una enzima adicional a la masa.
- 60 18. Procedimiento según la reivindicación 17, en el que la enzima adicional es seleccionado de entre el grupo constituido por una lipasa, una enzima que degrada almidón, una hemicelulasa, una celulasa, una lipoxigenasa y una oxidoreductasa.
19. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se hidroliza por lo menos el 25% del glucolípido inicialmente presente en la masa.
- 65 20. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se hidroliza por lo menos el 25% del fosfolípido inicialmente presente en la masa.

ES 2 284 897 T3

21. Procedimiento de preparación de una masa o producto de panadería preparado a partir de una masa que comprende:

- 5 (a) probar la actividad hidrolítica de por lo menos una enzima para con un triglicérido, un 1-monoglicérido, un fosfolípido y un glucolípido;
- (b) seleccionar una enzima que presenta actividad hidrolítica para con un fosfolípido y un glucolípido y que no presenta actividad hidrolítica para con un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5; y
- 10 (c) añadir la enzima seleccionada a la masa.

22. Composición que mejora la masa que comprende una cantidad eficaz de enzima, que en las condiciones de la masa, hidroliza un glucolípido y un fosfolípido, pero no hidroliza un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5 y, opcionalmente, un componente de la masa adicional.

23. Composición según la reivindicación 22, en la que la cantidad eficaz de enzima no hidroliza tanto un triglicérido como un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5.

24. Composición según la reivindicación 22, en la que la cantidad eficaz de enzima hidroliza un triglicérido y un diglicérido, pero no hidroliza un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5.

25. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en la que dicha composición comprende una enzima adicional seleccionada de entre el grupo constituido por una lipasa, una enzima que degrada almidón, una hemicelulasa, una celulasa, una lipoxigenasa y una oxidorreductasa.

26. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en la que dicho componente adicional de la masa se selecciona de entre el grupo constituido por harina de cereales, levadura, un agente de fermentación químico, un agente de refuerzo de la masa, un emulsionante, un azúcar, un acilglicerol, un fosfolípido, un glucolípido y una sal.

27. Masa que puede obtenerse por el procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21.

28. Masa según la reivindicación 27, en la que dicha masa se congela o se acondiciona en una atmósfera controlada.

29. Producto de panadería que puede obtenerse horneando una masa según las reivindicaciones 27 ó 28.

30. Producto de fideos preparado a partir de una masa según las reivindicaciones 27 ó 28.

31. Producto de pasta preparado a partir de una masa según las reivindicaciones 27 ó 28.

32. Procedimiento de preparación de una enzima que presenta actividad hidrolítica para con un fosfolípido y un glucolípido y que no presenta actividad hidrolítica para con un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5, que comprende:

- 45 i) seleccionar una lipasa que presenta actividad hidrolítica para con un fosfolípido, un glucolípido y un triglicérido y/o un 1-monoglicérido,
- ii) modificar por inserción, deleción o sustitución de por lo menos un aminoácido en la secuencia de aminoácidos, con el fin de alterar la actividad de la lipasa de manera que la lipasa se modifica para no presentar actividad contra un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5.

33. Procedimiento según la reivindicación 32, en el que la inserción, deleción o sustitución de por lo menos un aminoácido está en la región externa de la secuencia de aminoácidos.

34. Procedimiento según la reivindicación 32, en el que la inserción, deleción o sustitución de por lo menos un aminoácido está próxima al sitio activo de la secuencia de aminoácidos.

35. Procedimiento según la reivindicación 32, en el que la inserción, deleción o sustitución de por lo menos un aminoácido está en el terminal C de la secuencia de aminoácidos.

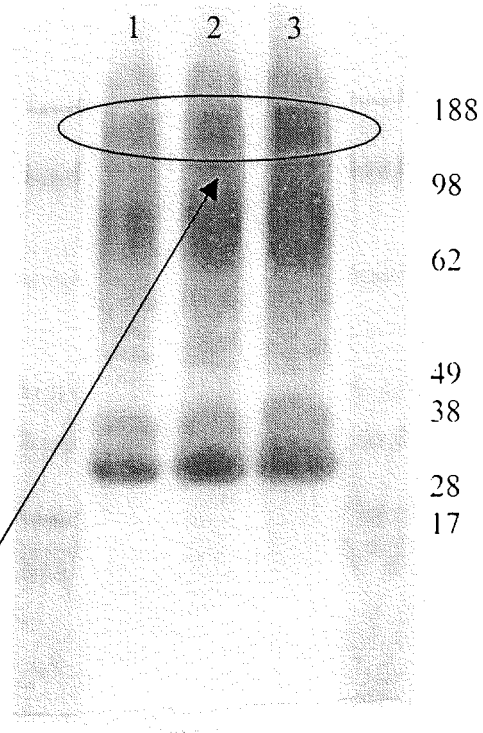
36. Procedimiento según la reivindicación 33, en el que se elimina la región externa.

37. Composición de masa que comprende una cantidad eficaz de enzima, que en las condiciones de la masa, hidroliza un glucolípido y un fosfolípido, pero que hidroliza un triglicérido y/o un 1-monoglicérido en el intervalo de pH comprendido entre 4,5 y 6,5 y, opcionalmente, un componente de la masa adicional.

FIGURA 1

Banda 1 a 3:
Mezcla de PQ10

PAGE natural
(PAGE natural, 4 al 12%, tampón Mes)

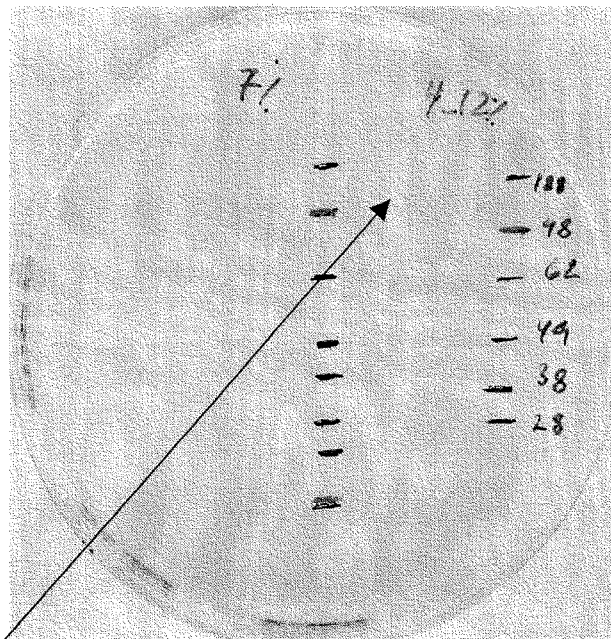


Esta parte del gel se cortó y se sometió a electroelución.

FIGURA 2

Tinción de actividad, placa con DGDG

40°C, 18 horas



Actividad de galactolipasa

FIGURA 3

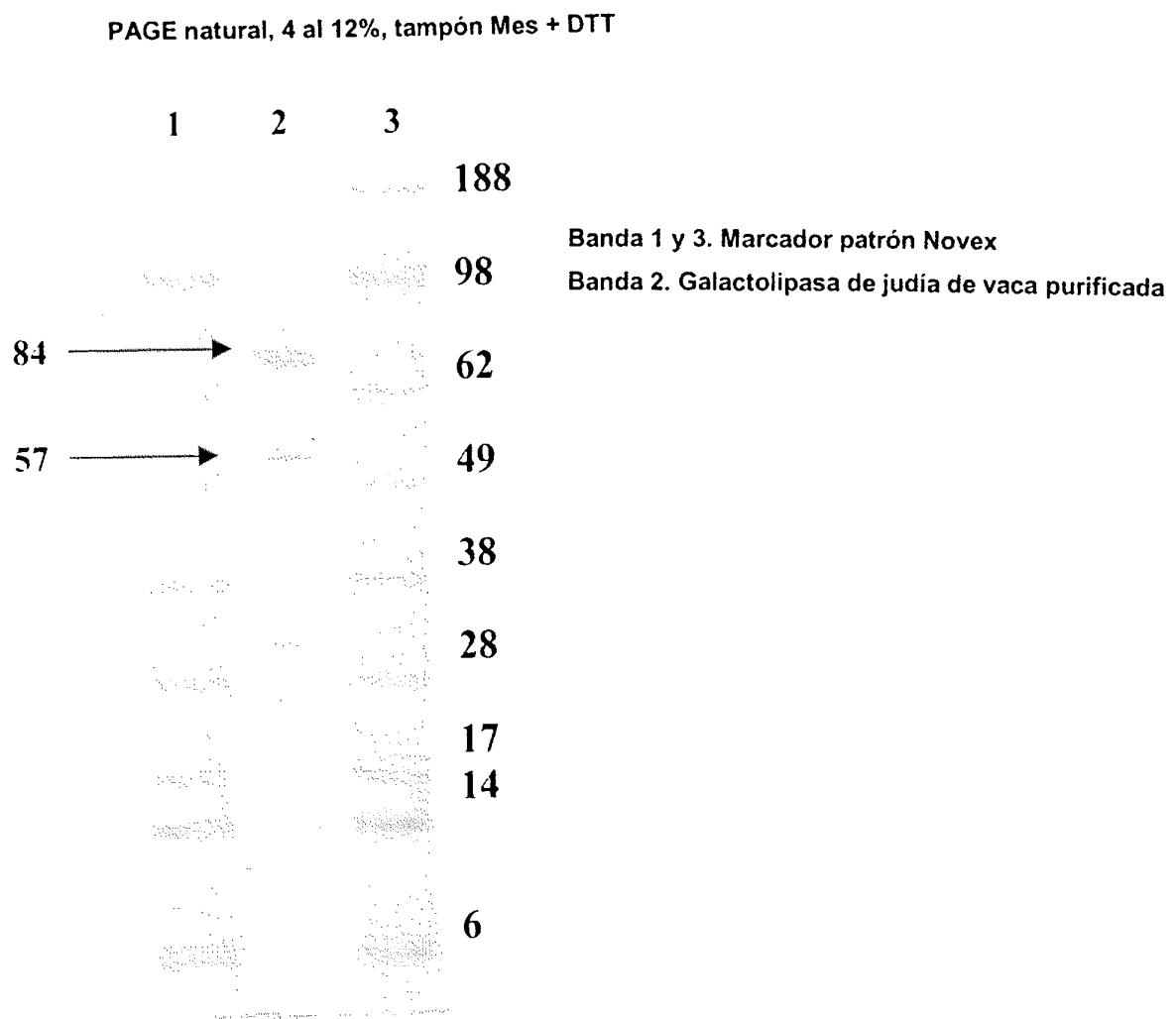


FIGURA 4

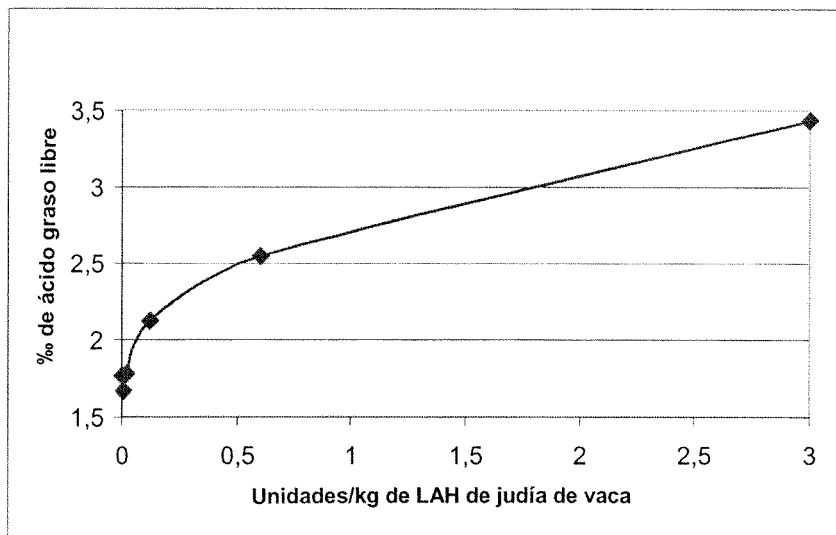


FIGURA 5

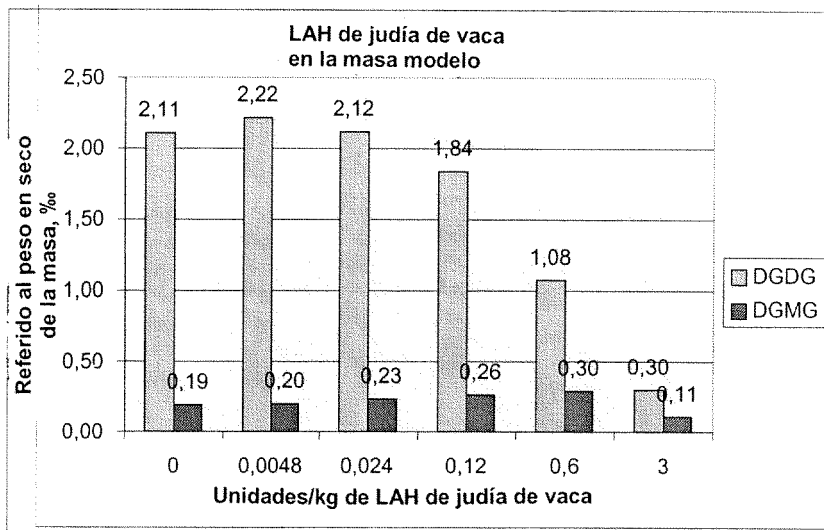


FIGURA 6

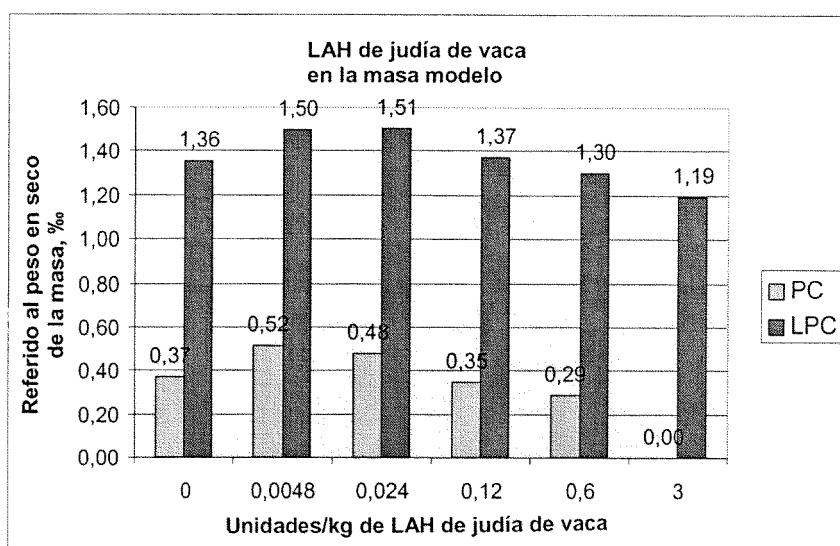


FIGURA 7

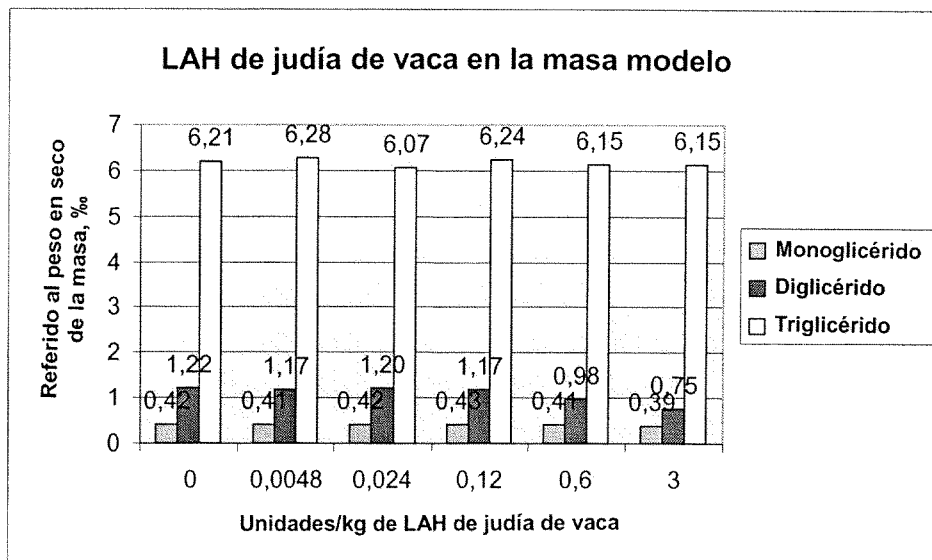


FIGURA 8

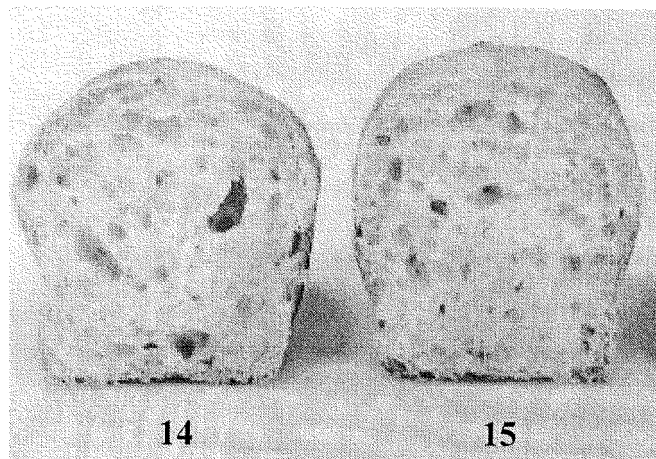


FIGURA 9

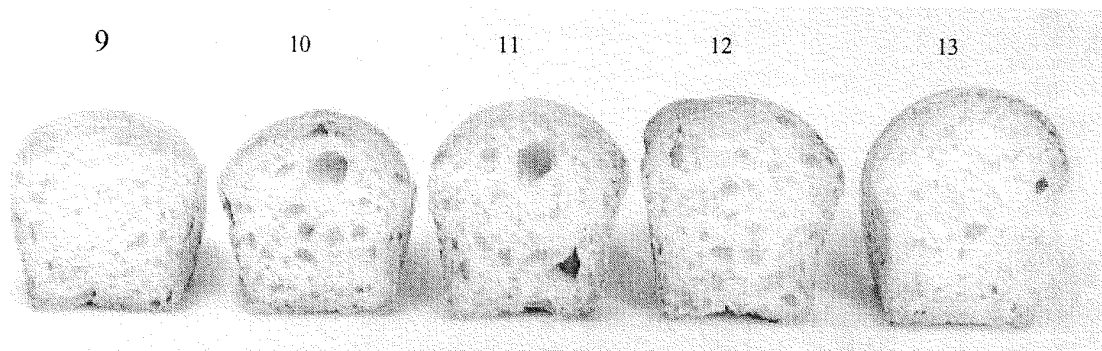


FIGURA 10

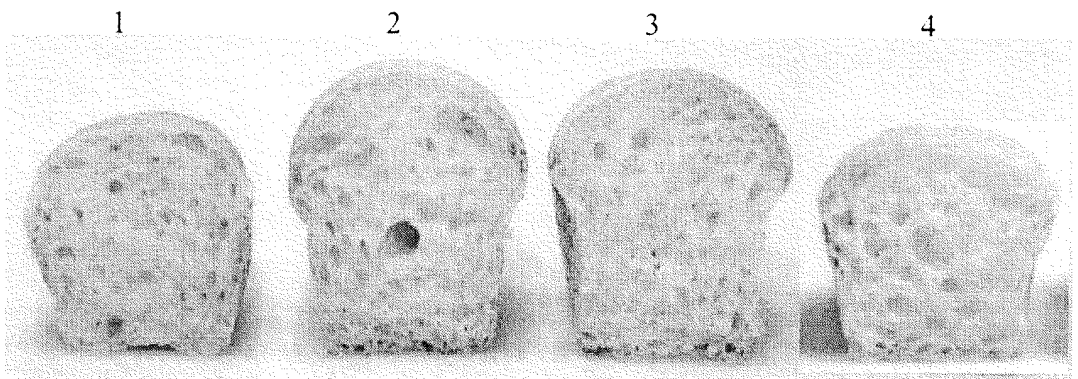


FIGURA 11

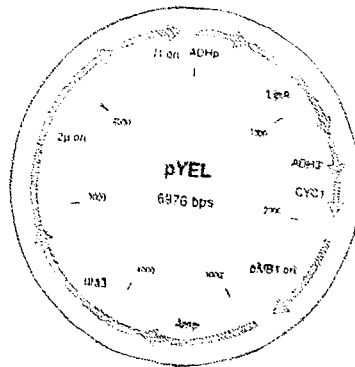
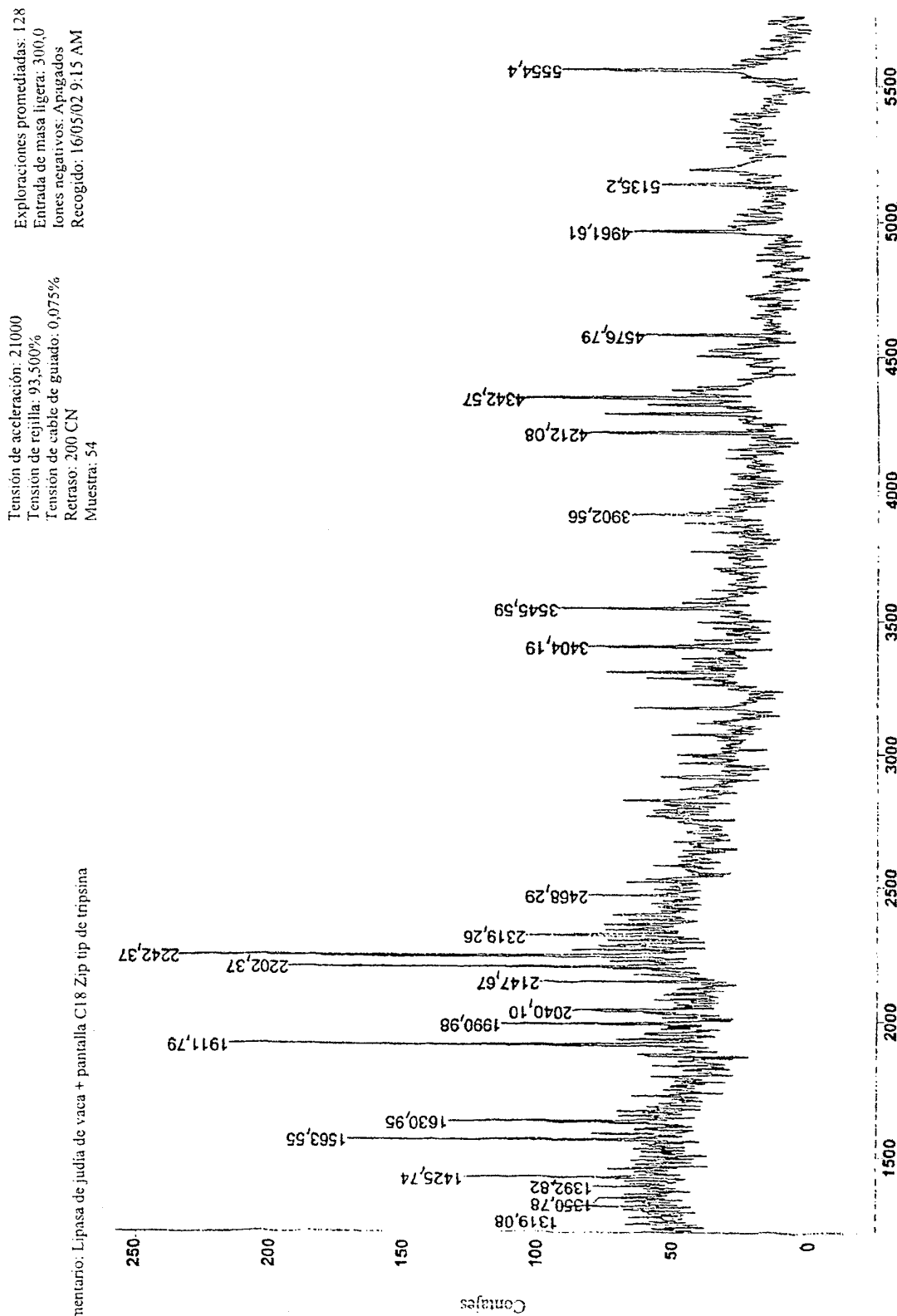


FIGURA 12



ES 2 284 897 T3

FIGURA 13

[GPMaw] 16/ 5/2

Proteína: Lipasa de judía de vaca
 Origen del archivo: N°: 0
 Condiciones de escisión: /K/R-AP

Archivo de masa: CM-

Masa mostrada: Media verage

Nº.	Desde-	Hasta	Masa s	Ch	B&B	HPLC	Sec.
1	1-	9	934,09	1	2820	9,39	MAATQTPSK
2	10-	27	1771,01	-2	-2070	23,25	VDDGALITVLSIDGGGIR
3	28-	44	1841,23	-1	-7540	29,28	GIIPGILLAFLESELOK
4	45-	51	716,75	-1	2290	9,23	LDGADAR
5	52-	86	3656,14	-1	-1710	27,25	LADYFDVIAGTSTGGLVTAMLTAPNENNRPLYAAK
6	87-	89	374,44	0	-380	6,68	DIK
7	90-	98	1149,27	0	-2210	17,71	DFYLEHTPK
8	99-	114	1794,11	1	-3010	24,71	IFPQSSWNLIATAMK
9	115-	115	146,19	1	460	1,09	K
10	116-	117	231,26	1	1500	2,11	GR
11	118-	127	1095,25	0	170	16,42	SLMGPPQYDGK
12	128-	131	559,67	2	-1930	12,20	YLHK
13	132-	134	386,50	1	-1710	8,75	LVR
14	135-	136	275,31	0	970	1,51	EK
15	137-	141	531,61	1	800	5,45	LGNTK
16	142-	157	1810,13	0	-5040	22,49	LEHTLTNVVIPAFDIK
17	158-	170	1478,72	1	-2320	21,19	NLQPAIFSSSQVK
18	171-	171	146,19	1	460	1,09	K
19	172-	201	3368,74	1	-2990	30,83	RPYLNAAALSDICISTSAAPTYLPAHCFETK
20	202-	208	740,82	1	970	9,94	TSTASFK
21	209-	234	2673,00	-3	590	21,46	FDLVDGGVAANNPALVAMAEVSNEIR
22	235-	243	965,01	0	2830	12,66	NEGSCASLK
23	244-	250	875,08	2	-2110	14,08	VKPLQYK
24	251-	251	146,19	1	460	1,09	K
25	252-	267	1803,08	1	-1100	23,26	FLVISLGTGSQQHEMR
26	268-	272	582,62	0	670	7,13	YSADK
27	273-	313	4353,84	0	-4340	35,98	ASTWGLVGWLSSSGGTPLIDVFSHASSDMVDFHISSVFQAR
28	314-	321	1030,11	1	1280	12,48	HAEQNYLR
29	322-	340	1977,11	-4	1650	18,47	IQDDTLTGDLGSVDVATEK
30	341-	354	1481,76	0	-2350	18,34	NLNGLVQVAEALLK
31	355-	359	557,70	2	420	4,85	KPVSK
32	360-	363	514,63	1	-1520	10,70	INLR
33	364-	381	1939,07	-2	3980	14,73	TGIHEPVESNETNAEALK
34	382-	382	174,21	1	690	1,41	R
35	383-	386	463,54	1	390	9,62	FAAR
36	387-	391	616,68	1	1320	7,10	LSNQR
37	392-	392	174,21	1	690	1,41	R
38	393-	394	321,38	1	-830	8,94	FR
39	395-	395	146,19	1	460	1,09	K
40	396-	400	552,59	0	770	10,45	SQTFK