

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 484 919**

51 Int. Cl.:

C12P 7/64 (2006.01)

C11B 3/00 (2006.01)

C11C 3/08 (2006.01)

C11C 3/10 (2006.01)

C12N 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2009 E 09789233 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.04.2014 EP 2329032**

54 Título: **Métodos que usan polipéptidos que tienen actividad de hidrolasa**

30 Prioridad:

29.08.2008 US 202204

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.08.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**DAYTON, CHRISTOPHER, L., G.;
BARTON, NELSON;
BUENO, ANALIA;
CUENCA, JOSLIN, G.;
HITCHMAN, TIM;
KLINE, KATIE, A.;
LYON, JONATHAN;
MILLER, MARK, L. y
WALL, MARK, A.**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 484 919 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos que usan polipéptidos que tienen actividad de hidrolasa

Lista de secuencias

5 La presente solicitud está siendo presentada con una lista de secuencias enviada con el nombre de archivo 011631-0045-228_SeqListing.txt, de tamaño 46.086 bytes, que se creó el 25 de agosto de 2009.

Campo técnico

10 La invención se refiere a métodos para usar polipéptidos que tienen actividad de hidrolasa, incluidas actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa. La invención se refiere también a métodos para tratamiento de grasas y aceites con péptidos y polipéptidos, p. ej., enzimas, que tienen actividad de una hidrolasa, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas, para preparar productos de aceite hidrolizado tales como aceites animales poco saturados y aceites vegetales, p. ej., aceites de soja o canola.

Antecedentes

15 Las aplicaciones industriales importantes para hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas, incluyen la industria de alimentos y bebidas, como agentes antienviejecimiento para productos de panadería, y en la producción de margarina y otros untables con sabores a mantequilla natural; en sistemas de desecho; y en la industria farmacéutica en donde se utilizan como auxiliares digestivos.

Los aceites y grasas procesados son un componente principal de alimentos, aditivos de alimentos y auxiliares de procesamiento de alimentos, y son también materias primas renovables importantes para la industria química.

20 Están disponibles en grandes cantidades desde el procesamiento de semillas oleaginosas de plantas como arroz, centeno, maíz, colza, canola, girasol, oliva, palma o soja. Otras fuentes valiosas de aceites y grasas incluyen pescado, desechos de restaurantes y grasas animales. Estas grasas y aceites son una mezcla de triacilglicéridos o lípidos, es decir, ácidos grasos (FA) esterificados en un soporte de glicerol.

25 Cada aceite o grasa contiene una amplia variedad de distintas estructuras de lípidos, definidas por el contenido de FA y su distribución regioquímica en la estructura de glicerol. Estas propiedades de los lípidos individuales determinan las propiedades físicas del triacilglicérido puro. En consecuencia, el contenido de triacilglicérido de una grasa o un aceite en gran medida determina las propiedades físicas, químicas y biológicas del aceite. El valor de los lípidos aumenta en gran medida como una función de su pureza. La alta pureza puede lograrse por cromatografía fraccionada o destilación, separando el triacilglicérido deseado del fondo mixto de la fuente de grasa o aceite. No obstante, esto es costoso y los rendimientos por lo general son limitados por los bajos niveles en los que puede ocurrir el triacilglicérido. A su vez, la facilidad de purificación del producto con frecuencia está comprometida por la presencia de muchos triacilglicéridos estructural y física o químicamente similares en el aceite.

35 Una alternativa a la purificación de triacilglicéridos u otros lípidos de una fuente natural es sintetizar los lípidos. Los productos de dichos procedimientos se llaman lípidos estructurados porque contienen un conjunto definido de ácidos grasos distribuidos en un modo definido en la estructura del glicerol. El valor de los lípidos también aumenta en gran medida controlando el contenido de ácido graso y la distribución dentro del lípido. La eliminación de triglicéridos, grasas u otros FA no deseables, o el reemplazo de FA con propiedades no deseables por ácidos grasos con mejores propiedades químicas, físicas o biológicas deseables, aumenta el valor de los lípidos. En particular, existe la necesidad de lipasas que puedan hidrolizar, p. ej., hidrolizar selectivamente, un ácido graso saturado (una "saturasa") o aquellas que en particular, pueden hidrolizar, p. ej., hidrolizar selectivamente, un ácido palmítico (una "palmitasa") o un ácido esteárico (una "estearatasa") de una estructura de glicerol. Las lipasas, tales como las saturasas, p. ej., palmitasas y/o estearatasas, se pueden usar para efectuar dicho control en donde el FA que se está eliminando, añadiendo o reemplazando consiste en ácidos grasos saturados, p. ej., ácido palmitático o ácido esteárico.

Compendio

45 La presente invención da a conocer diversos métodos como se reivindica, donde dichos métodos utilizan polipéptidos con actividad de una hidrolasa y o bien

50 i. están codificados por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la longitud total de la SEC ID NÚM:1 y donde el ácido nucleico codifica por lo menos un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa y el polipéptido tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y además tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 16 o Tabla 23, o su secuencia complementaria; o

ii. tienen por lo menos 85% identidad de secuencia con la longitud total de la SEC ID NÚM:2, y tienen mutaciones D61E, R72K y V163R, y adicionalmente tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 16 o Tabla 23; o

iii. comprenden una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2 pero también comprenden por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R o sus combinaciones; o

- 5 iv. comprenden una secuencia de aminoácidos expuesta en SEC ID NÚM:2 pero también comprenden por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q sus combinaciones.

La invención se refiere en general a métodos que usan polipéptidos que tienen actividad de hidrolasa, incluida actividad de lipasa. Por lo tanto se describen nuevas clases de lipasas denominadas "saturadas", "palmitadas" y "estearadas". También se describen polinucleótidos que codifican polipéptidos que tienen actividad de saturada, p. ej., actividad de palmitada y/o estearada, y métodos para elaborarlos usando los polinucleótidos y polipéptidos descritos. En un aspecto, se describen en este documento polipéptidos, p. ej., enzimas, que tienen actividad de hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturada, palmitada y/o estearada que tienen actividad enzimática (catalítica) termoestable y/o termotolerante. Las actividades enzimáticas de los polipéptidos y péptidos incluyen (comprenden o consisten en) una actividad de saturada o una actividad de lipasa, incluida la hidrólisis de lípidos, reacciones de acidólisis (p. ej., reemplazar un ácido graso esterificado con un ácido graso libre), reacciones de transesterificación (p. ej., intercambio de ácidos grasos entre triacilglicéridos), síntesis estérica, reacciones de intercambio de ésteres y actividad de acil hidrolasa de lípidos (LAH). En otro aspecto, los polipéptidos descritos en este documento se usan para sintetizar productos quirales enantioméricamente puros.

Los polipéptidos descritos en este documento se pueden utilizar en una diversidad de contextos farmacéuticos, agrícolas e industriales, que incluyen la fabricación de cosméticos y nutracéuticos. Además, los polipéptidos descritos en este documento se pueden emplear en el procesamiento de alimentos, industria cervecera, aditivos para baño, producción de alcohol, síntesis peptídica, enantioselectividad, preparación de pieles en la industria del cuero, manejo de desechos y degradación de desechos animales, recuperación de plata en la industria fotográfica, tratamiento médico, desgomado de seda, degradación de biopelícula, conversión de biomasa a etanol, biodefensa, agentes antimicrobianos y desinfectantes, cuidado personal y cosmética, reactivos biotecnológicos, para aumentar la producción de almidón de molienda húmedas de almidón, y como productos farmacéuticos tales como auxiliares digestivos y antiinflamatorios (antiflogísticos).

Se describen en este documento composiciones (p. ej., lipasas, saturadas, palmitadas y/o estearadas) y métodos para producir aceites poco saturados, p. ej., aceites con un contenido de ácido graso saturado inferior, incluidos aceites bajos en ácidos grasos de palmitato, estearato, miristato, laurato o butirato y/o ácido caprílico (ácido octanoico). Cualquier aceite vegetal, p. ej., aceite de canola, aceite de soja, o aceite o grasa animal, p. ej., sebo, se puede tratar con una composición o con un método provisto en este documento. Cualquier alimento, producto comestible, o artículo de panadería, para freír o para cocinar (p. ej., salsas, marinadas, condimentos, aceites en aerosol, margarinas, aceites para hornear, mayonesa, aceites de cocina, aceites para ensalada, aderezos para servir con cuchara o verter y similares, y productos elaborados con éstos) puede comprender un aceite vegetal o grasa animal que se ha tratado con una composición o con un método del presente documento. Los aceites vegetales que serán aceites de saturación inferior pueden usarse en cualquier alimento, artículo comestible o producto de panadería o cocina, p. ej., salsas, marinadas, condimentos, aceites en aerosol, margarinas, aceites para hornear, mayonesa, aceites de cocina, aceites para ensalada, aderezos para servir con cuchara o verter y similares. Se describen en el presente documento aceites, tales como aceites vegetales, p. ej., aceite de canola o aceite de soja, y alimentos o productos de panadería o de cocina, incluidos salsas, marinadas, condimentos, aceites en aerosol, mayonesa, aceites para hornear, aceites de cocina, aceites para freír, aderezos para servir con cuchara o verter y similares, en donde el aceite o el alimento, producto de panadería o cocina ha sido modificado usando una enzima descrita en la presente invención. En un aspecto, estos aceites vegetales, p. ej., aceite de canola, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de coriandro, aceite de maíz, aceite de semillas de algodón, aceite de avellana, aceite de cáñamo, aceite de lino, aceite de hierba de la pradera (*meadowfoam*), aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de girasol, aceite de sasanqua, aceite de soja, aceite de resina, aceite de tsubaki, variedades de aceites "naturales" que tienen composiciones de ácido graso alteradas mediante organismos genéticamente modificados (GMO) o de "cruzas" tradicionales tales como los aceites de alto contenido oleico, bajo contenido linolénico o pocos saturados (aceite de canola de alto contenido oleico, aceite de soja de bajo contenido linolénico o aceites de girasol de alto contenido esteárico), grasas animales (sebo, manteca de cerdo, grasa de mantequilla y grasa de pollo), aceites de pescado (aceite de pez vela, aceite de hígado de bacalao, aceite de pargo alazán, aceite de sardina, aceite de arenque y aceite de sábalo), o mezclas de cualquiera de los mencionados anteriormente, y alimentos o productos para hornear, freír o cocinar, comprenden aceites con un contenido de ácido graso saturado inferior, incluidos aceites con bajo contenido de ácido palmítico, ácido mirístico, ácido láurico, ácido esteárico, ácido caprílico (ácido octanoico) etc., procesados usando una composición o método provisto en el presente documento.

Se describen en la presente invención polipéptidos, por ejemplo, enzimas y anticuerpos catalíticos, que tienen actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturada, palmitada y/o estearada, incluidas actividades enzimáticas termoestables y termotolerantes, y actividades específicas de ácidos grasos o selectivas de ácidos grasos, y actividades enzimáticas tolerantes a pH bajo o alto, y polinucleótidos que codifican estos polipéptidos,

incluyendo vectores, células hospedantes, plantas transgénicas y animales no humanos, y métodos para elaborar y usar estos polinucleótidos y polipéptidos.

Se describen en este documento ácidos nucleicos sintéticos o recombinantes aislados que comprenden

- 5 (a) un ácido nucleico (polinucleótido) que codifica por lo menos un polipéptido, en donde el ácido nucleico comprende una secuencia que tiene (i) por lo menos aproximadamente 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, de identidad de secuencia completa (100%) con:
10 (i) SEC ID NÚM:1, SEC ID NÚM:3, SEC ID NÚM:5, SEC ID NÚM:7, SEC ID NÚM:9, SEC ID NÚM: 11, SEC ID NÚM: 13, SEC ID NÚM: 15, SEC ID NÚM: 17, SEC ID NÚM: 19, SEC ID NÚM:22 o SEC ID NÚM:23, o
(ii) el ácido nucleico de SEC ID NÚM: 1 que tiene uno o más cambios de nucleótidos (o su equivalente) que codifican uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro o más, o todos los cambios de aminoácidos (o su equivalente) como se expone en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23,
15 en donde el ácido nucleico de (i) o (ii) codifica por lo menos un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., una actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, o codifica un polipéptido o péptido capaz de generar un anticuerpo específico de hidrolasa (p. ej., una lipasa, una saturasa, una palmitasa y/o una estearatasa) (un polipéptido o péptido que actúa como un epítipo o inmunógeno),
20 (b) el ácido nucleico (polinucleótido) de (a), en donde las identidades de secuencia se determinan: (A) por análisis con un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual, o (B) en una región de por lo menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, 1050, 1100, 1150, 1200, 1250, 1300, 1350, 1400, 1450, 1500, 1550 o más residuos, o la longitud total de un cDNA, transcrito (mRNA) o gen,
25 (c) el ácido nucleico (polipéptido) de (a) o (b), en donde el algoritmo de comparación de secuencias es el algoritmo BLAST versión 2.2.2, en donde se regula un ajuste de filtro a blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F, y todas las otras opciones se ajustan por defecto,
(d) un ácido nucleico (polinucleótido) que codifica por lo menos un polipéptido o péptido que tiene actividad de hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, en donde el ácido nucleico comprende una
30 secuencia que se hibrida bajo condiciones rigurosas al complemento del ácido nucleico de (a), (b) o (c), en donde las condiciones rigurosas comprenden una etapa de lavado en 0,2X SSC a una temperatura de aproximadamente 65°C durante aproximadamente 15 minutos,
(e) un ácido nucleico (polinucleótido) que codifica por lo menos un polipéptido que tiene una actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, en donde el polipéptido comprende la
35 secuencia de SEC ID NÚM:2, o sus fragmentos enzimáticamente activos, que tienen por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro o más, o todos los cambios de aminoácidos (o su equivalente) como se expone en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23,
(f) un ácido nucleico (polinucleótido) que codifica por lo menos un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, en donde el polipéptido comprende la secuencia de SEC
40 ID NÚM:2, SEC ID NÚM:4, SEC ID NÚM: 6, SEC ID NÚM:8, SEC ID NÚM:10, SEC ID NÚM: 12, SEC ID NÚM:14, SEC ID NÚM: 16, SEC ID NÚM: 18 o SEC ID NÚM:20 o sus fragmentos enzimáticamente activos,
(g) (A) el ácido nucleico (polinucleótido) de cualquiera de (a) a (f) y que codifica un polipéptido que tiene por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora y que retiene su actividad de hidrolasa, p. ej., actividad de
45 lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, o, (B) el ácido nucleico de (g)(A), en donde por lo menos una sustitución de aminoácido conservadora comprende sustituir un aminoácido con otro aminoácido de características similares; o, una sustitución de aminoácido conservadora comprende: el reemplazo de un aminoácido alifático con otro aminoácido alifático; el reemplazo de una serina con una treonina o viceversa; el reemplazo de un residuo ácido con otro residuo ácido; el reemplazo de un residuo que porta un grupo amida con otro residuo que porta un grupo amida; el intercambio de un residuo básico con otro residuo básico; o el reemplazo de un residuo aromático con otro residuo
50 aromático,
(h) el ácido nucleico (polinucleótido) de cualquiera de (a) a (g) que codifica un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa pero que carece de una secuencia de señalización,

(i) el ácido nucleico (polinucleótido) de cualquiera de (a) a (h) que codifica un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, que además comprende una secuencia heteróloga,

5 (j) el ácido nucleico (polinucleótido) de (i), en donde la secuencia heteróloga comprende, o consiste en, una secuencia que codifica: (A) una secuencia de señalización heteróloga, (B) la secuencia de (A), en donde la secuencia de señalización heteróloga deriva de una enzima heteróloga, o, (C) una marca, un epítipo, un péptido de direccionamiento, una secuencia de escisión, un resto detectable o una enzima, o

(k) una secuencia de ácido nucleico (polinucleótido) totalmente complementaria a la secuencia de cualquiera de (a) a (j).

10 En un aspecto, el ácido nucleico sintético o recombinante aislado codifica un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, que es termoestable. Los polipéptidos y péptidos codificados por ácidos nucleicos que se describen en este documento, o cualquier polipéptido o péptido descrito en esta memoria, pueden retener actividad enzimática o de unión (p. ej., unión de sustrato) bajo condiciones que comprenden un intervalo de temperatura entre aproximadamente -100°C y aproximadamente -80°C,
15 aproximadamente -80°C y aproximadamente -40°C, aproximadamente -40°C y aproximadamente -20°C, aproximadamente -20°C y aproximadamente 0°C, aproximadamente 0°C y aproximadamente 5°C, aproximadamente 5°C y aproximadamente 15°C, aproximadamente 15°C y aproximadamente 25°C, aproximadamente 25°C y aproximadamente 37°C, aproximadamente 37°C y aproximadamente 45°C, aproximadamente 45°C y aproximadamente 55°C, aproximadamente 55°C y aproximadamente 70°C, aproximadamente 70°C y
20 aproximadamente 75°C, aproximadamente 75°C y aproximadamente 85°C, aproximadamente 85°C y aproximadamente 90°C, aproximadamente 90°C y aproximadamente 95°C, aproximadamente 95°C y aproximadamente 100°C, aproximadamente 100°C y aproximadamente 105°C, aproximadamente 105°C y aproximadamente 110°C, aproximadamente 110°C y aproximadamente 120°C, o 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C,
25 100°C, 101°C, 102°C, 103°C, 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C o más. Se describen en el presente documento polipéptidos termoestables que retienen actividad de hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, a una temperatura en los intervalos anteriormente descritos, a aproximadamente pH 3,0, aproximadamente pH 3,5, aproximadamente pH 4,0, aproximadamente pH 4,5, aproximadamente pH 5,0, aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 6,5, aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 8,0,
30 aproximadamente pH 8,5, aproximadamente pH 9,0, aproximadamente pH 9,5, aproximadamente pH 10,0, aproximadamente pH 10,5, aproximadamente pH 11,0, aproximadamente pH 11,5, aproximadamente pH 12,0 o más.

En un aspecto, los polipéptidos descritos en la presente invención pueden ser termotolerantes y pueden retener actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, después de la exposición
35 a una temperatura en el intervalo entre aproximadamente -100°C y aproximadamente -80°C, aproximadamente -80°C y aproximadamente -40°C, aproximadamente -40°C y aproximadamente -20°C, aproximadamente -20°C y aproximadamente 0°C, aproximadamente 0°C y aproximadamente 5°C, aproximadamente 5°C y aproximadamente 15°C, aproximadamente 15°C y aproximadamente 25°C, aproximadamente 25°C y aproximadamente 37°C, aproximadamente 37°C y aproximadamente 45°C, aproximadamente 45 °C y aproximadamente 55°C,
40 aproximadamente 55°C y aproximadamente 70°C, aproximadamente 70°C y aproximadamente 75°C, aproximadamente 75°C y aproximadamente 85°C, aproximadamente 85°C y aproximadamente 90°C, aproximadamente 90°C y aproximadamente 95°C, aproximadamente 95°C y aproximadamente 100°C, aproximadamente 100°C y aproximadamente 105°C, aproximadamente 105°C y aproximadamente 110°C, aproximadamente 110°C y aproximadamente 120°C o 95°C, 96°C, 97°C, 98°C, 99°C, 100°C, 101°C, 102°C, 103°C,
45 104°C, 105°C, 106°C, 107°C, 108°C, 109°C, 110°C, 111°C, 112°C, 113°C, 114°C, 115°C o más.

Se describe que los polipéptidos termotolerantes retienen actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, después de la exposición a una temperatura en los intervalos anteriormente descritos, a aproximadamente pH 3,0, aproximadamente pH 3,5, aproximadamente pH 4,0, aproximadamente pH 4,5, aproximadamente pH 5,0, aproximadamente pH 5,5, aproximadamente pH 6,0, aproximadamente pH 6,5,
50 aproximadamente pH 7,0, aproximadamente pH 7,5, aproximadamente pH 8,0, aproximadamente pH 8,5, aproximadamente pH 9,0, aproximadamente pH 9,5, aproximadamente pH 10,0, aproximadamente pH 10,5, aproximadamente pH 11,0, aproximadamente pH 11,5, aproximadamente pH 12,0 o más.

Se describen ácidos nucleicos sintéticos o recombinantes aislados que comprenden una secuencia que se hibrida bajo condiciones rigurosas a un ácido nucleico como se describe en este documento, p. ej., un ácido nucleico
55 ilustrativo descrito en este documento que comprende una secuencia expuesta en SEC ID NÚM: 1, SEC ID NÚM:3, SEC ID NÚM:5, SEC ID NÚM:7, SEC ID NÚM:9, SEC ID NÚM:11, SEC ID NÚM: 13, SEC ID NÚM: 15, SEC ID NÚM: 17, SEC ID NÚM: 19, SEC ID NÚM:22 o SEC ID NÚM:23, o una secuencia expuesta en SEC ID NÚM:1 que tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más, o todos los cambios de residuos de aminoácidos (modificaciones de secuencias a SEC ID NÚM: 1) expuestos en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10,
60 Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, o sus fragmentos o subsecuencias, y las secuencias totalmente complementarias a éstos. En un aspecto, el ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad

de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa. El ácido nucleico puede tener por lo menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o más residuos de longitud o la longitud total de un gen o transcrito que comprende la SEC ID NÚM: 1, y que tiene una secuencia como la expuesta en la SEC ID NÚM: 1 que tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más, o todos los cambios de residuos de aminoácidos (modificaciones de secuencias de aminoácidos) a la SEC ID NÚM:1 expuesta en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23; y las secuencias totalmente complementarias a éstos. En un aspecto, las condiciones rigurosas incluyen una etapa de lavado que comprende un lavado 0,2X SSC a una temperatura de aproximadamente 65°C durante aproximadamente 15 minutos.

Se describe una sonda de ácido nucleico, p. ej., una sonda para identificar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, que comprende una sonda que comprende o consiste en por lo menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o más bases consecutivas de una secuencia descrita en este documento, o sus fragmentos o subsecuencias, en donde la sonda identifica el ácido nucleico por unión o hibridación. La sonda puede comprender un oligonucleótido que comprende por lo menos aproximadamente 10 a 50, aproximadamente 20 a 60, aproximadamente 30 a 70, aproximadamente 40 a 80 o aproximadamente 60 a 100 bases consecutivas de una secuencia descrita en este documento, o sus fragmentos o subsecuencias. La sonda puede comprender un oligonucleótido que comprende por lo menos aproximadamente 10 a 50, aproximadamente 20 a 60, aproximadamente 30 a 70, aproximadamente 40 a 80 o aproximadamente 60 a 100 bases consecutivas de un ácido nucleico descritos en la presente invención, o sus fragmentos o subsecuencias.

Se describe un par de secuencias cebadoras de ampliación para ampliar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, que comprende un par de cebadores que comprenden o consisten en un par de cebadores capaces de ampliar un ácido nucleico que comprende una secuencia descrita en este documento, o sus fragmentos o subsecuencias. Uno o cada miembro del par de secuencias cebadoras de ampliación puede comprender un oligonucleótido que comprende por lo menos aproximadamente 10 a 50 bases consecutivas de la secuencia.

Se describen métodos para ampliar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, que comprende la ampliación de un ácido nucleico de molde con un par de secuencias de cebadores de ampliación capaz de ampliar una secuencia de ácido nucleico descrita en este documento, o sus fragmentos o subsecuencias.

Se describen casetes de expresión que comprenden un ácido nucleico descrito en el presente documento o una subsecuencia de éste. En un aspecto, el casete de expresión puede comprender un ácido nucleico que está operativamente ligado a un promotor. El promotor puede ser un promotor vírico, bacteriano, mamífero o vegetal. En un aspecto, el promotor vegetal puede ser un promotor de patata, arroz, maíz, trigo, tabaco o cebada. El promotor puede ser un promotor constitutivo. El promotor constitutivo puede comprender CaMV35S. En otro aspecto, el promotor puede ser un promotor inducible. En un aspecto, el promotor puede ser un promotor específico de tejido o un promotor regulado por el ambiente o por el desarrollo. Por lo tanto, el promotor puede ser, p. ej., un promotor específico de semillas, específico de hojas, específico de raíces, específico de tallos, o un promotor inducido por abscisión. En un aspecto, el casete de expresión puede además comprender un vector de expresión vegetal, o vírico vegetal.

Se describen vehículos de clonación que comprenden un casete de expresión (p. ej., un vector) como se describe en esta memoria o un ácido nucleico descrito en esta memoria. El vehículo de clonación puede ser un vector vírico, un plásmido, un fago, un fagémido, un cósmido, un fósido, un bacteriófago o un cromosoma artificial. El vector vírico puede comprender un vector de adenovirus, un vector retrovírico o un vector vírico adeno-asociado. El vehículo de clonación puede comprender un cromosoma artificial bacteriano (BAG), un plásmido, un vector derivado de P1 bacteriófago (PAC), un cromosoma artificial de levadura (YAC) o un cromosoma artificial de mamífero (MAC).

Se describen células transformadas que comprenden un ácido nucleico descrito en esta memoria o un casete de expresión descrito en esta memoria (p. ej., un vector) como se describe en la presente memoria, o un vehículo de clonación como se describe en esta memoria. En un aspecto, la célula transformada puede ser una célula bacteriana, una célula mamífera, una célula fúngica, una célula de levadura, una célula de insecto o una célula vegetal. En un aspecto, la célula vegetal puede ser una célula de patata, trigo, arroz, maíz, tabaco o cebada. La célula transformada puede ser cualquiera de las células hospedantes familiares para el experto en la técnica, incluidas células procariotas, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células mamíferas, células de insecto o células vegetales.

Las células bacterianas ilustrativas incluyen cualquier especie dentro de los géneros *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Salmonella*, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*, incluyendo, p. ej., *Escherichia coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*. Las células fúngicas ilustrativas incluyen cualquier especie de *Aspergillus*. Las células de levadura ilustrativas incluyen cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Schwanniomyces*, incluidas *Pichia pastoris*, *Saccharomyces*

cerevisiae o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células de insecto ilustrativas incluyen cualquier especie de *Spodoptera* o *Drosophila*, incluidas *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Las células animales ilustrativas incluyen CHO, COS o melanoma Bowes o cualquier línea celular de ratón o ser humano.

5 Se describen plantas transgénicas que comprenden un ácido nucleico como se describe en esta invención o un casete de expresión (p. ej., un vector) como se describe en esta invención. La planta transgénica puede ser una planta de maíz, patata, tomate, trigo, semilla oleaginosa, colza, soja, arroz, cebada o tabaco.

10 Se describen semillas transgénicas que comprenden un ácido nucleico descrito en este documento o un casete de expresión (p. ej., un vector) descrito en este documento. La semilla transgénica puede ser arroz, semilla de maíz, un grano de maíz, una semilla oleaginosa, una semilla de colza, una semilla de frijol de soja, un palmiste, una semilla de girasol, una semilla de sésamo, un cacahuete o una semilla de la planta de tabaco.

Se describen polipéptidos sintéticos o recombinantes aislados que tienen actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, o polipéptidos capaces de generar una respuesta inmunitaria para una hidrolasa, p. ej., una lipasa, una saturasa, una palmitasa y/o una estearatasa (p. ej., un epítipo); y en aspectos alternativos los péptidos y polipéptidos descritos en este documento comprenden una secuencia:

15 (a) que tiene por lo menos aproximadamente 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, o tiene 100% de identidad de secuencia (completa) hacia:

20 (i) la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NÚM:2, o sus fragmentos enzimáticamente activos, y que tiene por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte, veintiuno, veintidós, veintitrés, veinticuatro o más, o todos los cambios de residuos de aminoácidos (o su equivalente) como se expone en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, o

25 (ii) la secuencia de aminoácidos de SEC ID NÚM:2, SEC ID NÚM:4, SEC ID NÚM:6, SEC ID NÚM:8, SEC ID NÚM:10, SEC ID NÚM:12, SEC ID NÚM:14, SEC ID NÚM:16, SEC ID NÚM:18 o SEC ID NÚM:20

en donde el polipéptido o péptido de (i) o (ii) tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, o el polipéptido o péptido es capaz de generar un anticuerpo específico de hidrolasa (p. ej., una lipasa, una saturasa, una palmitasa y/o una estearatasa) (un polipéptido o péptido que actúa como un epítipo o inmunógeno),

30 (b) el polipéptido o péptido de (a), en donde las identidades de secuencia se determinan: (A) por análisis con un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual, o (B) en una región de por lo menos aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 75, 100, 150, 200, 250, 300 o residuos de aminoácidos, en toda la longitud del polipéptido o péptido o enzima, y/o sus subsecuencias (fragmentos) enzimáticamente activas,

35 (c) el polipéptido o péptido de (b), en donde el algoritmo de comparación de secuencias es un algoritmo BLAST versión 2.2.2 en donde se regula un ajuste de filtro a blastall -p blastp -d "nr pataa" -F F, y todas las otras opciones se ajustan por defecto.

40 (d) una secuencia de aminoácidos codificada por el ácido nucleico descrito en esta memoria, en donde el polipéptido tiene (i) actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, o, (ii) tiene actividad inmunogénica en el sentido que es capaz de generar un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido que tiene una secuencia de (a), y/o sus subsecuencias (fragmentos) enzimáticamente activas;

(e) la secuencia de aminoácidos de cualquiera de (a) a (d), y que comprende por lo menos una sustitución de residuos de aminoácidos conservadora, y el polipéptido o péptido retiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa;

45 (f) la secuencia de aminoácidos de (e), en donde la sustitución conservadora comprende el reemplazo de un aminoácido alifático por otro aminoácido alifático; el reemplazo de una serina por una treonina o viceversa; el reemplazo de un residuo ácido por otro residuo ácido; el reemplazo de un residuo que porta un grupo amida por otro residuo que porta un grupo amida; el intercambio de un residuo básico con otro residuo básico; o el reemplazo de un residuo aromático por otro residuo aromático, o una combinación de éstos,

50 (g) la secuencia de aminoácidos de (f), en donde el residuo alifático comprende alanina, valina, leucina, isoleucina o su equivalente sintético; el residuo ácido comprende ácido aspártico, ácido glutámico o su equivalente sintético; el residuo que porta un grupo amida que comprende asparagina, glutamina o su equivalente sintético; el residuo básico comprende lisina, arginina, histidina o su equivalente sintético; o, el residuo aromático comprende fenilalanina, tirosina, triptófano o su equivalente sintético;

(h) el polipéptido de cualquiera de (a) a (f) que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, pero que carece de una secuencia de señalización,

(i) el polipéptido de cualquiera de (a) a (h) que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, que además comprende una secuencia heteróloga;

5 (j) el polipéptido de (i), en donde la secuencia heteróloga comprende o consiste en:

(A) una secuencia de señalización heteróloga, (B) la secuencia de (A), en donde la secuencia de señalización heteróloga deriva de una enzima heteróloga y/o, (C) una marca, epítopo, un péptido de direccionamiento, una secuencia escindible, una enzima o resto detectable; o

10 (m) que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por cualquier secuencia de ácido nucleico como se describe en este documento.

Las secuencias de polipéptidos o péptidos ilustrativas descritas en este documento incluyen SEC ID NÚM:2 y sus subsecuencias y sus variantes, p. ej., por lo menos aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500 o más residuos de longitud, o sobre toda la longitud de una enzima, donde todas tienen uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, o más, o todos los cambios de residuos de aminoácidos (modificaciones de secuencias de aminoácidos a ID NÚM:2) que se exponen en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23. Las secuencias de péptidos o polipéptidos descritas en este documento incluyen secuencias codificadas por un ácido nucleico descrito en la presente invención. Las secuencias de polipéptidos o péptidos ilustrativas descritas en este documento son unidas específicamente por un anticuerpo descrito en este documento. En un aspecto, un polipéptido descrito en este documento posee actividad de por lo menos una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa. En un aspecto, la actividad es una actividad regioselectiva y/o quimioselectiva.

En un aspecto, el polipéptido sintético o recombinante aislado puede comprender el polipéptido descrito en esta memoria que carece de una secuencia de señalización (péptido), p. ej., carece de su secuencia de señalización homóloga, y en un aspecto, comprende una secuencia de señalización heteróloga (péptido). En un aspecto, el polipéptido sintético o recombinante aislado puede comprender el polipéptido descrito en este documento, que comprende una secuencia de señalización heteróloga, tal como una secuencia de señalización hidrolasa heteróloga o no hidrolasa (p. ej., no lipasa, no saturasa no palmitasa). En un aspecto, las proteínas quiméricas comprenden un primer dominio que comprende una secuencia de señalización descrita en esta memoria y por lo menos un segundo dominio. La proteína puede ser una proteína de fusión. El segundo dominio puede comprender una enzima. La enzima puede ser una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en el presente documento, u otra hidrolasa.

En un aspecto, la actividad de la hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) comprende una actividad específica a aproximadamente 37°C en el intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína. En otro aspecto, la actividad de hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) comprende una actividad específica entre aproximadamente 500 y aproximadamente 750 unidades por miligramo de proteína. Alternativamente, la actividad de la hidrolasa comprende una actividad específica a 37°C en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 1200 unidades por miligramo de proteína. En un aspecto, la actividad de la hidrolasa comprende una actividad específica a 37°C en el intervalo de aproximadamente 750 a aproximadamente 1000 unidades por miligramo de proteína. En otro aspecto, la termotolerancia comprende la retención de por lo menos la mitad de la actividad específica de la hidrolasa a 37°C después de calentarse hasta una temperatura elevada. Alternativamente, la termotolerancia puede comprender la retención de la actividad específica a 37°C en el intervalo de aproximadamente 500 a aproximadamente 1200 unidades por miligramo de proteína después de calentar a una temperatura elevada.

En un aspecto, los polipéptidos sintéticos o recombinantes aislados descritos en la presente memoria comprenden por lo menos un sitio de glucosilación. En un aspecto, la glucosilación puede ser una glucosilación ligada en N. En un aspecto, el polipéptido puede glucosilarse después de expresarse en *P. pasioris* o en *S. pombe* o en plantas, tal como en plantas productoras de aceite, p. ej., frijol de soja, canola, arroz, girasol o variantes genéticamente modificadas (GMO) de estas plantas.

En un aspecto, el polipéptido puede retener actividad de una hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) bajo condiciones que comprenden aproximadamente pH 6,5, pH 6, pH 5,5, pH 5, pH 4,5 o pH 4,0 o inferior. En otro aspecto, el polipéptido puede retener actividad de una hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) bajo condiciones que comprenden aproximadamente pH 7, pH 7,5, pH 8,0, pH 8,5, pH 9, pH 9,5, pH 10, pH 10,5, pH 11, pH 11,5, pH 12,0 o más.

En un aspecto, las preparaciones de proteína comprenden un polipéptido descrito en este documento, en donde la preparación de proteína comprende un líquido, un sólido o un gel.

En un aspecto, los heterodímeros descritos en el presente documento comprenden un polipéptido y un segundo dominio. En un aspecto, el segundo dominio puede ser un polipéptido y el heterodímero puede ser una proteína de

fusión. En un aspecto, el segundo dominio puede ser un epítipo o una marca. En un aspecto, los heterodímeros descritos en esta invención comprenden un polipéptido descrito en esta invención.

En un aspecto, los polipéptidos inmovilizados descritos en esta invención tienen actividad de una hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y /o estearatasa), en donde el polipéptido comprende un polipéptido descrito en la presente invención, un polipéptido codificado por un ácido nucleico descrito en la presente invención o un polipéptido que comprende un polipéptido descrito en la presente invención y un segundo dominio. En un aspecto, un polipéptido descrito en la presente invención puede inmovilizarse en una célula, una vesícula, un liposoma, una película, una membrana, un metal, una resina, un polímero, una cerámica, un vidrio, un microelectrodo, una partícula de grafito, una esfera, un gel, una placa, un cristal, un comprimido, una píldora, una cápsula, un polvo, un aglomerado, una superficie, una estructura porosa, una matriz o un tubo capilar o materiales tales como granos, vainas, corteza, piel, bello, esmalte, hueso, envoltura y materiales que derivan de ellos. Los polinucleótidos, polipéptidos y enzimas descritos en este documento pueden formularse en forma sólida tal como un polvo, una preparación liofilizada, gránulos, un comprimido, una barra, un cristal, una cápsula, una píldora, una miniesfera o en forma líquida tal como una disolución acuosa, un aerosol, un gel, una pasta, una suspensión, una emulsión acuosa/oleosa, una crema, una cápsula o una suspensión vesicular o micelar.

Se describen suplementos alimentarios para animales que comprenden un polipéptido descrito en esta invención, p. ej., un polipéptido codificado por el ácido nucleico descrito en este documento. En un aspecto, el polipéptido en el suplemento alimentario puede estar glucosilado. Se describen matrices de administración de enzimas comestibles que comprenden un polipéptido descrito en esta invención, p. ej., un polipéptido codificado por el ácido nucleico descrito en esta invención. En un aspecto, la matriz de administración comprende una microesfera. En un aspecto, el polipéptido puede estar glucosilado. En un aspecto, la actividad de la hidrolasa es termotolerante. En otro aspecto, la actividad de la hidrolasa es termoestable.

Se describen métodos para aislar o identificar un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y /o estearatasa) que comprende las etapas de:

(a) proporcionar un anticuerpo descrito en este documento; (b) proporcionar una muestra que comprende polipéptidos; y (c) poner en contacto la muestra de la etapa (b) con el anticuerpo de la etapa (a) bajo condiciones en las que el anticuerpo puede específicamente unirse al polipéptido, aislando o identificando así un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa).

Se describen métodos para preparar un anticuerpo anti-hidrolasa que comprenden, administrar a un animal no humano un ácido nucleico de la presente invención o un polipéptido de la presente invención o sus subsecuencias en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmunitaria humoral, preparando así un anticuerpo anti-hidrolasa. Se describen en este documento métodos para preparar un anticuerpo antihidrolasa que comprenden administrar a un animal no humano un ácido nucleico de la presente invención o un polipéptido de la presente invención o sus subsecuencias en una cantidad suficiente para generar una respuesta inmunitaria.

Se describen métodos para producir un polipéptido recombinante, que comprenden las etapas de: (a) proveer un ácido nucleico descrito en la presente invención operablemente unido a un promotor; y (b) expresar el ácido nucleico de la etapa (a) bajo condiciones que permiten la expresión del polipéptido, produciendo de esta manera un polipéptido recombinante. En un aspecto, el método puede además comprender transformar una célula hospedante con el ácido nucleico de la etapa (a) seguido de expresión del ácido nucleico de la etapa (a), produciendo así un polipéptido recombinante en una célula transformada.

Se describen métodos para identificar un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) que comprenden las siguientes etapas: (a) proporcionar un polipéptido descrito en la presente invención; o un polipéptido codificado por un ácido nucleico descrito en la presente invención; (b) proveer un sustrato de hidrolasa; y (c) poner en contacto el polipéptido o su fragmento o variante de la etapa (a) con el sustrato de la etapa (b) y detectar una disminución en la cantidad de sustrato o un incremento en la cantidad de un producto de reacción, en donde la disminución en la cantidad del sustrato o el incremento en la cantidad del producto de reacción detecta un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa).

Se describen métodos para identificar un sustrato de hidrolasa, que comprenden las siguientes etapas (a) proveer un polipéptido descrito en la presente invención, o un polipéptido codificado por un ácido nucleico descrito en la presente invención; (b) proveer un sustrato de prueba; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con el sustrato de prueba de la etapa (b) y detectar una disminución en la cantidad de sustrato o un incremento en la cantidad de producto de reacción, en donde una disminución en la cantidad de sustrato o un incremento en la cantidad de producto de reacción identifica el sustrato de prueba como un sustrato de hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa).

Se describen métodos para determinar si un compuesto de ensayo se une específicamente a un polipéptido, que comprenden las siguientes etapas: (a) expresar un ácido nucleico o un vector que comprende el ácido nucleico bajo condiciones permisivas para la traducción del ácido nucleico a un polipéptido, en donde el ácido nucleico comprende

un ácido nucleico descrito en la presente memoria, o proporcionar un polipéptido descrito en la presente memoria; (b) proporcionar un compuesto de prueba; (c) poner en contacto el polipéptido con el compuesto de prueba; y (d) determinar si el compuesto de prueba de la etapa (b) se une específicamente al polipéptido.

Se describen métodos para identificar un modulador de actividad de una hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa), que comprenden las siguientes etapas: (a) proporcionar un polipéptido descrito en este documento o un polipéptido codificado por un ácido nucleico descrito en este documento; (b) proporcionar un compuesto de prueba; (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con el compuesto de prueba de la etapa (b) y medir una actividad de la hidrolasa, en donde un cambio en la actividad de la hidrolasa medido en presencia del compuesto de ensayo comparado con la actividad en ausencia del compuesto de ensayo proporciona una determinación de que el compuesto de ensayo modula la actividad de la hidrolasa. En un aspecto, la actividad de la hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) puede medirse proporcionando un sustrato de hidrolasa y detectando una disminución en la cantidad del sustrato o un incremento en la cantidad de un producto de reacción, o, un incremento en la cantidad del sustrato o una disminución en la cantidad de un producto de reacción.

Una disminución en la cantidad del sustrato o un incremento en la cantidad del producto de reacción con el compuesto de prueba según lo comparado con la cantidad de sustrato o producto de reacción sin el compuesto de prueba identifica el compuesto de prueba como un activador de la actividad de hidrolasa. Un incremento en la cantidad del sustrato o una reducción en la cantidad del producto de reacción con el compuesto de prueba según lo comparado con la cantidad de sustrato o producto de reacción sin el compuesto de prueba identifica el compuesto de prueba como un inhibidor de la actividad de hidrolasa.

Se describen sistemas de ordenador que comprenden un procesador y un dispositivo de almacenamiento de datos, en donde dicho dispositivo de almacenamiento de datos tiene almacenados una secuencia de polipéptidos o una secuencia de ácido nucleico descrita en este documento (p. ej., un polipéptido codificado por un ácido nucleico descrito en la presente invención). En un aspecto, el sistema de ordenador puede además comprender un algoritmo de comparación de secuencias y un dispositivo de almacenamiento de datos que tiene una secuencia de referencia almacenada allí. En otro aspecto, el algoritmo de comparación de secuencias comprende un programa de ordenador que indica polimorfismos. En un aspecto, el sistema de ordenador puede además comprender un identificador que identifica una o más funciones en dicha secuencia. Se describen medios de ordenador legibles que tienen almacenada una secuencia de polipéptidos o una secuencia de ácidos nucleicos descritos en este documento.

Se describen métodos para identificar una función en una secuencia, que comprenden las etapas de: (a) leer la secuencia usando un programa de ordenador que identifica una o más funciones en una secuencia, en donde la secuencia comprende una secuencia de polipéptidos o una secuencia de ácidos nucleicos descritos en esta memoria; y (b) identificar una o más funciones en la secuencia con el programa de ordenador.

Se describen métodos para comparar una primera secuencia con una segunda secuencia, que comprenden las etapas de: (a) leer la primera secuencia y la segunda secuencia a través del uso de un programa de ordenador que compara las secuencias, en donde la primera secuencia comprende una secuencia de polipéptidos o una secuencia de ácidos nucleicos descritas en esta invención; y (b) determinar diferencias entre la primera secuencia y la segunda secuencia con el programa de ordenador. La etapa de determinar diferencias entre la primera secuencia y la segunda secuencia puede además comprender la etapa de identificar polimorfismos. En un aspecto, el método puede además comprender un identificador que identifica una o más funciones en una secuencia. En otro aspecto, el método puede comprender leer la primera secuencia usando un programa de ordenador e identificar una o más funciones en la secuencia.

Se describen métodos para aislar o recuperar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) a partir de una muestra, que comprende las etapas de: (a) proveer un par de secuencias cebadoras para ampliar un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, en donde el par de cebadores es capaz de ampliar un ácido nucleico descrito en la presente invención; (b) aislar un ácido nucleico de la muestra o tratar la muestra de modo tal que el ácido nucleico en la muestra esté accesible para hibridación al par de cebadores de ampliación; y, (c) combinar el ácido nucleico de la etapa (b) con el par de cebadores de ampliación de la etapa (a) y ampliar el ácido nucleico de la muestra, aislando o recuperando así el ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa de una muestra. La muestra descrita es una muestra ambiental, p. ej., una muestra de agua, una muestra de líquido, una muestra de tierra, una muestra de aire o una muestra biológica, p. ej., célula bacteriana, célula protozoica, célula de insecto, célula de levadura, célula vegetal, célula fúngica o célula mamífera. Uno o cada uno de los pares de secuencias cebadoras de ampliación puede comprender un oligonucleótido que comprende por lo menos aproximadamente 10 a 50 o más bases consecutivas de una secuencia descrita en este documento.

Se describen métodos para aumentar la termotolerancia o termoestabilidad de un polipéptido de hidrolasa, que comprenden glucosilar un polipéptido de hidrolasa, en donde el polipéptido comprende por lo menos treinta aminoácidos contiguos de un polipéptido descrito en la presente invención; o un polipéptido codificado por una secuencia de ácido nucleico descrita en esta invención, aumentando así la termotolerancia o termoestabilidad del polipéptido de hidrolasa. En un aspecto, la actividad específica de hidrolasa puede ser termoestable o termotolerante a una temperatura en el intervalo de más de aproximadamente 37°C a aproximadamente 95°C.

Se describen métodos para sobreexpresar un polipéptido de hidrolasa recombinante (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) en una célula, que comprenden expresar un vector que comprende un ácido nucleico descrito en la presente memoria o una secuencia de ácido nucleico descrita en la presente memoria, en donde las identidades de secuencia se determinan por análisis con un algoritmo de comparación de secuencias o por inspección visual, en donde la sobreexpresión se efectúa con el uso de un promotor de gran actividad, un vector dicistrónico o una ampliación génica del vector.

Se describen composiciones detergentes que comprenden un polipéptido descrito en este documento o un polipéptido codificado por un ácido nucleico descrito en este documento, que comprenden actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa. En un aspecto, la hidrolasa puede ser hidrolasa activa no superficial. En otro aspecto, la hidrolasa puede ser hidrolasa activa superficial.

Se describen métodos para lavar un objeto, que comprenden las etapas de: (a) proporcionar una composición que comprende un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, en donde el polipéptido comprende un polipéptido descrito en esta invención o un polipéptido codificado por un ácido nucleico descrito en esta invención; (b) proveer un objeto; y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) y el objeto de la etapa (b) bajo condiciones en las que la composición puede lavar el objeto.

Se describen métodos para elaborar una planta transgénica, que comprenden las siguientes etapas: (a) introducir una secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula vegetal, en donde la secuencia nucleica heteróloga comprende una secuencia de ácido nucleico descrita en esta invención, produciendo así una célula vegetal transformada; y (b) producir una planta transgénica de la célula transformada. En un aspecto, la etapa (a) puede además comprender introducir la secuencia de ácido nucleico heterólogo por electroporación o microinyección de protoplastos de células vegetales. En otro aspecto, la etapa (a) puede además comprender introducir la secuencia de ácido nucleico heteróloga directamente al tejido vegetal por bombardeo de partículas de DNA. Alternativamente, la etapa (a) puede además comprender introducir la secuencia de ácido nucleico heteróloga en el DNA de la célula vegetal usando un hospedante de *Agrobacterium tumefaciens*. En un aspecto, la célula vegetal puede ser una célula de patata, maíz, arroz, trigo, tabaco o cebada.

Se describen métodos para expresar una secuencia de ácido nucleico heteróloga en una célula vegetal, que comprenden las siguientes etapas: (a) transformar la célula vegetal con una secuencia de ácido nucleico heteróloga operativamente unida a un promotor, en donde la secuencia nucleica heteróloga comprende un ácido nucleico descrito en este documento; (b) desarrollar la planta bajo condiciones en las que la secuencia de ácido nucleico heteróloga se expresa en la célula vegetal.

En una realización, un primer método para síntesis biocatalítica de un lípido estructurado comprende las siguientes etapas: (a) proveer un polipéptido (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa); (b) proveer una composición que comprende un triacilglicérido (TAG); (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) bajo condiciones en las que el polipéptido hidroliza un residuo acilo en la posición Sn2 del triacilglicérido (TAG), produciendo de este modo un 1,3-diacilglicérido (DAG); (d) proporcionar un éster R1; (e) proporcionar una hidrolasa específica de R1, y (f) poner en contacto el 1,3-DAG de la etapa (c) con el éster R1 de la etapa (d) y la hidrolasa específica de R1 de la etapa (e) bajo condiciones en las que la hidrolasa específica de R1 cataliza la esterificación de la posición Sn2, produciendo así el lípido estructurado. La hidrolasa puede ser una lipasa específica de Sn2. El lípido estructurado puede comprender una alternativa a la manteca de cacao (CBA), una manteca de cacao sintética, una manteca de cacao natural, 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerol (POP), 1,3-distearoil-2-oleoilglicerol (SOS), 1-palmitoil-2-oleoil-3-estearoilglicerol (POS) o 1-oleoil-2,3-dimiristoilglicerol (OMM).

En una realización, un segundo método para síntesis biocatalítica de un lípido estructurado comprende las siguientes etapas: (a) proporcionar una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa); (b) proveer una composición que comprende un triacilglicérido (TAG); (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) bajo condiciones en las que el polipéptido hidroliza un residuo acilo en la posición Sn1 o Sn3 del triacilglicérido (TAG), produciendo de esta manera un 1,2-DAG o 2,3-DAG; y (d) promover la migración del acilo en el 1,2-DAG o 2,3-DAG de la etapa (c) bajo condiciones cinéticamente controladas, produciendo así una composición que comprende un 1,3-DAG.

Este segundo método puede además comprender proporcionar un éster R1 y una lipasa específica de R1, y poner en contacto el 1,3-DAG de la etapa (d) con el éster R1 y la lipasa específica de R1 bajo condiciones en las que la lipasa específica de R1 cataliza la esterificación de la posición Sn2, produciendo así un lípido estructurado. La hidrolasa, p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa puede ser una enzima específica de Sn1 o Sn3. El lípido estructurado puede comprender cualquier aceite vegetal, p. ej., un aceite de soja, un aceite de canola, manteca de cacao alternativa (CBA), una manteca de cacao sintética, una manteca de cacao natural, 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerol (POP), 1,3-distearoil-2-oleoil glicerol (SOS), 1-palmitoil-2-oleoil-3-estearoilglicerol (POS) o 1-oleoil-2,3-dimiristoilglicerol (OMM).

El éster R1 puede comprender un resto de saturación inferior al residuo acilo hidrolizado, en cuyo caso el lípido estructurado así producido es una grasa o aceite saturado inferior que el TAG original. El éster R1 puede comprender uno o más ácidos grasos omega-3, un ácido graso omega-6, un ácido graso monoinsaturado, un ácido

graso poli-insaturado, un grupo fosfo, un éster de fitoesterol y orizanol. Más específicamente, el éster R1 puede comprender un resto seleccionado del grupo que consiste en ácido alfa-linolénico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido gamma-linolénico, ácido dihomo-gamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido palmoleico, colina, serina, beta-sitosterol, coumestrol, dietilstilbestrol y orizanol.

5 En un aspecto de este segundo método, la etapa (d) comprende además el uso de resinas de intercambio iónico. Las condiciones cinéticamente controladas pueden comprender condiciones de no equilibrio que resultan en la producción de un producto final que tiene una relación mayor a 2:1 de 1,3-DAG a 2,3-DAG. La composición de la etapa (b) puede comprender un ácido graso fluorogénico (FA). La composición de la etapa (b) puede comprender un éster de FA umbeliferilo. El producto final puede ser enantioméricamente puro.

10 En una realización, un método para elaborar una grasa o aceite saturado inferior comprende las siguientes etapas: (a) proveer un polipéptido (una hidrolasa, p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa); (b) proveer un aceite o grasa, y (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con el aceite o grasa de la etapa (b) bajo condiciones en las que la hidrolasa puede modificar el aceite o la grasa, p. ej., eliminar por lo menos un ácido graso saturado, p. ej., ácido palmítico, esteárico, láurico, caprílico (ácido octanoico) y similares. La modificación puede comprender una hidrólisis catalizada por hidrolasa de la grasa o el aceite. La hidrólisis puede ser una hidrólisis completa o parcial de la grasa o el aceite. El aceite hidrolizado puede comprender un éster de glicerol de un ácido graso poliinsaturado que puede reemplazar al ácido graso saturado eliminado, o un aceite de pescado, animal o vegetal.

20 El aceite vegetal puede comprender un aceite de oliva, canola, girasol, palma, soja o láurico, o aceite de salvado de arroz o sus combinaciones.

En una realización, un método para elaborar una grasa o aceite saturado inferior, que puede incluir ácidos grasos esenciales, comprende las siguientes etapas: (a) proveer un polipéptido (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa); (b) proveer una composición que comprende un triacilglicérido (TAG); (c) contactar el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) bajo condiciones en las que el polipéptido hidroliza un residuo acilo en la posición Sn1 o Sn3 position del triacilglicérido (TAG), produciendo así un 1,2-DAG o 2,3-DAG; y (d) promover la migración del acilo en el 1,2-DAG o 2,3-DAG de la etapa (c) bajo condiciones cinéticamente controladas, produciendo así un 1,3-DAG.

El método puede además comprender proveer un éster R1 y una lipasa específica de R1, y poner en contacto el 1,3-DAG de la etapa (d) con el éster de R1 y la lipasa específica de R1 bajo condiciones en las que la lipasa específica de R1 cataliza la esterificación de la posición Sn2, produciendo así un lípido estructurado. El éster R1 puede comprender un resto de saturación inferior que el residuo acilo hidrolizado, en cuyo caso el lípido estructurado así producido es una grasa o aceite saturado inferior que el TAG original. El éster R1 puede comprender un ácido graso omega-3 (alfa-linolénico, eicosapentaenoico (EPA), docosahexaenoico (DHA)), un ácido graso omega-6 (gamma-linolénico, dihomo-gama-linolénico (DGLA) o araquidónico), un ácido graso mono-insaturado (oleico, palmoleico y similares), grupos fosfo (colina y serina), ésteres de fitosterol (beta-sitosterol, coumestrol y dietilstilbestrol) y orizanol. La hidrolasa, p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa de la presente invención puede ser una enzima específica de Sn1 o Sn3. La grasa o el aceite saturado inferior puede prepararse por la hidrólisis anteriormente descrita de cualquier aceite algal, aceite vegetal o grasa o aceite animal, p. ej., aceite de *Neochloris oleoabundans*, aceite de *Scenedesmus dimorphus*, aceite de *Euglena gracilis*, aceite de *Phaeodactylum tricornutum*, aceite de *Pleurochrysis carterae*, aceite de *Prymnesium parvum*, aceite de *Tetraselmis chui*, aceite de *Tetraselmis suecica*, aceite de *Isochrysis galbana*, aceite de *Nannochloropsis salina*, aceite de *Botryococcus braunii*, aceite de *Dunaliella tertiolecta*, aceite de especies de *Nannochloris*, aceite de especies de *Spirulina*, aceite de *Chlorophyceae* (alga verde) y aceite de *Bacilliarophy*, aceite de canola, aceite de ricino, aceite de coco, aceite de coriandro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de avellana, cáñamo, aceite de lino, aceite de hierba de la pradera, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de soja, aceite de girasol, aceite de cebo, aceite de tsubaki, variedades de aceites "naturales" que tienen composiciones de ácido graso vía Organismos Genéticamente Modificados (GMO) o "cruza" tradicional, tal como aceites de alto contenido oleico, bajo contenido linolénico o poco saturados (aceite de canola de alto contenido oleico, aceite de soja de bajo contenido linolénico aceites de girasol de alto contenido esteárico); grasas animales (sebo, manteca de cerdo, grasa de mantequilla y grasa de pollo), aceite de pescado (aceite de pez vela, aceite de hígado de bacalao, aceite de pargo alazán, aceite de sardina, aceite de arenque y aceite de sábal), o mezclas de cualquiera de los mencionados arriba. La grasa o el aceite saturado inferior así elaborado puede utilizarse en alimentos o en productos para hornear, freír o cocinar que comprenden aceites o grasas con un contenido de ácido graso inferior, incluidos aceites con bajo contenido de ácido palmítico, ácido láurico, ácido esteárico (ácido octanoico) etc., procesados usando una composición o un método descrito en la presente invención.

Un método descrito para refinar un lubricante comprende las siguientes etapas:

(a) proveer una composición que comprende una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en este documento; (b) proveer un lubricante; y (c) tratar el lubricante con la hidrolasa bajo condiciones en

las que la hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en este documento puede hidrolizar selectivamente aceites en el lubricante, y así refinarlos. El lubricante puede ser un aceite hidráulico.

Un método descrito para tratar una tela comprende las siguientes etapas: (a) proveer una composición que comprende una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en este documento, en donde la hidrolasa puede hidrolizar selectivamente ésteres carboxílicos; (b) proveer una tela; y (c) tratar la tela con la hidrolasa bajo condiciones en las que la hidrolasa puede hidrolizar selectivamente ésteres carboxílicos, tratando así la tela. El tratamiento de la tela puede comprender mejorar el tacto y la caída de la tela final, el tinte, obteniendo retardo de las llamas, obteniendo repelencia al agua, obteniendo brillo óptico o acabado de resina. La tela puede comprender algodón, viscosa, rayón, lyocell, lino, lienzo, ramina, todas sus mezclas, o todas su mezclas con poliésteres, lana, poliamidas, acrílico o poliacrílico. Una tela, hilo o fibra descrito que comprende una hidrolasa de la presente invención puede adsorberse, absorberse o inmovilizarse en la superficie de la tela, hilo o fibra.

Un método descrito para eliminar o reducir la cantidad de manchas de alimento o aceite comprende poner en contacto una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en esta invención con la mancha de alimento o aceite bajo condiciones en las que la hidrolasa puede hidrolizar el aceite o la grasa en la mancha. La hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en este documento puede tener mejor estabilidad a la desnaturalización por tensioactivos y a la desactivación por calor. La hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en esta memoria puede tener una disolución detergente o de lavandería.

Una composición dietaria descrita comprende una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en este documento. La composición dietaria puede además comprender una base nutricional que comprende una grasa. La hidrolasa puede activarse mediante una sal biliar. La composición dietaria puede además comprender una fórmula para bebés basada en leche de vaca. La hidrolasa puede hidrolizar ácidos grasos de cadena larga.

Un método descrito para reducir el contenido de grasa en la leche o composiciones dietarias a base de vegetales comprende las siguientes etapas: (a) proveer una composición que comprende una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en este documento; (b) proveer una composición que comprende una leche o un aceite vegetal, y (c) tratar la composición de la etapa (b) con la hidrolasa bajo condiciones en las que la hidrolasa puede hidrolizar el aceite o la grasa en la composición. Una composición dietaria descrita para un ser humano o para animales no rumiantes comprende una base nutricional, en donde la base comprende una grasa y poco o nada de hidrolasa, y una cantidad eficaz de una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en el presente documento para incrementar la absorción de grasa y el crecimiento del ser humano o animal no rumiante.

En una realización, un método para catalizar una reacción de interesterificación para producir nuevos triacilglicéridos comprende las siguientes etapas: (a) proveer una composición que comprende un polipéptido (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en esta invención, en donde el polipéptido puede catalizar una reacción de interesterificación; (b) proveer una mezcla de triacilglicéridos y ácidos grasos libres; (c) tratar la mezcla de la etapa (b) con el polipéptido bajo condiciones en las que el polipéptido puede catalizar el intercambio de los ácidos grasos libres con los grupos acilo de triacilglicéridos, produciendo así nuevos triacilglicéridos enriquecidos con los ácidos grasos añadidos. El polipéptido puede ser una lipasa específica de Sn1, 3.

En una realización, un método de interesterificación para preparar un aceite que tiene bajo contenido de ácido tras y bajo contenido de ácido graso de cadena intermedia, comprende las siguientes etapas: (a) proveer una mezcla de reacción de interesterificación que comprende un material fuente de ácido esteárico seleccionado del grupo que consiste en ácido esteárico, monoésteres de ácido esteárico de alcoholes monohídricos de bajo peso molecular y sus mezclas, (b) proveer un aceite vegetal líquido; (c) proveer un polipéptido (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrito en esta invención, en donde el polipéptido comprende una actividad de lipasa específica de 1, 3; (d) interesterificar el material fuente de ácido esteárico y el triacilglicérido de aceite vegetal, (e) separar los componentes de ácido graso libre interesterificado de los componentes de glicérido de la mezcla de interesterificación para proveer un producto de aceite de margarina interesterificado y una mezcla de ácido graso que comprende ácidos grasos, monoésteres de ácido graso o sus mezclas liberados del aceite, y (f) hidrogenar la mezcla de ácido graso. En una realización del método de interesterificación, la reacción de interesterificación continúa hasta que se produce un equilibrio sustancial de los grupos éter en las posiciones 1,3 del componente de glicérido con los componentes del ácido graso no glicérido de la mezcla de reacción.

Un método descrito para elaborar una composición comprende 1-palmitoil-3-estearoil-2-monoleína (POST) y 1,3-distearoil-2-monoleína (StOSt) que comprende proveer un polipéptido (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrito en la presente invención, en donde el polipéptido es capaz de interesterificación de lipasa específica de 1, 3 de 1,3-dipalmitoil-2-monoleína (POP) con ácido esteárico o tristearina, y contactar dicho polipéptido con una composición que comprende dicha POP en presencia de una fuente de estearina tal como ácido esteárico o tritearina para elaborar un producto enriquecido en la 1-palmitoil-3-stearoil-2-Monoleína (POST) o 1,3-distearoil-2-monoleína (StOSt).

Un método descrito para mejorar o prevenir toxicidad mediada por lipopolisacáridos (LPS) comprende administrar a un paciente una composición farmacéutica que comprende una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en el presente documento. Se describe un método para desintoxicar una endotoxina con una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en este documento. Un método descrito para desacilar una cadena de ácido graso 2' o 3' de un lípido comprende poner en contacto el lípido A con un polipéptido descrito en la presente invención.

Se describen métodos para alterar la especificidad de sustrato o la preferencia de sustrato de una enzima de lipasa parental (hidrolasa de ácido graso) que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NÚM:2 que comprenden la etapa de generar (insertar) por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 o más mutaciones de residuos de aminoácidos en la SEC ID NÚM:2 como se indica en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, generando así una nueva enzima de hidrolasa que tiene una secuencia de aminoácidos modificada y una especificidad de sustrato alterada o preferencia de sustrato alterada en comparación con la enzima lipasa parental (hidrolasa de ácido graso) de la SEC ID NÚM:2. En un aspecto, la especificidad de sustrato o la preferencia de sustrato de la nueva enzima lipasa (hidrolasa de ácido graso) comprende hidrólisis preferencial o aumentada de ácido palmítico de un aceite, o la especificidad de sustrato o preferencia de sustrato de la nueva enzima lipasa (hidrolasa de ácido graso) comprende hidrólisis preferencial o aumentada de ácido esteárico de un aceite.

En un aspecto, la secuencia de aminoácidos modificada (en comparación con la SEC ID NÚM:2 "parental") comprende por lo menos una modificación de aminoácidos A48C; D49R; D61 A; D61E; R72E; R72K; V83M; R85Y; E95K; E116A; E116I; E116L; E116N; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; A144I; E149H; A150I; I151G; I151A; P162G; P162K; V163R; D164R; R172H; R172L; o A225S, o su equivalente; o una combinación de éstos, y/o por lo menos una modificación de codones (GCG)35(GCT); (GGC)45(GGA); (GCG)92(GCT); (GTG)102(GTT); (AGC)108(AGT); (CTG)117(CTT); (CTG)124(TTG); (CGG)126(AGG); (GTC)128(GTG); (AGT)133(TCT); (TTC)135(TTT); (GTG)183(GTT); (ACC)188(ACG), o su equivalente, o una combinación de éstos, y la especificidad de sustrato o sustrato de preferencia de la nueva enzima lipasa (hidrolasa de ácido graso) comprende hidrólisis preferencial o mejorada de ácido palmítico de un aceite. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos modificada (según lo comparado con la SEC ID NÚM:2 "parental") comprende I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q, o una combinación de éstos, y la especificidad de sustrato o preferencia de sustrato de la nueva enzima lipasa (hidrolasa de ácido graso) comprende hidrólisis preferencial o aumentada de ácido esteárico de un aceite.

Los métodos descritos para elaborar una enzima que tiene una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato comprenden hidrólisis preferencial o aumentada de ácido palmítico de un aceite, que comprende las etapas de: (a) proveer una enzima hidrolasa parental (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) que tiene una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato que comprende hidrólisis preferencial de ácido palmítico de un aceite, en donde la enzima hidrolasa parental (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en este documento tiene una secuencia descrita en este documento; y (b) efectuar por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 o más modificaciones de residuos de aminoácidos a la enzima hidrolasa parental (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa), en donde las modificaciones de residuos de aminoácidos corresponden a las mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NÚM:2 que se indica en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, generando así una enzima que tiene una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato que comprende hidrólisis preferencial o aumentada de ácido palmítico de un aceite.

Se describen métodos para preparar una enzima que tiene una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato, que comprende hidrólisis preferencial o aumentada de ácido esteárico de un aceite, que comprenden las etapas de: (a) proveer una enzima hidrolasa parental (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) que tiene una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato que comprende hidrólisis preferencial de ácido esteárico de un aceite, en donde la enzima hidrolasa parental (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) tiene una secuencia descrita en la presente invención; y (b) efectuar por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 o más modificaciones de residuos de aminoácidos a la enzima hidrolasa parental (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa), en donde las modificaciones de residuos de aminoácidos corresponden a las mutaciones de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NÚM:2 que se indica en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, generando de este modo una enzima que tiene una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato que comprende hidrólisis preferencial o aumentada de ácido esteárico de un aceite.

Los métodos descritos para elaborar una enzima hidrolasa de ácido graso (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) que tienen una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato comprenden hidrólisis preferencial de un ácido graso particular, que comprende las etapas de (a) proveer una secuencia de enzima hidrolasa de ácido graso (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en la presente invención; (b) generando (insertando) por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 o más mutaciones de residuos base en el ácido nucleico, en donde las mutaciones corresponden a aquellos cambios de secuencias expuestos en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23; y, (c) ensayar la actividad de la enzima recién generada para una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato que comprende hidrólisis preferencial de un ácido graso particular, elaborando de este modo la nueva enzima de hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o

estearatasa) de ácido graso que tiene una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato que comprende hidrólisis preferencial de un ácido graso particular. En un aspecto, la enzima hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) de ácido graso comprende una secuencia expuesta en la SEC ID NÚM:2. En un aspecto, el ácido graso es ácido linolénico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico o ácido esteárico.

Se describen métodos para elaborar una enzima hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) de ácido graso que tiene una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato, que comprende hidrólisis preferencial de un ácido graso particular, y comprenden las etapas de (a) proveer una secuencia de ácido nucleico que codifica una enzima hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) de ácido graso descrita en la presente invención; (b) generar (insertar) por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 o más mutaciones de residuos base en el ácido nucleico, en donde las mutaciones corresponden a aquellos cambios de secuencia expuestos en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23; y, (c) expresar el ácido nucleico generado para elaborar la nueva enzima hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) de ácido graso, elaborando así una enzima hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) de ácido graso que tiene una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato que comprende hidrólisis preferencial de un ácido graso particular.

En un aspecto, la secuencia que codifica la enzima hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) de ácido graso comprende una secuencia expuesta en la SEC ID NÚM: 1. En un aspecto, el ácido graso es ácido linolénico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico o ácido esteárico. En un aspecto, la especificidad de sustrato o preferencia de sustrato de la nueva enzima hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) de ácido graso es ácido palmítico en comparación con una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato de ácido esteárico para la enzima hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) de ácido graso parental, o la especificidad de sustrato o preferencia de sustrato de la nueva enzima hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) de ácido graso es ácido esteárico en comparación con una especificidad de sustrato o preferencia de sustrato de ácido palmítico para la enzima hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) de ácido graso parental.

Las lipasas descritas comprenden una secuencia de aminoácido expuesta en la SEC ID NÚM:2 pero también comprenden por lo menos una modificación de los residuos de aminoácidos A48C; D49R; D61A; D61E; R72E; R72K; V83M; R85Y; E95K; E116A; E116I; E116L; E116N; E116Q; E116R; E116T; E116V; SI33A; A144I; E149H; A150I; I151G; I151A; P162G; P162K; V163R; D164R; R172H; R172L; o A225S, o su equivalente, o una combinación de éstos, y/o por lo menos una codificación de codones (GCG)35(GCT); (GGC)45(GGA); (GCG)92(GCT); (GTG)102(GTT); (AGC)108(AGT); (CTG)117(CTT); (CTG)124(TTG); (CGG)126(AGG); (GTC)128(GTG); (AGT)133(TCT); (TTC)135(TTT); (GTG)183(GTT); (ACC)188(ACG), o su equivalente, o una combinación de éstos.

En un aspecto, la especificidad de sustrato o preferencia de sustrato de la nueva lipasa comprende hidrólisis preferencial o aumentada de un ácido graso de un aceite en comparación con la SEC ID NÚM:2 "parental". En un aspecto, el ácido graso es ácido linolénico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico o ácido esteárico.

Los detalles de una o más realizaciones se exponen en los dibujos anejos y en la descripción que sigue. Otras características, objetos y ventajas serán obvios a partir de la descripción y los dibujos, así como también a partir de las reivindicaciones.

Descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos son ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

La Figura 1 es un diagrama en bloque de un sistema de ordenador.

La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra un aspecto de un procedimiento para comparar una nueva secuencia de nucleótidos o proteínas con una base de datos de secuencias con el fin de determinar los niveles de homología entre la nueva secuencia y las secuencias de las bases de datos.

La Figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra un aspecto de un procedimiento en un ordenador para determinar si dos secuencias son homólogas.

La Figura 4 es un diagrama de flujo que ilustra un aspecto de un proceso identificador 300 para detectar la presencia de una característica en una secuencia.

La Figura 5 ilustra un método ilustrativo provisto en la presente invención que comprende el uso de lipasas para procesar un lípido, p. ej., un lípido de aceite de soja, para hidrolizar selectivamente ácido palmítico a fin de producir un "aceite de soja palmítico reducido".

La Figura 6a ilustra los efectos de las mutaciones de palmitasa ilustrativa GSSMSM en hidrólisis de palmitato y estearato en relación con la SEC ID NÚM:2 parental, según se analiza en detalle en el Ejemplo 4, a continuación.

La Figura 6b ilustra los efectos de las mutaciones ilustrativas GSSM de estearatasa en hidrólisis de palmitato y estearato en relación con la SEC ID NÚM:2 parental como se analiza en detalle en el Ejemplo 4 a continuación.

La Figura 7 muestra la SEC ID NÚM:2, con las posiciones de las mutaciones de palmitato y estearato particulares marcadas en negrilla y fuente más grande. Las mutaciones subrayadas (p. ej., 61 A E) son posiciones de residuos de aminoácidos alternativas (secuencias alternativas para realizaciones alternativas) para mejorar la hidrólisis de palmitato. Las mutaciones en *cursiva* (p. ej., *20L*) son posiciones de residuos de aminoácidos alternativas (secuencias alternativas para realizaciones alternativas) para mejorar la hidrólisis de estearato. La posición 116 es una posición de una mutación de residuos de aminoácidos alternativa (una secuencia alternativa para una realización alternativa) para mejorar la hidrólisis tanto de palmitato como de estearato.

La Figura 8 muestra datos de ensayos de aceite de soja confirmatorios para clones seleccionados de la genoteca de palmitasa.

Los símbolos de referencias similares en los distintos dibujos indican elementos similares.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a métodos para usar polipéptidos, incluidas lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas, y polinucleótidos que las codifican. Las realizaciones alternativas de los métodos comprenden polipéptidos, p. ej., enzimas que tienen actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, incluida actividad de hidrolasa termoestable y termotolerante, y polinucleótidos que codifican estas enzimas. Las actividades de hidrolasa de los polipéptidos y péptidos descritos en este documento incluyen actividad de lipasa (hidrólisis de lípidos), reacciones de interesterificación, síntesis estérica, reacciones de intercambio estérico, actividad de acil hidrolasa de lípidos (LAH)) y actividad enzimática relacionada.

Para los propósitos de la presente solicitud de patente, las reacciones de interesterificación pueden incluir reacciones de acidólisis (que implica la reacción de un ácido graso y un triacilglicérido), alcoholólisis (que implica la reacción de un alcohol y un triacilglicérido), glicerólisis (que implica la reacción de un glicerol y un triacilglicérido) y reacciones de transesterificación (que implica la reacción de un éster y un triacilglicérido). Los polipéptidos descritos en este documento se pueden usar en una diversidad de contextos farmacéuticos, agrícolas e industriales, incluida la fabricación de cosméticos y nutracéuticos. En otro aspecto, los polipéptidos descritos en el presente documento se utilizan para sintetizar productos quirales enantioméricamente puros.

Las enzimas descritas en este documento pueden ser catalizadores altamente selectivos. Pueden tener la capacidad de catalizar reacciones con estéreo-, regio- y quimio-selectividades que no son posibles en la industria sintética convencional. Las enzimas descritas en este documento pueden ser versátiles. En diversos aspectos, pueden funcionar en disolventes orgánicos, operar a pH extremos (por ejemplo, pH altos y pH bajos), temperaturas extremas (por ejemplo, altas temperaturas y bajas temperaturas), niveles de salinidad extremos (por ejemplo, alta salinidad y baja salinidad), y catalizar reacciones con compuestos que estructuralmente no están relacionados con sus sustratos fisiológicos naturales.

En un aspecto, los polipéptidos descritos en la presente invención comprenden hidrolasas que tienen actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa y se pueden usar, p. ej., en la síntesis biocatalítica de lípidos estructurados (lípidos que contienen un conjunto definido de ácidos grasos distribuidos en un modo definido sobre la estructura de glicerol), incluyendo cualquier aceite vegetal, p. ej., aceite de canola, soja, alternativas de aceite de soja, alternativas de manteca de cacao, 1,3-diacylglicéridos (DAG), 2-monoacylglicéridos (MAG) y triacylglicéridos (TAG), tales como 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerol (POP), 1,3-distearoil-2-oleoilglicerol (StOst), 1-palmitoil-2-oleoil-3-estearoilglicerol (POSt) o 1-oleoil-2,3-dimiristoilglicerol (OMM), ácidos grasos poli-insaturados (PUFA), ácidos grasos poli-insaturados de cadena larga tales como ácido araquidónico, ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido eicosapentaenoico (EPA).

En determinada realización, las enzimas y métodos provistos en la presente invención se pueden emplear para eliminar, añadir o intercambiar cualquier ácido graso de una composición, p. ej., elaborar un aceite con contenido de ácido graso saturado inferior (p. ej., un aceite "poco saturado") o con un contenido de ácido graso diferente (p. ej., convertir un aceite que comprende ácidos grasos "saturados" a un aceite alternativo que comprende ácidos grasos "insaturados").

Los ejemplos de ácidos grasos saturados que se pueden eliminar, añadir o "redisponer" en un lípido, p. ej., un aceite, usando una enzima o poniendo en práctica un método de la presente invención incluyen:

Acético: CH_3COOH

Butírico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

Caproico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$

Caprílico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$

Cáprico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$

Undecanoico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$

Láurico: (ácido dodecanoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$

Mirístico: (ácido tetradecanoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$

5 Pentadecanoico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$

Palmítico: (ácido hexadecanoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$

Margárico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$

Estearico (ácido octadecanoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$

Araquídico (ácido eicosanoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$

10 Behénico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$

Los ejemplos de ácidos grasos insaturados de omega-3 que se pueden eliminar, añadir o “redisponer” en un lípido, p. ej., un aceite, usando una enzima o poniendo en práctica un método provisto en la presente invención, incluyen:

α -linolénico (ALA): $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ estearaidónico (octadecatetraenoico):

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$ eicosapentaenoico (EPA):

15 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$ docosahexaenoico (DHA)

$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

Los ejemplos de ácidos grasos insaturados de omega-6 que se pueden eliminar, añadir o “redisponer” en un lípido, p. ej., un aceite, usando una enzima o poniendo en práctica un método de la presente invención, incluyen:

Linoleico (ácido 9,12-octadecadienoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

20 Gamma-linolénico (ácido 6,9,12-octadecatrienoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$

Bicosadienoico (ácido 11,14-eicosadienoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$

Dihomo-gamma-linolénico (ácido 8,11,14-eicosatrienoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$

Araquidónico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

Docosadienoico (ácido 13,16-docosadienoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

25 Adrénico (ácido 7,10,13,16-docosatetraenoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$

Docosapentaenoico (ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico):
 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

Los ejemplos de ácidos grasos insaturados de omega-9 que también se pueden eliminar, añadir o “redisponer” en un lípido, p. ej., un aceite, usando una enzima o poniendo en práctica un método de la presente invención, incluyen:

30 Oleico (ácido 9-octadecenoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$

Eicosenoico (ácido 11-eicosenoico) $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$

Mead (ácido 5,8,11-eicosatrienoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

Eúrico (ácido 13-docosenoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$

Nervónico (ácido 15-tetracosenoico): $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$.

35 Palmitoleico: $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$

En un aspecto, se describen en la presente invención nuevas clases de lipasas denominadas “saturasas”, p. ej., “palmitasas” y “estearatasas”. El término “saturasa” tal como se utilizó previamente en la bibliografía describía una enzima que lleva a cabo la saturación de enlaces específicos en una ruta metabólica, p. ej., hidrogenación de un doble enlace (Moise, et.al, *JBiol Chem*, 2005, 280(30):27815-27825). No obstante, se describen en este documento “saturasas” nuevas y no descritas previamente, en donde las saturasas descritas en este documento hidrolizan

40

ésteres de ácido graso saturado, en donde los ésteres hidrolizados pueden ser ésteres de ácidos grasos saturados y glicerol, umbeliferol u otros alcoholes.

También se describen en la presente invención "palmitasas" y "estearatasas" que no habían sido previamente descritas, en donde las palmitasas y estearatasas hidrolizan ácido palmítico y ácido esteárico, respectivamente, por ejemplo, de la estructura de glicerol. Las "saturasas" descritas en este documento pueden también denominarse "hidrolasas de saturato". De modo similar, las "palmitasas" descritas en este documento pueden también denominarse "hidrolasas de palmitato" y las "estearatasas" descritas en este documento pueden también denominarse "hidrolasas de estearato".

En otro aspecto, las saturasas descritas en este documento hidrolizan selectivamente por lo menos 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los ácidos grasos saturados. En otro aspecto, las palmitasas descritas en este documento hidrolizan selectivamente los ácidos grasos, de manera tal que por lo menos 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los ácidos grasos hidrolizados consisten en ácido palmítico. En otro aspecto, las estearatasas descritas en este documento hidrolizan selectivamente ácidos grasos, de manera tal que por lo menos 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de los ácidos grasos hidrolizados consisten en ácido esteárico.

En un aspecto, como se ilustra en la Figura 5, los métodos de uso de una enzima pueden procesar un lípido, p. ej., un lípido de un aceite de soja u otro vegetal, para hidrolizar selectivamente un ácido graso saturado, p. ej., ácido palmítico o esteárico, (p. ej., de un aceite que contiene estos ácidos grasos saturados) para producir un "aceite de baja saturación (o inferior)", p. ej., un "aceite con contenido palmítico reducido", tal como un "aceite vegetal con contenido palmítico reducido", p. ej., un "aceite de soja con contenido palmítico reducido".

Las enzimas descritas en la presente memoria pueden también utilizarse para hidrolizar selectivamente cualquier ácido graso, particularmente ácidos grasos saturados, de una estructura de glicerol para producir un "aceite poco saturado (o inferior)", incluyendo hidrolizar selectivamente un ácido graso saturado, p. ej., un ácido palmítico o un ácido esteárico, de una posición Sn1 o Sn2 de una estructura de glicerol descrita, además de la hidrólisis de una posición Sn3 (p. ej., hidrólisis de ácido palmítico de la posición Sn3 ilustrada en la Figura 5).

En un aspecto, se da a conocer una síntesis ilustrativa de triglicéridos, aceites o grasas de baja saturación. Esta síntesis ilustrativa puede usar o bien ácidos grasos libres o ésteres de ácido graso, dependiendo de la enzima empleada. En un aspecto, las hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas se utilizan para eliminar o hidrolizar ácidos grasos saturados, tal como ácido acético, ácido butírico, ácido caproico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido undecanoico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido pentadecanoico, ácido palmítico, ácido margárico, ácido esteárico, ácido aquídico o ácido behénico de un triglicérido, aceite o grasa. En un aspecto, los ácidos grasos eliminados o hidrolizados se reemplazan con ácidos grasos que tienen mejores beneficios para la salud (como correlación reducida con enfermedad cardiovascular), o mejores propiedades químicas (como estabilidad oxidativa o reactividad) o mejores propiedades físicas (como punto de fusión o sensación en la boca). En un aspecto, los ácidos grasos añadidos son ácidos grasos insaturados de omega-3, tal como ácido α -linolénico, ácido estearidónico, ácido eicosapentaenoico (EPA) o ácido docosahexaenoico (DHA), o PUFA o ácidos grasos de aceite de pescado. En un aspecto, los ácidos grasos añadidos son ácidos grasos insaturados de omega-6, tales como ácido linoleico, ácido gamma-linoleico, ácido eicosadienoico, ácido dihomo-gamma-linoleico, ácido araquidónico, ácido docoasadienoico, ácido adrenico o ácido docosapentaenoico. En un aspecto, los ácidos grasos añadidos son ácidos grasos insaturados de omega-9, tales como ácido oleico, ácido eicosaenoico, ácido mead, ácido erúrico, ácido nervónico o ácido palmitoleico. En un aspecto, los ácidos grasos añadidos (p. ej., omega-3, omega-6 u omega-9) se añaden por reacción de ácidos grasos con los triglicéridos, aceite o grasa después de la eliminación o hidrólisis de los ácidos grasos saturados por las hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas, como se describe en la presente invención. En un aspecto, los ácidos grasos añadidos (p. ej., omega-3, omega-6 u omega-9) se añaden por reacción de ésteres de ácido graso, incluidos ésteres de glicerol, o ésteres de etilo o metilo, con los triglicéridos, aceite o grasa después de la eliminación o hidrólisis de los ácidos grasos saturados por las hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas descritas en la presente invención. En un aspecto, la reacción para añadir los ácidos grasos (p. ej., omega-3, omega-6 u omega-9) es catalizada por una hidrolasa o lipasa, tal como una lipasa no específica (incluyendo ácido graso no regioespecífico y ácido graso no específico), o una lipasa específica de Sn1,3 o una lipasa específica de Sn1 o una lipasa específica de Sn3 o una lipasa específica de Sn2, o una lipasa específica de ácido graso.

Los métodos y composiciones (hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) provistos en la presente invención se pueden utilizar en la producción de nutraceuticos (p. ej., aceites y ácidos grasos polinsaturados), diversos alimentos y aditivos de alimentos (p. ej., emulsionantes, reemplazantes de grasa, margarinas y productos untables), cosméticos (p. ej., emulsionantes, cremas), productos farmacéuticos y agentes de administración de fármacos (p. ej., liposomas, comprimidos, formulaciones), y aditivos de alimento para animales (p. ej., ácidos grasos polinsaturados, tales como ácidos linoleicos).

En un aspecto, las lipasas de la presente memoria pueden actuar sobre ésteres de ácido graso (FA) fluorogénicos, p. ej., ésteres de FA de umbeliferilo. En un aspecto, los perfiles de las especificidades de FA de lipasas preparadas o modificadas por los métodos provistos en este documento se pueden obtener midiendo sus actividades relativas en una serie de ésteres de FA de umbeliferilo, tales como ésteres de palmitato, estearato, oleato, laurato, PUFA o butirato.

En un aspecto, un polipéptido (p. ej., anticuerpo o enzima - p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) provisto en la presente invención para estas reacciones se inmoviliza, p. ej., como se describe a continuación. En aspectos alternativos, los métodos provistos en este documento no requieren un disolvente orgánico, pueden proceder con cualquier velocidad de reacción relativamente rápida. Véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 5.552.317; 5.834.259.

En determinadas realizaciones, los métodos y composiciones (lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) se pueden emplear para hidrolizar (lo que incluye hidrolizar selectivamente) aceites, tales como aceites de pescado, animal y vegetal, y lípidos, tales como ácidos grasos poli-insaturados. En un aspecto, los polipéptidos de la presente invención se usan para elaborar aceites de baja saturación, p. ej., eliminando (hidrolizando) por lo menos un ácido graso de un aceite; y la hidrólisis puede ser una hidrólisis selectiva, p. ej., solamente eliminar un ácido graso particular, como ácido palmítico, esteárico u otro ácido graso saturado, o simplemente eliminar un ácido graso de una posición, p. ej., Sn1, Sn2 o Sn3. En un aspecto, los polipéptidos de este documento se usan para procesar ácidos grasos (tales como ácidos grasos poli-insaturados), p. ej., ácidos grasos de aceite de pescado, p. ej., para uso en o como alimento o aditivo de alimentos, o como un aceite para cocinar, hervir, hornear, o aceite comestible. En otra realización, los métodos y composiciones (lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) se pueden emplear para hidrolizar selectivamente ésteres saturados frente a ésteres insaturados a ácidos o alcoholes.

En otra realización, los métodos y composiciones (lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) de este documento se pueden usar para tratar látex para una diversidad de propósitos, p. ej., tratar látex utilizados en composiciones fijadoras de cabello para eliminar olores desagradables. En otra realización, los métodos y composiciones (lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) se pueden usar en el tratamiento de una deficiencia de lipasa en un animal, p. ej., un mamífero, tal como un ser humano. En otra realización, los métodos y composiciones (lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) se pueden utilizar para preparar lubricantes, tales como aceites hidráulicos. En otra realización, los métodos y composiciones (lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) se pueden utilizar para preparar y usar detergentes. Los métodos y composiciones (lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) se pueden utilizar en procesos para el acabado químico de telas, fibras o hilos. En otro aspecto, los métodos y composiciones (lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) se pueden usar para obtener retardo de las llamas en una tela usando, p. ej., un ácido carboxílico sustituido con halógeno o su éster, es decir, un ácido carboxílico fluorado, clorado o bromado o su éster. En un aspecto, se dan a conocer métodos para generar lipasas a partir de genotecas ambientales.

Las "hidrolasas" descritas abarcan polipéptidos (p. ej., anticuerpos, enzimas) y péptidos (p. ej., "sitios activos") que tiene cualquier actividad de hidrolasa, es decir, los polipéptidos descritos en el presente documento pueden tener cualquier actividad de hidrolasa, incluida p. ej., una actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa. Las "hidrolasas" descritas incluyen todos los polipéptidos que tienen cualquier actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, incluida la actividad de síntesis de lípidos o la hidrólisis de lípidos, es decir, los polipéptidos descritos en este documento pueden tener cualquier actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa. Las lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas descritas en este documento incluyen enzimas activas en la bioconversión de lípidos a través de catálisis de hidrólisis, alcoholisis, acidólisis, esterificación y aminólisis. En un aspecto, las hidrolasas (p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) que se describen en este documento pueden hidrolizar emulsiones de lípidos. En un aspecto, las enzimas descritas en el presente documento pueden actuar preferencialmente sobre enlaces Sn-1, Sn-2 y/o Sn-3 de triacilglicéridos para liberar uno o más ácidos grasos de la estructura de glicerol. Por ejemplo, la actividad de hidrolasa, lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa de los polipéptidos descritos en esta memoria incluye síntesis de manteca de cacao, poliácidos grasos poli-insaturados (PUFA), 1,3-diacilglicéridos (DAG), 2-monoacilglicéridos (MAG) y triacilglicéridos (TAG). La actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa de los polipéptidos descritos en este documento también comprende la producción de aceites poco saturados, p. ej., aceite de soja o canola, eliminando un ácido graso, p. ej., un ácido palmítico, oleico, láurico o esteárico. En aspectos alternativos, las enzimas descritas en esta invención pueden también hidrolizar y/o isomerizar enlaces a altas temperaturas, bajas temperaturas, pH alcalinos y pH ácidos. En un aspecto, la hidrolasa, p. ej., la lipasa descrita en este documento es una saturasa que cataliza las reacciones de hidrólisis, alcoholisis, acidólisis, esterificación y aminólisis, si el ácido carboxílico o graso en la molécula formada o sometida a reacción es un ácido graso saturado tal como ácido acético, ácido butírico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico o ácido araquídico. En un aspecto, la hidrolasa, p. ej., la lipasa o saturasa descrita en el presente documento es una palmitasa que hidroliza las reacciones de hidrólisis, alcoholisis, acidólisis, esterificación y aminólisis, si el ácido carboxílico o graso en la molécula formada o sometida a reacción es ácido palmítico. En un aspecto, la hidrolasa, p. ej., la lipasa o saturasa descrita en este documento es una estearatasa que hidroliza las reacciones de hidrólisis, alcoholisis, acidólisis, esterificación y aminólisis, si el ácido carboxílico o graso en la molécula formada o sometida a reacción es ácido esteárico.

Se describen enzimas que comprenden variantes de hidrolasa (p. ej., “variante de lipasa”, “variante de saturasa”, “variante de palmitasa” o “variante de estearatasa”) de las enzimas descritas en este documento; estas enzimas pueden tener una secuencia de aminoácidos derivada de la secuencia de aminoácidos de un “precursor”. El precursor puede incluir hidrolasa natural y/o una hidrolasa recombinante. La secuencia de aminoácidos de la variante de hidrolasa “deriva” de la secuencia de aminoácidos de hidrolasa precursora mediante sustitución, eliminación o inserción de uno o más aminoácidos de la secuencia de aminoácidos precursora. Dicha modificación es la “secuencia precursora de DNA” que codifica la secuencia de aminoácidos de la lipasa precursora en lugar de la manipulación de la enzima hidrolasa precursora per se. Los métodos adecuados para dicha manipulación de la secuencia precursora de DNA incluyen métodos descritos en este documento, como también métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Generación y manipulación de ácidos nucleicos

En un aspecto, se describen en este documento ácidos nucleicos, incluidos los casetes de expresión tales como los vectores de expresión que codifican los polipéptidos (p. ej., hidrolasas, tales como lipasas saturasas, palmitasas y/o estearatasas, y anticuerpos). En otro aspecto, se describen en este documento ácidos nucleicos que tienen una secuencia expuesta en la SEC ID NÚM:1 y que tienen por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más, o todos los cambios de residuos base descritos en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23 (o sus equivalentes). En una realización, se describen ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que tienen una secuencia expuesta en la SEC ID NÚM:2 tienen por lo menos uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, o más, o todos los cambios de residuos de aminoácidos descritos en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23 (o sus equivalentes).

SEC ID NÚM:1

**ATGCTGAAACCGCCTCCCTACGGACGCCTGCTGCGCGAACTGGCCGATATC
CCGGCCATCGTGACGGCACCGTTCCGGGGCGCTGCGAAAATGGGCAAAC TG
GCGGATGGCGAGCCGGTACTGGTGCTGCCCGGCTTCTTGGCCGACGACAAC
GCCACCTCGGTGCTGCGCAAGACCTTCGATGTCGCGGGGCTTTGCCTGTTCG
GGCTGGGAACGCGGCTTCAACCTCGGCATTCTGTTGGCGACCTCGTGGACCGG
CTGGTCGACCGGCTGCGGGCGGTGTCGGAGGCGGCCGGTGGTCAGAAGGT
GATCGTGGTCGGCTGGAGCCTCGGCGGCCTCTATGCGCGCGAGCTGGGCCA
CAAGGCGCCCGAACTGATCCGGATGGTCGTCACGCTCGGCAGTCCGTTTCG
GGGCGACCTCCACGCCAACCATGCGTGGAAGATCTACGAGGCGATCAACAG
CCACACGGTCGACAACCTGCCGATCCCGGTTCGATTTCAGATTAAAGCCGCC
GGTGCGCACCATCGCGGTGTGGTCGCCGCTCGACGGGGTGGTGGCGCCGG
AGACCTCGGAAGGCTCGCCCGAGCAGTCGGACGAGCGGCTAGAGCTGGCG**

**GTGACCCACATGGGCTTTGCCGCATCGAAGACCGGGGCCGAGGCTGTGGTC
CGGCTGGTCGCGGCGCGGCTCTAG**

SEC ID NÚM:2 (codificada por SEC ID NÚM:1):

código de una letra:

**MLKPPPYGRLLRELADIPAIVTAPFRGAAMGKLADGEPVLVLPGLADDNATSVLR
KTFDVAGFACSGWERGFNLGIRGDLVDRLVDRLRAVSEAAGGQKVIVVGWSLGG
YARELGHKAPELIRMVVTLGSPFAGDLHANHAWKIYEAINSHTVDNLPVPDFQIKPP
VRTIAVWSPLDGVVAPETSEGSPSEQSDERLELAVTHMGFAASKTGAEAVVRLVAAR
L-**

código de 3 letras:

Met Leu Lys Pro Pro Pro Tyr Gly Arg Leu Leu Arg Glu Leu Ala Asp
 Ile Pro Ala Ile Val Thr Ala Pro Phe Arg Gly Ala Ala Lys Met Gly
 Lys Leu Ala Asp Gly Glu Pro Val Leu Val Leu Pro Gly Phe Leu Ala
 Asp Asp Asn Ala Thr Ser Val Leu Arg Lys Thr Phe Asp Val Ala Gly
 Phe Ala Cys Ser Gly Trp Glu Arg Gly Phe Asn Leu Gly Ile Arg Gly
 Asp Leu Val Asp Arg Leu Val Asp Arg Leu Arg Ala Val Ser Glu Ala
 Ala Gly Gly Gln Lys Val Ile Val Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu
 Tyr Ala Arg Glu Leu Gly His Lys Ala Pro Glu Leu Ile Arg Met Val
 Val Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ala Gly Asp Leu His Ala Asn His Ala
 Trp Lys Ile Tyr Glu Ala Ile Asn Ser His Thr Val Asp Asn Leu Pro
 Ile Pro Val Asp Phe Gln Ile Lys Pro Pro Val Arg Thr Ile Ala Val
 Trp Ser Pro Leu Asp Gly Val Val Ala Pro Glu Thr Ser Glu Gly Ser
 Pro Glu Gln Ser Asp Glu Arg Leu Glu Leu Ala Val Thr His Met Gly
 Phe Ala Ala Ser Lys Thr Gly Ala Glu Ala Val Val Arg Leu Val Ala
 Ala Arg Leu

SEC ID NÚM:3:

ATGGCCGGCCACCAGGGCGCGCGGGGCCCCAAAGACGGTCCGCCGGCGATGGTG
 ATCCCGGGCTTCCTCGCCACGACAGGCACACGACACGATTGCGCCGGGAATC
 GCCGAGGCGGGGTTACGGGTTACCCCTGGCGGCAGGGCTGGAACATGGGAGCG
 CGTGCCGACACGCTCGAGAAATTGAAGCGGGCAGTGGACCAGTGC GGTCATGAC
 GAGCCGATCCTGCTGGTCGGCTGGAGTCTGGGCGGGCTCTACGCGAGGGAGGTC
 GCGCGCGCCGAGCCGGATCAGGTGCGGGCGGTGGTCACTCTTGGTTCCCCGGTGT
 CGGGCGACCGGCGCCGCTACACCAACGTGTGGAAGCTGTACGAATGGGTGGCGG
 GTCACCCGGTGGACGACCCGCGGATCCCCGACAAGGAGGAAAAGCCGCCGGTGC
 CGACCCTGGCTTTGTGGTCGGCGGATGACGGGATCGTCGGCGCCCCGTCGGCGCG
 CGGGACTCAGTTATCTCACGACAAGGCGGTGCGAGATGCGAACGAGCCACATGGG
 CTTTGCCATGTCGGCGAAGAGCGCACGCTTTGTTGTCGCCGAGATCGTGAAGTTC
 CTGAAGAAAACCGAAGGTTCCGAGTCGCACGATTGA

SEC ID NÚM:4 (codificada por SEC ID NÚM:3):

MAGHQGARGPKDGPPAMVIPGFLAHDRTTTLRRELAEAGFRVHPWRQGWNMGA
 RADTLEKLKRAVDQCGHDEPILLVGWSLGGLYAREVARAEPDQVRAVVTLGSPVSG
 DRRRYTNVWKLYEWVAGHPVDDPPDPDKEEKPPVPTLALWSADDGIVGAPSARGTQ
 LSHDKAVEMRTSHMGFAMSAKSARFVVAEIVKFLKKTGSESHD

5

SEC ID NÚM:5:

GTGAGCGAGAAAGGCGCACCCAAGGGAAGGCAGCGGCTGAAGGAGATCGGCGC
 GCTTCTGTTCCACGCGCCTCGCAGCTTGGGCCATCTGGGCGCGCGCGGCCCAAG
 GACGGTCCCTCCGGTGATGGTCATCCCGGGATTCTCGCGCACGACTTGCATACGA
 CGCAGTTGCGCCGGGCGCTCGCGAAGGCAGGCTTCCGAGTGCATCCGTGGCGGC
 AGGGGATGAACCTTGGAGCGCGCGCCGATACGCTCGAAATTCTGAAGCGCGCGG
 TGGATTCTGCGGCTCGAGCGAGCCGATGCTGCTCGTCGGCTGGAGCCTGGGCGG
 TCTCTATGCCCGGGAGATCGCGCGTGCGGAGCCGGACCGGGTGC GGCGGTGGT
 GACGATGGGATCGCCGGTGTGGGGCGACCGCAGGCGCTACACCAACGTGTGGAA
 GCTGTACGAACGATTGCCGGCCATCCGGTCGACAAGCCGCCGATCCCGGACAA
 GAGCCAGAAGCCGCCGGTGCCGACTCTGGCTTTGTGGTTCGCAGCATGATGGCATC
 GTCGGCGCGCCCTCGGCGAGAGGGACGAAGAAGACCCGCGACAAGGCGGTTCG
 CATCGACACGACTCACATGGGGTTTGCCATGTGCCCCAAGACGACGCGCGCGGC
 AGTGCGTGAGATCGTGGGCTTTTTGAATGAAGTCGAAGGCGGTTTCGTCACCCCGG
 GCGTGA

SEC ID NÚM:6 (codificada por SEC ID NÚM:5):

MSÈKGAPKGRQRLKEİGALLFHAPRSLGHLGARGPKDGPPVMVIPGFLAHDLTTL
 RRALAKAGFRVHPWRQGMNLGARADTLEILKRAVDSCGSSEPMLLVGWSLGGLYA
 REIARAEPDRVRAVVTMGSPVWGD RRRYTNVWKLYERIAGHPVDKPPIDKSQKPP
 VPTLALWSQHDGIVGAPSARGTKKTRDKA VAIDTTHMGFAMSPKTTAAVREIVGF
 LNEVEGGSSPRA

SEC ID NÚM:7:

ATGAGGCTGCGCGAGGGGGGCGCGCTCGTATCGCGGGCCTATCGCGCCTTCGGG
 CGCTCGGCGAGCGCGGCCCGGCGGACGGGCCGCGCTGATGGTGATCCCGGGC
 TTCCTCGCCACCGATCGCACCACTTTGGGGCTGCAGCGGGCGCTGGCCAAGGGCG
 GCTACAAGGTGACCGGATGGGGCATGGGCCTAACAGCGGCGTCAACGAAGACA
 TAGTCGACCGCATCGCCGCTCGGGTCGAAAGGTTTGGAGCCGGCCGCAAAGTGA
 TCCTCGTCGGCTGGAGCCTCGGCGGACTCTACGCGCGCGTGGTTCGCGCAGGAGC
 GGCCGGATCTCGTCGACAAGGTGGTCACGCTCGGCTCGCCCTTTTCGGGCGACAG
 GCGCCGCAACAACAATGTCTGGCGGCTCTACGAGTTCGTC
 GCCGGCCATCCGGTCAACAGCCCGCCGATCGACAAGGACCCCGAGGTGAAGCCG
 CCGGTGCCGACGCTCGCTATCTGGTCGCGGCGCGACGGCATCGTCTCTCCGGCGG
 GCGCGCGCGGGCGGGAGGGAGAGCGCGACGCCGAGCTCGAGCTCGACTGCAGC
 CACATGGGCTTTGCGGTTCAGCGCCAGGGCTTATCCCAAGATCGTGGAGGCGGTG
 CGGGCGTTTCCGGAAAACATCCGTTTCGCGCTGA

5

SEC ID NÚM:8 (codificada por SEC ID NÚM:7):

MRLREGGALVSRA YRAFGRLGERGPADGPPLMVIPGFLATDRTTLGLQRALAKGGY
 KVTGWMGLNSGVTE DIVDRIAARVERFGAGRKVILVGWSLGGLYARVVAQERPD
 LVDKVVTLGSPFSGDRRRNNNVWRLYEFVAGHPVNSPPIDKDPEVKPPVPTLAIWSR
 RDGIVSPAGARGREGERDAELELDCSHMGFAVSARA YPKIVEAVRAFPENIRSR

SEC ID NÚM:9:

ATGAAGCCGCCGCCGCGGATGGATGAAGATCCGGGAGGCGGGCTCGCTCCTCGCG
CGCTTCTACCGCGCGTTTCGGCAAGCTCGAGCCGCGCGGGCCGGCGGACGGGGCCG
AAGCTGATGGTGATCCCGGGTTTCCTCGCGGGCGACAGGACGACGCTCGGGGCTG
CAGCGAGCGCTGGCCGGCGGGCGGCTACCGGGTCGCCGGCTGGGGGCTGGGGGTG
AACCGCGGCGTTTCGGAGGACGTGGTCGACCGGATCGGCCAGCAAGTCGCGCGG
TTCGGGGCGGGCGAGAAGGTGATCCTGGTCGGCTGGAGCCTTGGCGGGGCTTTAT

GCGCGCGTGGTGGCGCAGGAGCGGCCCCGACCTCGTCGAGAAGGTGGTGACCTTG
GGCTCGCCGTTTTTCGGGCGACCGGCGGCGCAACAACAATGTGTGGCGGCTCTATG
AGTGGGTGGCTGGGCATCCGGTGAACGATCCGCCGATCGACAAGGACCCGGCGA
AGAAGCCCCCGGTGCCGACGCTCGCGATCTGGTCGCGGCGTGATGGGATCGTGG
CGGTCGAAGGCGCGCGGGGGCGGCCGGAGGAGCGGGATGCCGAGCTGGAGATC
GATTGCAGCCACATGGGGTTTGGGGTCAGCGGCAAGGCGTTTCCCCGAATCGTA
GAGGCGGTGAAGGGGTTCTAA

SEC ID NÚM:10 (codificada por SEC ID NÚM:9):

MKPPPGWMKIREAGSLARFYRAFGKLEPRGPADGPKLMVIPGFLAGDRRTLGLQR
ALAGGGYRVAGWGLGVNRGVSEDVVDRIQQVARFGAGEKVILVGWSLGGLYAR
VVAQERPDLEKVVTLGSPFSGDRRRNNNVWRLYEWVAGHPVNDPPIDKDKPAKKPP
VPTLAIWSRRDGIVAVEGARGRPEERDAELEIDCSHMGGFVSGKAFPRIVEAVKGF

5 SEC ID NÚM:11:

GTGTTGGTGCTGCCGGCGTTTCCTCGCCAACGACCTTCCCACTTCGCTTCTCCGCAG
GACGCTGAAGGCGAACGGGTTTTCGCCCGTTTCGGCTGGGCGAACGGTTTCAACTTA
GGTGACGGCCGGACACGCTCCAGCGCCTGAGCGCACGGCTCGATGCGGTGGTT
CAGGAAGCGGGCAGGCCGGTTGCATTGATCGGCTGGAGCCTTGGCGGGGCTTTAT
GCCCCGAGAGCTGGCGAAACGCAGGTCGGCTGAGGTGTCGGCAGTGATCACGCTC
GGCACGCCCTTCTCGGTTGACCTCAGACGCAACAACGCCTGGAAGCTGTACGAG
CTCATCAACGATCATCCTGTCGATGCCCTCCCTTGGATGTTTCAGGTCGACGCGA
AGCCACCCGTCCGAACCTTCGCTTTGTGGTTCGCGTCGCGACGGGATCGTAGCGCC
CGCGAGCGCGCACGGCATGGAGGGCGAGTTCGACCAGGCGATCGAGCTGCAGTG
CACGCACAACGAGATGGTCAGTGATCCGGAGGCCCTCTCCACGATCGTTACCTTG
CTGCGGGGAAAATGTTGGCTCCTGA

SEC ID NÚM:12 (codificada por SEC ID NÚM:11):

MLVLP AFLANDLPTSLRRTLKANGFRPFGWANGFNLGARPDTLQRLSARLDAVVQ
EAGRPVALIGWSLGGLYARELAKRRSAEVS AVITLGPFSVDLRRNNAWKLYELIND
HPVDAPPLDVQVDAKPPVRTFALWSRRDGIVAPASAHGMEGEFDQAIELQCTHNEM
VSDPEALSTIVTLLRENVGS

SEC ID NÚM:13:

GTGAATACAGCCGACCTATTGAAGCCACCACCCGCAAGCATGACAGTTCTCGAG
 GCGAGAGCGCTGCTGGACATATGCAAGATGAGCGCCCCATTGGCGCGCTTGCTA
 TTCAAAAAGAACTCGCCCTGGCGCAAACAACGGGTTCTCGTAATACCTGGCTTTG
 GCGCTGATGATCGCTACACCTGGCCGTTGCGCAATTCGTCCAGGCACAGGGCTA
 TGCCACGACTGGCTGGGGCCTGGGCACCAACAAGGCAGGTCTCAATATGCCGCA
 TCAACTATCCGACGTCCACCCAGATGGAAGCTAAAACCCAAGACGCCGTACCG
 TGGTGAGGCGGGCGTACCTTACGTGATTGACCGCTTGATCGAACGGTTTGACGAA
 TTGGCATCGACGGATCCGCAACCCATCGCACTTATAGGTTGGAGTCTGGGTGGTT
 TCATGGCCCGTGAAGTTGCCCGAGAGCGCCCAAACCAGGTGAGTCAGGTTATTA
 CCCTCGGTTCTCCTGTCATCGGAGGCCCAAATAACCCCTCGCTGCATCGGCTTT
 CATCCGGCGCAAATACGATTTGGACTGGGTGGAGCAAGTGATCGCGGAGCGGGA
 AGATCGCCCCATTACTGTTCTATTACAGCAATAGTCAGCCAGTCTGATGGCATC
 GTCGGATATTCAGCGGCAATCGATCACCACAGTCCCGCTGTGCAGCATTACATA
 TGGATGTTGCCCATTTGGGCTTTCTTACAACACGAGGGTTTGGTCAGAAATCGC
 CAATGCGCTCAACTCTTAGAGGTGGAGAAGGAGCGTGTTTAG

SEC ID NÚM:14 (codificada por SEC ID NÚM:13):

MNTADLLKPPASMTVLEARALLDICKMSAPLARLLFKKNSPWRKQRVLVIPGFGA
 DDRYTWPLRNFVQAQGYATTGWGLGTNKAGLNMPHQLSDVHPRWKLKPKTPYRG
 EAGVPYVIDRLIERFDELASTDPQPIALIGWSLGGFMAREVARERPNQVSQVITLGSPV
 IGGPKYTLAASAFIRRKYDLWDVEQVIAEREDRPITVPITAIVSQSDGIVGYSAIDHH
 SPAVOHLHMDVAHLGFPYNTRVWSEIANALNSLEVEKERV

SEC ID NÚM:15:

ATGGAGCTCGCCAAGGTCACCGCCCTGATGAAGGCCACCGCCCTCGAGATCGCG
 ATCCTCACCGGCCACCTCGTCCTTACCCCTCCGGGATCGTGGCCGAGCGCCTCG
 CGGCCGCCCCCTCTTACCGTCTTCCCGTCCGCGGGCCCGACGGGCCGACGTCC
 GGTCGTCCTGCTGCACGGTTTTCGTGGACAACCGCTCGGTCTTCGTCTCTGCTGCGC
 CGTGCCCTCACCGGAGCGGCCGTGACTGCGTCGAGTCGCTCAACTACTCGCCGC
 TCACCTGCGACCTGCGGGCCGCCGCGAACTGCTGGGGCGCCGGGTGGACGAGA
 TCCGCGCCCGGACCGGACACGCCGAGGTGACATCGTCGGCCACAGCCTGGGCG
 GGCTCATCGCCCGTTATTACGTACAGCGTCTCGGCGGTGACAGCCGGGTGCGCAC
 CCTGGTCATGCTCGGCACCCCGCACTCCGGCACCAACCGTGGCCCGGCTCGCCGAC
 GCGCATCCGCTGGTGCGGCAGATGCGGCCGGGTTCGGAGGTGCTGCGGGAGCTC
 GCCGCGCCCTCGCCCGGCTGCCGTACCCGGTTCGTGAGCTTCTGGAGCGACCTC
 GACCAGGTGATGGTGCCGGTGGACACGGCCTGCCTGGACCACCCCGACCTGCTG
 GTGCACAACGTCCGGGTGAGCGGGATCGGTATCTCGCGCTGCCGGTCCATCCCA
 CGGTGGCGGGCCGGGTCCGGGAGGCCCTCGACGCGAGCGGCGCGGGGGTCCCGG
 GGGTGCGGGAGGAGGGGCCCCGGCGCCGGCGCCGTGGCGTGA

5

SEC ID NÚM:16 (codificada por SEC ID NÚM:15):

MELAKVTALMKATALEIAILTGHVLVYPSGIVAERLAAAPSSPSSPSAGPTGRRPVVL
 LHGFVDNRSVFVLLRRALTRSGRDCVESLNYSPLTCDLRAAAELLGRRVDEIRARTG
 HAEVDIVGHSLGGLIARYYVQRLGGDSRVRTLVM LGTPHSGTTVARLADAHPLVRQ
 MRPGSEVLRELAAPSPGCRTRFVSFWSLDLQVMVPVDTACLDHPDLLVHNVRVSGI
 GHLALPVHPTVAAGVREALDASGAGVPGVREEGPGAGAVA

SEC ID NÚM:17:

GTGGCCGCCGCGGACAGCGGGACGGCGGAAGGGCAAAGGCTTCGGCCGCCGAG
 CCTGTTCTGATGCTGGCCGAGGCGAGGGGCTTGCTCGAACTGAAGCTCGAGCCTG
 TTGTTGTCGCCGCTGTTGTTGCGGGCGCCGAAGGGCGACGGACATCCGGTGCTGG
 CGCTGCCGGGCTTTCTCGCCAGCGATCTGTGATGGCGCCGATGCGGCGCTATCT
 GAAAGAACTCGGCTACGATGCCCATGCGTGGAACATGGGCGCAATCTCGGCGG
 CGTCGCGTCCAAGCGCGAAGCCTTGCGCGACCTGTTGCGGCGCATTTACAGCCAG
 ACGGGCCGCAAGGTCAGCCTGGTCGGCTGGAGTCTCGGCGGCGTCTATGCGCGC
 GATCTCGCTTTGCAGGCGCCCGACATGGTGCGTTCCGTGATCACGCTCGGCAGTC
 CGTTTGCCAGCGACATCAGGGCGACCAACGCCACGCGGCTCTACGAGGCGCTGT
 CGGGAGAAAGGGTCGACGACAATCCGGAGTTAACAGCGGCGATCGCCGGCGACC
 TGCCGGTGCCGGCGACCTCGATCTATTCCCGTACCGACGGTATCGTGAAGTGGCA
 CACCAGCCTGCTGCGTCCTTCCGCAACGGCTGAAAACATCGAGGTTTACTTCGCC
 AGCCATATCGGGCTCGGCGTCAACCCGGCAGCGCTGTGGGCGGTGGCCGACCGC
 CTGGCGCAGCCCGAGGGGGAATTTAAGCATTTTGACCGGTGCGGTCCCTTTGCCA
 TTGCCTATGGCCCCCTGAAAATGCACAATCCTGA

SEC ID NÚM:18 (codificada por SEC ID NÚM:17):

MAAADSGTAEGQRLRPPSLFLMLAEARGLLELNSSLLSPLLLAPKGDGHPVLALP
 GFLASDLSMAPMRRYLKELGYDAHAWNMGRNLGGVASKREALRDLLRRIYSQTR
 KVSLVGWSLGGVYARDLALQAPDMVRSVITLGSPFASDIRATNATRLYEALSGERV
 DDNPELTAIAIGDLPVPATSIYSRTDGIVNWHSTLLRPSATAENIEVYFASHIGLVNP
 AALWAVADRLAQPEGEFKHFDRSGPFAIAYGPPENAQS

SEC ID NÚM:19:

ATGCCGGAGCGAAACGAAGCGCAGGCCCCGCCGCGTCTTCGTCCGCCGGGGCTC
 GGGCTGTTCTCGCCGAAGCGCGGGGCATTTTCGAGCTCAACGCGAGCCTGTTGC
 TGTCGCCGCTTCTGTTGCGCGCGCCGCGCGGCGACGGCCATCCGGTGCTGGCGTT
 GCCGGGCTTTCTTGCCAGTGATCTATCGATGGCGCCGTTGCGCCGCTACCTCACC
 GAGCTCGGCTACGACACCCACGCCTGGCGCATGGGCGCAATGTCGGCGGCATC
 GCGAAGATGCGGATCGCGCTGCTCGAGCGGCTCACGCAGATCCATGCCGAGTGC
 GGCCGCAAGGTCTCGATTGTCGGCTGGAGTCTCGGCGGCGTCTATGCGCGCGACC
 TCGCGTTGCAGGCGCCCGAGATGGTGCGCTACGTCGTCACCCTCGGCAGCCCCCTT
 CGCCAGCGACGTCCGCGCCACCAATGCGACGCGGCTCTATGAGGCGATGTCGGG
 CGAAACGGTCGGCGACAATGTCGACCTCGTGACGGCGATTGCCGGCGACCTGCC
 GGTTCGCGTGACCTCGATCTATTGAAAGAGCGACGGCATCGTGAAGTGGCGGACC
 TGCCTGCTGCGCCCGTCCGCGACCGCCGAGAATATCGAGGTCTATTTGCGGAGCC
 ATGTCGGCATCGGCGTCAATCCGGCCGCGCTGTGGGCGATCGCGGACCGGCTGG
 CCCAGCGGGAAGGCGAATTCCGCCCCCTTCGACCGGTCCGGTCCTTTGCCATTGC
 CTACGCGCCCCCGGAACAGGCACAATCGATCTGA

5

SEC ID NÚM:20 (codificada por SEC ID NÚM:19):

MPERNEAQAPPRLRPPGLGLFLAEARGIFELNASLLSPLLLAPRGDGHVPVLALPGF
 LASDLSMAPLRRYLTELGYDTHAWRMGRNVGGIAKMRIALLERLTQIHAECGRKVS
 IVGWSLGGVYARDLALQAPEMVRYVVTLGSPFASDV RATNATRLYEAMSGETVGD
 NVDLVQAIAGDLPVPVTSIYSKSDGIVNWRTCLLRPSATAENIEVYFASHVGIGVNPA
 ALWAIADRLAQREGEFRPFDRSGPFAIAYAPPEQAQSI

Se describen métodos para descubrir nuevas secuencias de hidrolasa que usan los ácidos nucleicos de la presente invención. Se describen métodos para modificar los ácidos nucleicos descritos en este documento, p. ej., tecnologías GSSMSM y GeneReassemblySM. Los ácidos nucleicos descritos en esta invención se pueden elaborar,

10

aislar y/o manipular, p. ej., por clonación y expresión de genotecas de cDNA, ampliación de DNA mensajero o genómico por PCR y similares.

La fuente inicial de polipéptidos ilustrativos y ácidos nucleicos seleccionados son:

SEC ID NÚM:	Fuente
1, 2	Obtenida de muestra ambiental
3, 4	Obtenida de muestra ambiental
5, 6	Obtenida de muestra ambiental
7, 8	Obtenida de muestra ambiental
9, 10	Obtenida de muestra ambiental
11, 12	Obtenida de muestra ambiental
13, 14	Obtenida de muestra ambiental
15, 16	Bacteria
17, 18	Obtenida de muestra ambiental
19, 20	Obtenida de muestra ambiental

- 5 En la práctica de los métodos descritos en esta invención, los genes homólogos se pueden modificar manipulando un ácido nucleico de molde, como se describe en este documento. El objeto reivindicado puede apreciarse en conjunto con cualquier método o protocolo o dispositivo conocido en la técnica, que se describen bien en la bibliografía científica y de patentes.

Técnicas generales

- 10 Se describen ácidos nucleicos que incluyen RNA, RNAi (p. ej., siRNA, miRNA), ácido nucleico antisentido, cDNA, DNA genómico, vectores, virus o sus híbridos, ácidos nucleicos aislados de una diversidad de fuentes, genéticamente modificados, ampliados y/o expresados/generados recombinantemente. Los polipéptidos recombinantes generados a partir de estos ácidos nucleicos pueden aislarse o clonarse individualmente y ensayarse para una actividad deseada (p. ej., hidrolasa, tal como p. ej., una actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa). Se puede usar cualquier sistema de expresión recombinante, incluidos sistemas de expresión de
15 células bacterianas, mamíferas, de levadura, fúngicas, de insectos o plantas.

- Alternativamente, estos ácidos nucleicos pueden sintetizarse *in vitro* por técnicas de síntesis conocidas, como se describe, p. ej., en Adams (1983) J. Am. Chem. Soc. 105:661; Belousov (1997) Nucleic Acids Res. 25:3440-3444; Frenkel (1995) Free Radic. Biol. Med. 19:373-380; Blommers (1994) Biochemistry 33:7886-7896; Narang (1979) Meth. Enzymol. 68:90; Brown (1979) Meth. Enzymol. 68:109; Beaucage (1981) Tetra. Lett. 22:1859; patente de
20 Estados Unidos núm. 4.458.066.

- Las técnicas para manipulación de ácidos nucleicos tales como, p. ej., subclonación, sondas de marcado (p. ej., marcado de cebadores aleatorios usando polimerasa Klenow, desplazamiento de mella, ampliación), secuenciación, hibridación y similares se describen en la bibliografía científica y de patentes, véase, p. ej., Sambrook, ed.,
25 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2ª ED.), Volúmenes. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, (1989); CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Ausubel, ed. John Wiley & Sons, Inc., New York (1997); LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY: HYBRIDIZATION WITH NUCLEIC ACID PROBES, Parte I. Theory and Nucleic Acid Preparation, Tijssen, ed. Elsevier, N.Y. (1993).

- Otros medios útiles para obtener y manipular ácidos nucleicos utilizados para practicar los métodos descritos en este documento consisten en clonar a partir de muestras genómicas y, si se desea, estudiar y reclonar insertos aislados o
30 ampliados de, p. ej., clones genómicos o clones de cDNA. Las fuentes de ácido nucleico que se usan en los métodos provistos en esta memoria incluyen genotecas genómicas o de cDNA contenidas en, p. ej., cromosomas artificiales mamíferos (MAC), véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 5.721.118; 6.025.155; cromosomas artificiales humanos, véase, p. ej., Rosenfeld (1997) Nat. Genet. 15:333-335; cromosomas artificiales de levadura (YAC); cromosomas artificiales bacterianos (BAC); cromosomas artificiales de P1, véase, p. ej., Woon (1998) Genomics 50:306-316; vectores derivados de P1 (PAC), véase, p. ej., Kem (1997) Biotechniques 23:120-124; cósmidos, virus recombinantes, fagos o plásmidos.

- Las frases "ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico" pueden incluir un oligonucleótido, nucleótido, polinucleótido, o un fragmento de cualquiera de éstos, DNA o RNA (p. ej., mRNA, rRNA, tRNA, RNAi) de origen genómico o sintético que puede ser mono o bicatenario y puede representar una cadena sentido o antisentido, un
40 ácido nucleico peptídico (PNA) o cualquier material de tipo DNA o RNA, de origen natural o sintético, incluyendo, p. ej., RNAi (RNA bicatenario "interferente"), ribonucleoproteínas (p. ej., iRNP). El término abarca ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. El término también abarca

estructuras de tipo ácido nucleico con cadenas principales sintéticas, véase p. ej., Mata (1997) *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 144:189-197; Strauss-Soukup (1997) *Biochemistry* 36:8692-8698; Samstag (1996) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 6:153-156.

Tal como se emplea en la presente memoria, el término “promotor” incluye todas las secuencias capaces de impulsar la transcripción de una secuencia codificante en una célula, p. ej., una célula vegetal. Por lo tanto, los promotores utilizados en los constructos descritos en el presente documento incluyen elementos de control de transcripción de acción cis y secuencias reguladoras implicadas en la regulación o modulación del tiempo y/o la velocidad de transcripción de un gen. Por ejemplo, un promotor puede ser un elemento de control de transcripción de acción cis, incluido un potenciador, un promotor, un terminador de transcripción, un origen de replicación, una secuencia de integración cromosómica, regiones no traducidas 5' y 3' o una secuencia intrónica, que está implicado en la regulación de la transcripción. Estas secuencias de acción cis típicamente interactúan con proteínas u otras biomoléculas para llevar a cabo (activar/desactivar, regular, modular, etc.) la transcripción. Los promotores “constitutivos” son aquellos que impulsan la expresión continuamente bajo la mayoría de las condiciones ambientales y estados de desarrollo o diferenciación celular. Los promotores “inducibles” o “regulables” dirigen la expresión del ácido nucleico descrito en este documento bajo la influencia de condiciones ambientales o condiciones de desarrollo. Los ejemplos de condiciones ambientales que pueden afectar la transcripción por parte de promotores inducibles incluyen condiciones anaerobias, temperatura elevada, sequía o presencia de luz.

Los promotores “específicos de tejido” son elementos de control de la transcripción solamente activos en células, tejidos u órganos particulares, p. ej., en plantas o animales. La regulación específica de tejido se puede lograr con ciertos factores intrínsecos que aseguran que se expresen los genes que codifican proteínas a un tejido determinado. Se sabe que dichos factores existen en animales y plantas para permitir que se desarrollen tejidos específicos.

El término “planta” incluye plantas enteras, partes de plantas (p. ej., hojas, tallos, flores, raíces, etc.), protoplastos de plantas, semillas y células de plantas, y su descendencia. La clase de plantas que se puede utilizar en el método de la presente invención es en general tan amplia como la clase de mayores plantas susceptibles a técnicas de transformación, incluyendo angiospermas (plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas), como también gimnospermas. Incluye plantas de una gran variedad de niveles de ploidía, incluidos estados poliploide, diploide, haploide y hemigigota. Tal como se emplea en la presente memoria, la expresión “planta transgénica” incluye plantas o células vegetales a las que se les ha insertado una secuencia de ácido nucleico heteróloga, p. ej., los ácidos nucleicos y varios constructos recombinantes (p. ej., casetes de expresión) descritos en este documento.

En un aspecto, un ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en este documento se ensambla en una fase apropiada con una secuencia líder capaz de dirigir la segregación del polipéptido traducido o su fragmento.

Se describen proteínas de fusión y ácidos nucleicos que las codifican. Un polipéptido descrito en el presente documento puede condensarse a un péptido o polipéptido heterólogo, tal como péptidos de identificación N-terminal que imparten características deseadas, tales como mayor estabilidad o pureza simplificada. Los péptidos y polipéptidos descritos en este documento también se pueden sintetizar y expresar como proteínas de fusión con uno o más dominios adicionales ligados a ellos, p. ej., para producir un péptido más inmunogénico, para aislar más fácilmente un péptido recombinantemente sintetizado, para identificar y aislar células B que expresan anticuerpos y similares. Los dominios que facilitan la detección y purificación incluyen, p. ej., péptidos quelantes de metal tales como marcas de polihistidina y módulos de histidina-triptófano que permiten la purificación en metales inmovilizados, dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada y el dominio utilizado en el sistema de purificación por extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA). La inclusión de una secuencia enlazadora escindible, tal como el Factor Xa o las secuencias de escisión de enterocinasa (Invitrogen, San Diego CA) entre un dominio de purificación y el péptido o polipéptido que comprende el motivo pueden facilitar la purificación. Por ejemplo, un vector de expresión puede incluir una secuencia de ácido nucleico que codifica un epítipo unido a seis residuos histidina seguido de tioredoxina y un sitio de escisión de enterocinasa (véanse, p. ej., Williams (1995) *Biochemistry* 34:1787-1797; Dobeli (1998) *Protein Expr. Purif.* 12:404-414). Los residuos histidina facilitan la detección y purificación, mientras que el sitio de escisión de enterocinasa proporciona un medio para purificar el epítipo del resto de la proteína de fusión. La tecnología concerniente a vectores que codifican proteínas de fusión y aplicación de proteínas de fusión se describe en la bibliografía científica y de patentes, véase p. ej., Kroll (1993) *DNA Cell. Biol.*, 12:441-53.

Secuencias de control de transcripción y traducción

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

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

Promotores vegetales específicos de tejido

Se describen casetes de expresión que se pueden expresar en un modo específico del tejido, p. ej., que pueden expresar una hidrolasa descrita en este documento en un modo específico de tejido. Se describen plantas o semillas que expresan una hidrolasa descrita en este documento en un modo específico del tejido. La especificidad del tejido puede ser específica de la semilla, específica del tallo, específica de la hoja, específica de la raíz, específica del fruto y similar.

En un aspecto, un promotor constitutivo tal como el promotor CaMV 35S se puede usar para expresión en partes específicas de la planta o la semilla o de toda la planta. Por ejemplo, para sobreexpresión de una hidrolasa descrita en el presente documento, puede emplearse un fragmento promotor de la planta que dirigirá la expresión de un ácido nucleico en algunos o todos los tejidos de una planta, p. ej., una planta regenerada. Dichos promotores "constitutivos" son activos bajo la mayoría de las condiciones ambientales y estados de desarrollo o diferenciación celular. Los ejemplos de promotores constitutivos incluyen la región de iniciación de transcripción del virus mosaico de coliflor (CaMV) 35S, el promotor 1' o 2' derivado de T-DNA de *Agrobacterium tumefaciens* y otras regiones de iniciación de transcripción de diversos genes vegetales conocidos por el experto en la técnica. Dichos genes incluyen, p. ej., *ACT11* de *Arabidopsis* (Huang (1996) *Plant Mol. Biol.* 33:125-139); *Cat3* de *Arabidopsis* (GenBank núm. U43147, Zhong (1996) *Mol. Gen. Genet.* 251:196-203); el gen que codifica la proteína desaturasa del vehículo esteroil-acilo de *Brassica napus* (Genbank núm. X74782, Solcombe (1994) *Plant Physiol.* 104:1167-1176); *GPcl* de maíz (GenBank núm. X15596; Martinez (1989) *J. Mol. Biol.* 208:551-565); el *Gpc2* de maíz (GenBank núm. U45855, Manjunath (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:97-112); los promotores vegetales descritos en las patentes de Estados Unidos núm. 4.962.028; 5.633.440.

Se describen promotores específicos de tejido o constitutivos derivados de virus que pueden incluir, p. ej., el promotor subgenómico de tobamovirus (Kumagai (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:1679-1683; el virus baciloforme del tungro del arroz (RTBV), que se replica solamente en células de floema de plantas de arroz infectadas, con su promotor que impulsa la expresión génica del indicador específico de floema; el promotor del virus mosaico de la mandioca (CVMV), con la mayor actividad en elementos vasculares, en células mesófilas de las hojas y en puntas de raíces (Verdaguer (1996) *Plant Mol. Biol.* 31:1129-1139).

Alternativamente, el promotor vegetal puede dirigir la expresión de un ácido nucleico que expresa hidrolasa en un tejido específico, órgano o tipo de célula (es decir, promotores específicos de tejido) o puede estar de otro modo bajo un control del ambiente o del desarrollo más preciso o bajo el control de un promotor inducible. Los ejemplos de condiciones ambientales que pueden afectar la transcripción incluyen condiciones anaerobias, temperatura elevada, presencia de luz o pulverización con sustancias químicas/hormonas. Se describen promotores inducibles de sequía de maíz (Busk (1997) *supra*); el promotor inducible de frío, sequía y gran cantidad de sal de la patata (Kirch (1997) *Plant Mol. Biol.* 33:897 909).

Los promotores específicos de tejido pueden promover la transcripción solamente dentro de un cierto marco de tiempo de la etapa de desarrollo dentro de ese tejido. Véase, p. ej., Blazquez (1998) *Plant Cell* 10:791-800, que caracteriza el gen promotor de *Arabidopsis* LEAFY. Véanse también Cardon (1997) *Plant J* 12:367-77, que describe el factor de transcripción SPL3, que reconoce un motivo de secuencia conservado en la región promotora del gen de identidad API de meristemo floral *A. thaliana*; y Mandel (1995) *Plant Molecular Biology*, Vol. 29, pág 995-1004, que describe el promotor de meristemo eIF4. Se pueden usar los promotores específicos de tejido que pueden ser activos durante el ciclo de vida de un tejido particular. En un aspecto, los ácidos nucleicos descritos en la presente invención están operativamente unidos a un promotor activo, principalmente durante las etapas de estiramiento de la célula de fibra de algodón, p. ej., como lo ha descrito Rinehart (1996) *supra*. Los ácidos nucleicos pueden estar operativamente unidos al promotor del gen FbI2A para expresarse preferencialmente en las células de fibras de algodón (Ibid). Véanse también, John (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5769-5773; John, et al., patentes de Estados Unidos núm. 5.608.148 y 5.602.321, que describen promotores específicos de fibra de algodón y métodos para la construcción de plantas de algodón transgénicas. Los promotores específicos de la raíz pueden también utilizarse para expresar los ácidos nucleicos descritos en el presente documento. Los ejemplos de promotores específicos de la raíz incluyen el promotor del gen de deshidrogenasa de alcohol (DeLisle (1990) *Int. Rev. Cytol.* 123:39-60). Otros promotores que se pueden emplear para expresar los ácidos nucleicos descritos en este documento incluyen, p. ej., promotores específicos de óvulos, específicos de embriones, específicos de endosperma, específicos de integumento, específicos de semilla, o algunas de sus combinaciones, un promotor específico de hoja (véase, p. ej., Busk (1997) *Plant J.* 11:1285 1295, que describe un promotor específico de la hoja en maíz); el promotor ORF13 de *Agrobacterium rhizogenes* (que exhibe gran actividad en raíces, véase, p. ej., Hansen (1997) *supra*); un promotor específico de polen de maíz (véase, p. ej., Guerrero (1990) *Mol. Gen. Genet.*

224:161 168); se puede usar un promotor específico de tomate activo durante la maduración del fruto, senescencia y abscisión de hojas y, en menor medida, de flores (véase, p. ej., Blume (1997) Plant J. 12:731 746); un promotor específico de pistilo del gen de patata SK2 (véase, p. ej., Ficker (1997) Plant Mol. Biol. 35:425 431); el gen Blec4 de guisante, que es activo en tejido epidérmico de ápices de brotes vegetales y florales de alfalfa transgénica, convirtiéndola en una herramienta útil para dirigir la expresión de genes exógenos hacia la capa epidérmica de brotes activamente en crecimiento o fibras; el gen BEL1 específico de óvulo (véase, p. ej., Reiser (1995) Cell 83:735-742, GenBank núm. U39944); y/o el promotor en Klee, patente de Estados Unidos núm. 5.589.583, que describe que una región promotora de plantas es capaz de conferir altos niveles de transcripción en tejido meristemático y/o células que se dividen rápidamente.

Alternativamente, los promotores vegetales que son inducibles tras la exposición a hormonas vegetales, tales como auxinas, se usan para expresar los ácidos nucleicos descritos en esta memoria. Se describen promotores que comprenden el fragmento promotor E1 de elementos de respuesta de auxina (AuxRE) en soja (*Glycine max* L.) (Liu (1997) Plant Physiol. 115:397-407); el promotor GST6 que responde a auxina de *Arabidopsis* (también responde a ácido salicílico y peróxido de hidrógeno) (Chen (1996) Plant J. 10: 955-966); el promotor parC inducible de auxina de tabaco (Sakai (1996) 37:906-913); un elemento que responde a biotina vegetal (Streit (1997) Mol. Plant Microbe Interact. 10:933-937); y el promotor que responde al ácido abscísico de la hormona del estrés (Sheen (1996) Science 274:1900-1902).

Los ácidos nucleicos que se describen en este documento pueden también estar operativamente unidos a promotores vegetales que son inducibles tras la exposición a reactivos químicos que pueden aplicarse a la planta, tales como herbicidas o antibióticos. Por ejemplo, se puede usar el promotor In2-2 de maíz, activado por herbicidas de bencenosulfonamida (De Veylder (1997) Plant Cell Physiol. 38:568-577); la aplicación de diferentes herbicidas induce distintos patrones de expresión génica, incluida la expresión en la raíz, hidátodos y meristemo apical del brote. Las secuencias codificantes pueden estar bajo el control, p. ej., de un promotor inducible de tetraciclina, p. ej., como se describe con plantas de tabaco transgénico que contienen el gen de arginina descarboxilasa *Avena sativa* L. (avena) (Masgrau (1997) Plant J. 11:465-473); o un elemento que responde al ácido salicílico (Stange (1997) Plant J. 11:1315-1324). Usando promotores inducidos químicamente (p. ej., por hormonas o pesticidas), es decir, promotores que responden a una sustancia química que puede aplicarse a la planta transgénica en el campo, la expresión de un polipéptido descrito en el presente documento se puede inducir en una etapa particular del desarrollo de la planta. Se describen plantas transgénicas que contienen un gen inducible para los polipéptidos descritos en este documento, cuyo rango de hospedante está limitado a especies vegetales diana, tales como maíz, arroz, cebada, trigo, patata u otros granos, inducibles en cualquier etapa del desarrollo del grano.

Los promotores de plantas específicos de tejido pueden promover la expresión de secuencias operativamente unidas en tejidos distintos al tejido diana. Por lo tanto, un promotor específico de tejido es uno que promueve la expresión preferencialmente en el tejido o tipo de célula diana, pero que también puede impulsar cierta expresión en otros tejidos.

Los ácidos nucleicos descritos en este documento pueden también estar operativamente unidos a promotores de plantas que son inducibles tras la exposición a reactivos químicos. Estos reactivos incluyen, p. ej., herbicidas, auxinas sintéticas o antibióticos que se pueden aplicar, p. ej., pulverizar en las plantas transgénicas. La expresión inducible de los ácidos nucleicos que producen hidrolasa descritos en la presente memoria permitirá al agricultor seleccionar plantas con la relación óptima de almidón:azúcar. El desarrollo de partes de la planta puede por lo tanto controlarse.

Se describen medios para facilitar la cosecha de plantas y partes de la planta. Por ejemplo, en diversas realizaciones, se usa el promotor In2-2 de maíz, activado por herbicidas de bencenosulfonamida (De Veylder (1997) Plant Cell Physiol. 38:568-577); la aplicación de diferentes herbicidas induce distintos patrones de expresión génica, incluida la expresión en la raíz, hidátodos y meristemo apical del brote. Las secuencias codificantes descritas en la presente invención también están bajo el control de un promotor inducible de tetraciclina, p. ej., como se describe con plantas de tabaco transgénicas que contienen el gen de arginina descarboxilasa *Avena sativa* L. (avena) (Masgrau (1997) Plant J. 11:465-473); o un elemento que responde a ácido salicílico (Stange (1997) Plant J. 11:1315-1324).

Si se desea una expresión de polipéptidos correcta, se debe incluir una región de poliadenilación en el extremo 3' de la región codificante. La región de poliadenilación puede derivar de un gen natural, de una diversidad de otros genes de plantas o de genes en el T.DNA de *Agrobacterial*.

Vectores de expresión y vehículos de clonación

Se describen vectores de expresión, casetes de expresión y vehículos de clonación que comprenden ácidos nucleicos, p. ej., secuencias que codifican hidrolasas y anticuerpos. Los vectores de expresión y los vehículos de clonación descritos en este documento pueden comprender partículas víricas, baculovirus, fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, fósidos, cromosomas artificiales bacterianos, DNA vírico (p. ej., virus variolovacunal, adenovirus, viruela aviar, pseudorrabia y derivados de SV40), cromosomas artificiales basados en P1, plásmidos de levadura, cromosomas de levadura artificiales y cualquier otro vector específico para hospedantes específicos de

interés (como bacillus, *Aspergillus* y levadura). Los vectores descritos en este documento pueden incluir secuencias de DNA cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas. El experto en la técnica conoce una gran serie de vectores adecuados que se comercializan. Los vectores ilustrativos incluyen:

- 5 bacterianos: vectores pQE (Qiagen), plásmidos pBLUESCRIPT™, vectores pNH, vectores (lambda-ZAP (Stratagene); ptrc99a, pKK223-3, pDR540, pRIT2T (Pharmacia); Eucariotas: pXTI, pSG5 (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, pSVLSV40 (Pharmacia). No obstante, se puede usar cualquier otro plásmido o vector siempre y cuando sea replicable y viable en el hospedante.

Se pueden emplear vectores de bajo número de copias o de alto número de copias.

- 10 Un "casete de expresión" descrito en este documento comprende una secuencia de nucleótidos capaz de efectuar la expresión de un gen estructural (es decir, una secuencia codificante de proteína, tal como una hidrolasa descrita en el presente documento) en un hospedante compatible con dichas secuencias. Los casetes de expresión incluyen por lo menos un promotor operativamente unido a la secuencia que codifica el polipéptido; y, opcionalmente, con otras secuencias, p. ej., señales de terminación de transcripción. También se pueden emplear factores adicionales necesarios o útiles para efectuar la expresión, p. ej., potenciadores. "Operativamente unido", tal como se emplea en la presente memoria, se refiere a una unión de un promotor en dirección 5' de una secuencia de DNA de forma tal que el promotor medie en la transcripción de la secuencia de DNA. Por consiguiente, los casetes de expresión también incluyen plásmidos, vectores de expresión, virus recombinantes, cualquier forma de vector de "DNA desnudo" recombinante y similar. Un "vector" comprende un ácido nucleico que puede infectar, transfectar, transducir transitoria o permanentemente una célula. Se reconocerá que un vector puede ser un ácido nucleico desnudo, o un ácido nucleico que forma complejo con proteína o lípido. El vector opcionalmente comprende ácidos nucleicos víricos o bacterianos y/o proteínas, y/o membranas (p. ej., una membrana celular, una envoltura de lípidos vírica, etc.). Los vectores incluyen, aunque sin limitarse a ello, replicones (p. ej., replicones de RNA, bacteriófagos) a los cuales se pueden unir fragmentos de DNA y replicarse. Los vectores incluyen, por lo tanto, aunque sin limitarse a ello, RNA, DNA o RNA circular o lineal de autorreplicación autónomo (p. ej., plásmidos, virus y similares, véase, p. 25 ej., la patente de Estados Unidos núm. 5.217.879), e incluyen tanto plásmidos de expresión como sin expresión. Si se describe que un microorganismo recombinante o cultivo celular hospeda un "vector de expresión", esto incluye tanto DNA como DNA circular y lineal extra-cromosómico que se ha incorporado al cromosoma(s) hospedante(s). Si un vector está siendo mantenido por una célula hospedante, el vector puede o bien ser replicado establemente por las células durante la mitosis como una estructura autónoma, o incorporarse dentro del genoma del hospedante.
- 30 El vector de expresión puede comprender un promotor, un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de transcripción. El vector puede también incluir secuencias apropiadas para ampliar la expresión. Los vectores de expresión de mamíferos pueden comprender un origen de replicación, cualquier sitio de unión al ribosoma necesario, un sitio de poliadenilación, donante de empalme y sitios aceptores, secuencias de terminación de transcripción y secuencias no transcritas flanqueantes 5'. En algunos aspectos, se pueden usar secuencias de DNA derivadas del empalme SV40 y sitios de poliadenilación para proveer los elementos genéticos no transcritos requeridos.

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

- 45 Los vectores para expresar el polipéptido o su fragmento en células eucariotas pueden también contener potenciadores que aumenten los niveles de expresión. Los potenciadores son elementos de DNA de acción cis, usualmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 bp de longitud, que actúan sobre un promotor para aumentar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador SV40 en el lado tardío del origen de replicación bp 100 a 270, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación y los potenciadores de adenovirus.

- 50 Se puede insertar una secuencia de DNA en un vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, la secuencia de DNA está ligada a la posición deseada en el vector después de la digestión del inserto y el vector con endonucleasas de restricción apropiadas. Alternativamente, se pueden ligar extremos truncados tanto en el inserto como en el vector. Se conoce en la industria una diversidad de técnicas de clonación, p. ej., como se describe en Ausubel and Sambrook. Dichos procedimientos y otros se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica.

- 55 El vector puede tener forma de plásmido, partícula vírica o fago. Otros vectores incluyen secuencias de DNA cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, derivados de SV40; plásmidos bacterianos, DNA de fago, baculovirus, plásmidos de levadura, vectores derivados de combinaciones de plásmidos y DNA de fago, DNA vírico tal como virus variolovacunal, adenovirus, virus de la viruela aviar y pseudorrabia. Sambrook, p. ej., describe una diversidad de vectores de clonación y expresión para uso con hospedantes procariotas y eucariotas. Los vectores bacterianos

particulares que se pueden utilizar incluyen los plásmidos que se comercializan y que comprenden elementos genéticos del vector de clonación conocido pBR322 (ATCC 37017), pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia), GEMI™ (Promega Biotec, Madison, WI, EE. UU.) pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pDIO, psiX174 Pbluescript II KS™, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A (Stratagene), ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, DR540, pRIT5 (Pharmacia), pKK232-8 y pCM7. Los vectores eucariotas particulares incluyen pSV2CAT, pOG44, pXTI, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL (Pharmacia).

No obstante, se puede usar cualquier otro vector siempre y cuando sea replicable y viable en la célula hospedante.

Los ácidos nucleicos descritos en este documento pueden expresarse en casetes de expresión, vectores o virus, y expresarse de forma transitoria o estable en semillas o células vegetales. Un sistema de expresión transitoria ilustrativo usa sistemas de expresión episomales, p. ej., RNA vírico del virus mosaico de coliflor (CaMV) generado en el núcleo por transcripción de un minicromosoma episomal que contiene DNA superenrollado, véase, p. ej., Covey (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1633-1637. Alternativamente se pueden insertar secuencias codificantes, es decir, todas o subfragmentos de las secuencias aquí descritas en un genoma de célula hospedante vegetal, convirtiéndose en una parte integral del DNA cromosómico hospedante. De este modo, se pueden expresar transcritos sentido o antisentido.

Un vector que comprende las secuencias (p. ej., regiones codificantes o promotores) de los ácidos nucleicos descritos en este documento puede comprender un gen marcador que confiere un fenotipo seleccionable en una semilla o célula vegetal. Por ejemplo, el marcador puede codificar resistencia a biocida, particularmente resistencia a antibióticos, como resistencia a kanamicina, G418, bleomicina, higromicina o herbicida, tal como resistencia a clorosulfuron o Basta.

Los vectores de expresión capaces de expresar ácidos nucleicos y proteínas en las plantas se conocen en la técnica e incluyen, p. ej., vectores de especie *Agrobacterium*, virus de patata X (véase, p. ej., Angell (1997) EMBO J. 16:3675-3684), virus mosaico de tabaco (véase, p. ej., Casper (1996) Gene 173:69-73), virus del enanismo arbustivo del tomate (véase, p. ej., Hillman (1989) Virology 169:42-50), virus del grabado del tabaco (véase, p. ej., Dolja (1997) Virology 234:243-252), virus del mosaico amarillo dorado del frijol (véase, p. ej., Morinaga (1993) Microbiol Immunol. 37:471-476), virus mosaico de coliflor (véase, p. ej., Cecchini (1997) Mol. Plant Microbe Interact 10:1094-1101), elemento de transposición Ac/Ds en el maíz (véase, p. ej., Rubin (1997) Mol. Cell. Biol. 17:6294-6302; Kunze (1996) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 204:161-194) y elemento de transposición mutador-supresor (Spm) en el maíz (véase, p. ej., Schlappi (1996) Plant Mol. Biol. 32:717-725); y sus derivados.

En un aspecto, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación para permitir que se mantenga en dos organismos, por ejemplo en células mamíferas, de levadura, fúngicas o de insecto para expresión y en un hospedante procarionta para clonación y ampliación. Asimismo, para integrar vectores de expresión, el vector de expresión puede contener por lo menos una secuencia homóloga al genoma de la célula hospedante. Puede contener dos secuencias homólogas que flanquean el constructo de expresión. El vector integrante puede dirigirse a un locus específico en la célula hospedante, seleccionando la secuencia homóloga apropiada para inclusión en el vector. Los constructos para integrar vectores se conocen en la técnica.

Los vectores de expresión descritos en el presente documento pueden también incluir un gen marcador seleccionable para permitir la selección de cepas bacterianas que han sido transformadas, p. ej., genes que tornan las bacterias resistentes a fármacos tales como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, neomicina y tetraciclina. Los marcadores seleccionables pueden además incluir genes biosintéticos, tales como aquellos en las rutas biosintéticas de histidina, triptófano y leucina.

Células hospedantes y células transformadas

Se describen células transformadas que comprenden una secuencia de ácido nucleico, p. ej., una secuencia que codifica una hidrolasa o un anticuerpo, o un vector descrito en este documento. La célula hospedante puede ser cualquiera de las células hospedantes familiares para los expertos en la técnica, incluidas células procariotas, células eucariotas, tales como células bacterianas, células fúngicas, células de levadura, células mamíferas, células de insecto o células vegetales.

Las enzimas que se describen en este documento pueden expresarse en cualquier célula hospedante, p. ej., cualquier célula bacteriana, cualquier célula de levadura, cualquier especie de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*, cualquier especie de *Pichia*, p. ej., *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*. Las células bacterianas ilustrativas incluyen cualquier especie de *Streptomyces* o *Bacillus*, p. ej., *E. coli*, *Lactococcus lactis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* o cualquier especie dentro de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*. Las células de insecto ilustrativas incluyen *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*. Las células animales ilustrativas incluyen CHO, COS o melanoma Bowes o cualquier línea celular de ratón o humana. La selección de un hospedante apropiado está dentro de las aptitudes de los expertos en la técnica. Las técnicas para transformar una amplia diversidad de especies de plantas superiores se conocen y se describen en la bibliografía técnica y científica, véanse, p. ej., Weising (1988) Ann. Rev. Genet. 22:421-477, patente de Estados Unidos núm. 5.750.870.

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

5 Cuando sea apropiado, las células hospedantes modificadas podrán cultivarse en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para activar promotores, seleccionar transformantes, ampliar los genes descritos en este documento. Después de la transformación de una cepa hospedante adecuada y del crecimiento de la cepa hospedante hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado puede inducirse por medios apropiados (p. ej., cambio de temperatura o inducción química) y las células pueden cultivarse por un periodo adicional que les permita producir el polipéptido deseado o su fragmento.

10 En un aspecto, los ácidos nucleicos o vectores descritos en la presente invención se introducen en las células para cribado, por lo tanto, los ácidos nucleicos ingresan en las células en un modo adecuado para subsiguiente expresión del ácido nucleico. El método de introducción está en gran medida gobernado por el tipo de célula dirigido. Los métodos ilustrativos incluye precipitación con CaPO_4 , fusión de liposomas, lipofección (p. ej., LIPOFECTIN™), electroporación, infección vírica, etc. Los ácidos nucleicos candidatos pueden integrarse establemente al genoma de la célula hospedante (por ejemplo, con introducción retroviral) o pueden existir o bien transitoria o establemente en el citoplasma (es decir, a través del uso de plásmidos tradicionales, empleando secuencias reguladoras estándar, marcadores de selección, etc.). Se describen vectores retrovirales capaces de transfectar dichas dianas (p. ej., células mamíferas, humanas) porque, p. ej., muchos estudios farmacéuticamente importantes requieren dianas de células mamíferas modelo o humanas.

15 Las células pueden recogerse por centrifugación, romperse con medios físicos o químicos, y se retiene el extracto bruto resultante para posterior purificación. Las células microbianas empleadas para expresión de proteínas pueden romperse con cualquier método conveniente, incluidos congelación y deshielo, ciclización, sonicación, ruptura mecánica o uso de agentes para lisado celular. Los expertos en la técnica conocen bien dichos métodos. El polipéptido expresado o su fragmento puede recuperarse y purificarse de los cultivos celulares recombinantes por métodos que incluyen sulfato de amonio o precipitación de etanol, extracción de ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. Se pueden usar etapas de repliegue de proteínas, según sea necesario, para completar la configuración del polipéptido. Si se desea, se puede emplear cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para las etapas de purificación finales.

20 Se pueden emplear también varios sistemas de cultivo celular de mamíferos para expresar la proteína recombinante. Los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono y otras líneas celulares capaces de expresar proteínas a partir de un vector compatible, tal como las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK.

35 Los constructos en las células hospedantes se pueden usar en un modo convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Dependiendo del hospedante empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos producidos por las células hospedantes que contienen el vector pueden glucosilarse o no glucosilarse. Los polipéptidos descritos en el presente documento pueden o no incluir además un residuo de aminoácido de metionina inicial.

40 También se pueden emplear sistemas de traducción libres de células para producir un polipéptido descrito en este documento. Los sistemas de traducción libres de células pueden emplear mRNA transcritos de un constructo de DNA que comprenden un promotor operativamente unido a un ácido nucleico que codifica el polipéptido o su fragmento. En algunos aspectos, el constructo de DNA puede linealizarse antes de llevar a cabo una reacción de transcripción *in vitro*. El mRNA transcrito se incuba luego con un extracto apropiado de traducción libre de células, tal como un extracto de reticulocito de conejo, para producir el polipéptido deseado o su fragmento.

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

Ampliación de ácidos nucleicos

50 Se describen ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos o ácidos nucleicos modificados, que se pueden producir, p. ej., por ampliación. Se describen pares de cebadores de ampliación para ampliar ácidos nucleicos que codifican una hidrolasa, p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, en donde los pares de cebadores son capaces de ampliar secuencias de ácido nucleico descrito en este documento. El experto en la técnica puede diseñar pares de secuencias de cebadores de ampliación para cualquier parte o para toda la longitud de estas secuencias.

55 Las reacciones de ampliación también se pueden utilizar para cuantificar la cantidad de ácido nucleico en una muestra (tal como la cantidad de mensaje en una muestra celular), etiquetar el ácido nucleico (p. ej., para aplicarlo a una ordenación o técnica de transferencia de solutos por electroforesis), detectar el ácido nucleico o cuantificar la

cantidad de un ácido nucleico específico en una muestra. Como se describe en el presente documento, el mensaje aislado de una célula o genoteca de cDNA se amplía. El experto en la materia puede seleccionar y diseñar cebadores adecuados para ampliación de oligonucleótidos. Los métodos de ampliación también se conocen en la técnica e incluyen, p. ej., reacción en cadena de la polimerasa, PCR (véanse, p. ej., PCR PROTOCOLS, A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS, ed. Innis, Academic Press, N.Y. (1990) y PCR STRATEGIES (1995), ed. Innis, Academic Press, Inc., N.Y., reacción en cadena de ligasa (LCR) (véanse, p. ej., Wu (1989) Genomics 4:560; Landegren (1988) Science 241:1077; Barringer (1990) Gene 89:117); ampliación por transcripción (véanse, p. ej., Kwok (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173); y replicación de secuencias autosostenidas (véase, p. ej., Guatelli (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874); ampliación de Q Beta replicasa (véase, p. ej., Smith (1997) J. Clin. Microbiol. 35:1477-1491), ensayo de ampliación de Q-beta replicasa automatizado (véase, p. ej., Burg (1996) Mol. Cell. Probes 10:257-271) y otras técnicas mediadas por RNA polimerasa (p. ej., NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario); véanse también Berger (1987) Methods Enzymol. 152:307-316; Sambrook; Ausubel; patentes de Estados Unidos núm. 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan (1995) Biotechnology 13:563-564.

Se describen pares de cebadores de ampliación que comprenden las secuencias descritas en este documento, por ejemplo, en donde el par de cebadores comprende un primer miembro que tiene una secuencia expuesta alrededor del primero (5') 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 o más residuos de un ácido nucleico descrito en este documento, y un segundo miembro que tiene una secuencia expuesta alrededor del primero (5') 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 o 40 o más residuos de la cadena complementaria del primer miembro.

Determinación del grado de identidad de secuencia

Se describen ácidos nucleicos que tienen por lo menos un ácido nucleico o identidad de secuencia completa (100%) con el ácido nucleico descrito en este documento, p. ej., un ácido nucleico ilustrativo descrito en este documento (p. ej., que tiene una secuencia expuesta en la SEC ID NÚM:1, SEC ID NÚM:3, SEC ID NÚM:5, SEC ID NÚM:7, SEC ID NÚM:9, SEC ID NÚM:11, SEC ID NÚM:13, SEC ID NÚM:15, SEC ID NÚM:17, SEC ID NÚM:19, SEC ID NÚM:22 o SEC ID NÚM:23, o SEC ID NÚM:1 modificada para codificar, una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (varias) o todas las variaciones de bases que se describen en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, o su equivalente); y polipéptidos que tienen por lo menos 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, o identidad de secuencia completa (100%), con un polipéptido descrito en este documento, p. ej., un polipéptido ilustrativo que tiene una secuencia expuesta en la SEC ID NÚM:2, SEC ID NÚM:4, SEC ID NÚM:6, SEC ID NÚM:8, SEC ID NÚM:10, SEC ID NÚM:12, SEC ID NÚM:14, SEC ID NÚM:16, SEC ID NÚM:18 o SEC ID NÚM:20 o SEC ID NÚM:2 que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (varias) o todas las variaciones de aminoácidos descritas en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, o su equivalente. En aspectos alternativos, la identidad de secuencia puede ser en una región de por lo menos aproximadamente 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o más residuos consecutivos, o la longitud total del ácido nucleico o polipéptido. El grado de identidad de la secuencia (homología) puede determinarse usando cualquier programa de ordenador y parámetros asociados, incluidos aquellos descritos en este documento, tales como BLAST 2.2.2. o FASTA versión 3.0t78, con los parámetros predeterminados. Tal como se emplean en este documento, los términos "ordenador", "programa de ordenador" y "procesador" se utilizan en sus contextos generales más amplios e incorporan a todos esos dispositivos, como se describe en detalle a continuación. La siguiente tabla describe características seleccionadas de ácidos nucleicos representativos y polipéptidos descritos en este documento, incluida una comparación de identidad de secuencia de las secuencias ilustrativas con las bases de datos públicas para identificar la actividad de enzimas descritas en este documento por análisis de homología (identidad de secuencia). Todas las secuencias descritas en la tabla (todas las secuencias ilustrativas descritas en este documento) se han sometido a búsqueda BLAST (como se describe en detalle a continuación) contra dos conjuntos de bases de datos. La primera base de datos está disponible a través del Centro Nacional para Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information o NCBI). Todos los resultados de las búsquedas contra estas bases de datos se hallan en las columnas tituladas "Descripción NR", "Código acceso NR", "Valor E de NR" u "Organismo de NR". "NR" se refiere a la base de datos de nucleótidos no redundantes mantenida por NCBI. Esta base de datos es un compuesto de GenBank, actualizaciones de GenBank y actualizaciones de EMBL. Las entradas en la columna "Descripción de NR" se refieren a la línea de definición en un registro NCBI determinado, que incluye una descripción de la secuencia, tal como el organismo fuente, nombre del gen/nombre de la proteína o alguna descripción de la función de la secuencia – identificando así una actividad de las enzimas ilustrativas enumeradas descritas en este documento por análisis de homología (identidad de secuencia). Las entradas en la columna "Código de acceso NR" se refieren al único identificador dado a un registro de secuencias. Las entradas en la columna "Valor E de NR" se refieren al valor esperado (Evalue), que representa la probabilidad de un puntaje de alineación tan bueno como el que se encuentra entre la secuencia problema (*query*) (las secuencias que se describen en el presente documento) y una secuencia de la base de datos se encontraría en el mismo número de comparaciones entre secuencia aleatorias como se hizo en la presente búsqueda BLAST. Las entradas en la columna "Organismo NR" se refieren al organismo fuente de la secuencia identificada como el hit (secuencia similar BLAST (homología de secuencia) más próximo. El segundo conjunto de bases de datos se conoce colectivamente como la base de datos GENESEQ™, disponible a través de

Thomson Derwent (Filadelfia, PA). Todos los resultados de las búsquedas contra esta base de datos se encuentran en las columnas tituladas "Descripción de proteína GENESEQ™", "Código acceso de proteína GENESEQ™", "Valor E de proteína GENESEQ™", "Descripción de DNA GENESEQ™", "Código de Acceso DNA GENESEQ™" o "Valor E DNA GENESEQ™". La información que se encuentra en estas columnas es comparable con la información que se encuentra en las columnas NR anteriormente descritas, excepto que deriva de búsquedas BLAST contra la base de datos GENESEQ™ en lugar de las bases de datos NCBI. Las columnas "Longitud DNA problema" y "Longitud proteína problema" se refieren al número de nucleótidos o el número de aminoácidos, respectivamente, en la secuencia descrita en este documento que se buscó o investigó contra las bases de datos o bien NCBI o GENESEQ™. Las columnas "GENESEQ™ o Longitud DNA NR" y "GENESEQ™ o Longitud proteína NR" se refieren al número de nucleótidos o el número de aminoácidos, respectivamente, en la secuencia de la mayor correspondencia de la búsqueda BLAST. Los resultados provistos en estas columnas provienen de la búsqueda que retornó al Valor E inferior, o bien de las bases de datos NCBI o de la base de datos Geneseq. Las columnas "GENESEQ™/NR % ID proteína" y "GENESEQ™ /NR % ID DNA" se refieren al porcentaje de identidad de secuencia entre la secuencia descrita en este documento y la secuencia de la mejor correspondencia de BLAST. Los resultados provistos en estas columnas provienen de la búsqueda que retornó del valor E inferior o bien de las bases de datos E, las bases de datos NCBI o de la base de datos GENESEQ™.

SEC ID NÚM:	Descripción NR	Código de acceso NR	Valor E NR	Organismo NR	Descripción proteína Geneseq	Código acceso proteína Geneseq	Valor E proteína Geneseq	Descripción DNA Geneseq	Código de acceso DNA Geneseq	Valor E DNA Geneseq	Geneseq/ NR %ID DNA
1, 2	Proteína hipotética Sala_0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 proteína hipotética conservada [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	103485777	7.00E-40	Sphingopyxis alaskensis RB2256	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64879	1.00E-127	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64878	0	
3, 4	Proteína hipotética Sala_0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 proteína hipotética conservada [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	103485777	2.00E-40	Sphingopyxis alaskensis RB2256	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64879	3.00E-39	Proteína codificada por gen esencial procariota #30232.	ACA26233	1.8	
5, 6	Proteína hipotética Sala_0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 proteína hipotética conservada [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	103485777	8.00E-42	Sphingopyxis alaskensis RB2256	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64879	3.00E-39	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64878	0.53	
7, 8	Proteína hipotética Sala_0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 proteína hipotética conservada [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	103485777	1.00E-46	Sphingopyxis alaskensis RB2256	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM NO: 2.	AQZ64879	7.00E-44	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64878	1.00E-04	
9, 10	Proteína hipotética Sala_0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 proteína hipotética conservada [Sphingopyxis alaskensis RB2256]	103485777	3.00E-51	Sphingopyxis alaskensis RB2256	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64879	2.00E-42	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64878	1.00E-07	

SEC ID NÚM:	Descripción NR	Código de acceso NR	Valor E NR	Organismo NR	Descripción proteína Geneseq	Código acceso proteína Geneseq	Valor E proteína Geneseq	Descripción DNA Geneseq	Código de acceso DNA Geneseq	Valor E DNA Geneseq	Geneseq/ NR %ID DNA
11, 12	Proteína hipotética SKA58J7128 [Sphingomonas sp. SKA58] gi 94422701 gb EAT07736.1 proteína hipotética SKA58_17128 [Sphingomonas sp. SKA58]	94497812	4.00E-46	Sphingomonas sp. SKA58	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64879	3.00E-42	Proteína diagnóstica y terapéutica humana SEC ID NÚM: 2739.	ACN41328	1.6	
13, 14	Proteína hipotética PPS1R1_24779 [Plesiocystis pacifica SIR-1] gi 149817999 g b EDM77458.1 proteína hipotética PPSIR1_24779 [Plesiocystis pacifica SIR-1]	14992112	3.00E-32	Plesiocystis pacifica SIR-1	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQG53993	1.00E-155	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQG53992	0	
15, 16	Lipasa [Streptomyces avermitilis MA- 4680] gi 29607114 dbj BAC71173.1 lipasa putativa [Streptomyces avermitilis MA- 4680]	29830004	1.00E-100	Streptomyces avermitilis MA- 4680	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64645	5.00E-21	M. xanthus protein sequence, seq id 9726.	ACL64205	0.003	
17, 18	Proteína hipotética bir2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA110] gi 27351136 dbj BAC48144.1 bir2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA110]	27377990	1.00E-115	Bradyrhizobium japonicum mUSDA 110	Proteína antígeno micobacteriano mycobacterium tuberculosis SEC ID NÚM: 5.	ABM15916	8.00E-48	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64878	1.00E-05	
19, 20	Proteína hipotética bir2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA110] gi 27351136 dbj BAC48144.1 bir2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA110]	27377990	1.00E-118	Bradyrhizobium japonicum USDA 110	Proteína antígeno micobacteriano mycobacterium tuberculosis SEC ID NÚM: 5.	ABM15916	1.00E-44	Péptido que expresa actividad de hidrolasa SEC ID NÚM: 2.	AQZ64878	2.00E-04	

SEC ID NÚM:	Descripción NR					Longitud DNA problema	Longitud proteína problema	Longitud DNA Geneseq/NR	Longitud proteína Geneseq/NR	Geneseq/NR %ID Proteína	Geneseq/NR %ID DNA
1, 2	proteína hipotética Sala 0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 proteína hipotética conservada [Sphingopyxis alaskensis RB2256]					684	227	684	227		
3, 4	proteína hipotética Sala 0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 proteína hipotética conservada [Sphingopyxis alaskensis RB2256]					633	210	0	249	47	
5, 6	proteína hipotética Sala 0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 proteína hipotética conservada [Sphingopyxis alaskensis RB2256]					711	236	0	249	42	
7, 8	proteína hipotética Sala 0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 proteína hipotética conservada [Sphingopyxis alaskensis RB2256]					669	222	0	249	46	
9, 10	proteína hipotética Sala 0282 [Sphingopyxis alaskensis RB2256] gi 98975854 gb ABF52005.1 proteína hipotética conservada [Sphingopyxis alaskensis RB2256]					669	222	0	249	48	
11, 12	proteína hipotética SKA58 17128 [Sphingomonas sp. SKA58] gi 94422701 gb EAT07736.1 proteína hipotética SKA58_17128 [Sphingomonas sp. SKA58]					570	189	0	298	46	
13, 14	proteína hipotética PPSIR1 24779 [Plesiocystis pacifica SIR-1J gi 149817999 gb EDM77458.1 proteína hipotética PPSIR1_24779 [Plesiocystis pacifica SIR-11]					807	268	807	268		
15, 16	lipase [Streptomyces avermitilis MA-4680] gi 29607114 dbj BAC71173.11 putative lipase [Streptomyces avermitilis MA-4680]					804	267	0	286	69	
17, 18	proteína hipotética blr2879 (Bradyrhizobium japonicum USDA 110) gi 27351136 dbj BAC48144.1 blr2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]					798	265	0	266	79	
19, 20	proteína hipotética blr2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110] gi 27351136 dbj BAC48144.1 blr2879 [Bradyrhizobium japonicum USDA 110]					798	265	0	266	79	

Las secuencias homólogas también incluyen secuencias de RNA en las que las uridinas reemplazan a las timinas en las secuencias de ácido nucleico. Las secuencias homólogas pueden obtenerse usando cualquiera de los procedimientos descritos en esta memoria o pueden resultar de la corrección de un error de secuenciación. Se ha de apreciar que el ácido nucleico expuesto en este documento puede representarse en el formato de un solo carácter tradicional (véase, p. ej., Stryer, Lubert. *Biochemistry*, 3ª Ed., W. H Freeman & Co., New York) o en cualquier otro formato que registre la identidad de los nucleótidos en una secuencia.

Diversos programas de comparación de secuencias identificados en este documento y conocidos por el experto en la técnica se pueden usar para comparación de secuencias. Las identidades de secuencia de proteína y/o ácido nucleico (homologías) pueden evaluarse usando cualquiera de una diversidad de algoritmos y programas para comparación de secuencias conocidos en la técnica. Dichos algoritmos y programas incluyen, aunque sin limitarse a ello, TBLASTN, BLASTP, FASTA, TFASTA y CLUSTALW (Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(8):2444-2448, 1988; Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410, 1990; Thompson et al., *Nucleic Acids Res.* 22(2):4673-4680, 1994; Higgins et al., *Methods Enzymol.* 266:383-402, 1996; Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215(3):403-410, 1990; Altschul et al., *Nature Genetics* 3:266-272, 1993).

La homología o identidad se puede medir usando un software de análisis de secuencia (p. ej., Sequence Analysis Software Package of the Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Dicho software combina secuencias similares asignando grados de homología a diversas eliminaciones, sustituciones y otras modificaciones. Los términos "homología" e "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o polipéptidos, se refiere a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima en una ventana de comparación o región designada según lo medido usando cualquier número de algoritmos de comparación de secuencias o por alineación manual e inspección visual. Para comparación de secuencias, una secuencia puede actuar como una secuencia de referencia (p. ej., una secuencia de ácido nucleico o polipéptido ilustrativa descrita en la presente invención) con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Se pueden usar los parámetros predeterminados del programa, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula luego el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de prueba en relación con la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa.

Una "ventana de comparación", tal como se emplea en esta memoria, incluye referencia a un segmento de uno cualquiera de los números de residuos contiguos. Por ejemplo, en aspectos alternativos, los residuos contiguos, que oscilan entre 20 y la longitud total de una secuencia de polipéptidos o ácidos nucleicos ilustrativa, se comparan con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinear de manera óptima las dos secuencias. Si la secuencia de referencia tiene la identidad de secuencia de requisito a una secuencia ilustrativa de ácidos nucleicos o polipéptidos, p. ej., en aspectos alternativos, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o la identidad de secuencia completa (100%) a una secuencia ilustrativa de ácidos nucleicos o polipéptidos descritos en esta memoria, esa secuencia está dentro del alcance de la presente invención. Las subsecuencias oscilan entre aproximadamente 20 a 600, aproximadamente 50 a 200, y aproximadamente 100 a 150 se comparan con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias están óptimamente alineadas. Los métodos de alineación de secuencias para comparación se conocen en la técnica. La alineación óptima de secuencias para comparación se puede realizar, p. ej., con el algoritmo de homología local de Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981, con el algoritmo de alineación de homología de Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, con la búsqueda para el método de similitud de Person & Lipman, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, con implementaciones computarizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o con alineación manual e inspección visual. Otros algoritmos para determinar homología o identidad incluyen, por ejemplo, además de un programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Herramienta de búsqueda de alineación local básica), en National Center for Biological Information, ALIGN, AMAS (Analysis of Multiply Aligned Sequences) (Análisis de múltiples secuencias alineadas), AMPS (Protein Multiple Sequence Alignment) (Alineación de múltiples secuencias de proteínas), ASSET (Aligned Segment Statistical Evaluation Tool) (Herramienta de evaluación estadística de segmentos alineados), BANDS, BESTSCOR, BIOSCAN (Biological Sequence Comparative Analysis Node) (Nodo de análisis comparativo de secuencias biológicas), BLIMPS (BLOCKS IMPROVED SEARCHER) (Buscador mejorado de bloques), FASTA, Intervals & Points, BMB, CLUSTAL V, CLUSTAL W, CONSENSUS, LCONSENSUS, WCONSENSUS, algoritmo Smith-Waterman, DARWIN, algoritmo Las Vegas, FNAT (Forced Nucleotide Alignment Tool) (Herramientas de alineación de nucleótidos forzados), Framealign, Framesearch, DYNAMIC, FILTER, FSAP (Fristensky Sequence Analysis Package) (Paquete de análisis de secuencias Fristensky), GAP (Global Alignment Program) (Programa de alineación global), GENAL, GIBBS, GenQuest, ISSC (Sensitive Sequence Comparison) (Comparación de secuencias sensibles), LALIGN (Local Sequence Alignment) (Alineación de secuencias locales), LCP (Local Content Program) (Programa de contenidos locales), MACAW (Multiple Alignment Construction & Analysis Workbench) (Escritorio de construcción y análisis de

múltiples alineaciones), MAP (Multiple Alignment Program) (Programa de múltiples alineaciones), MBLKP, MBLKN, PIMA (Pattern-Induced Multi-sequence Alignment) (Alineación de múltiples secuencias inducida por patrones), SAGA (Sequence Alignment by Genetic Algorithm) (Alineación de secuencias por algoritmo genético) y WHAT-IF. Dichos programas de alineación pueden también utilizarse para estudiar bases de datos de genomas a fin de identificar secuencias de polinucleótidos que tiene secuencias sustancialmente idénticas. Un número de bases de datos de genomas están disponibles, por ejemplo, una porción sustancial del genoma humano está disponible como parte del Proyecto de Secuenciación del Genoma Humano (Human Genome Sequencing Project) (Gibbs, 1995). Se han secuenciado diversos genomas, p. ej., *M. genitalium* (Fraser et al., 1995), *M. jannaschii* (Bult et al., 1996), *H. influenzae* (Fleischmann et al., 1995), *E. coli* (Blattner et al., 1997) y levadura (*S. cerevisiae*) (Mewes et al., 1997), y *D. melanogaster* (Adams et al., 2000). También se ha avanzado mucho en la secuenciación de genomas de organismos modelo, tales como ratón, *C. elegans* y *Arabidopsis*. Las bases de datos que contienen información genómica anotada con alguna información funcional son mantenidas por distintas organizaciones, y son accesibles en internet.

También se utilizan los algoritmos BLAST, BLAST 2.0 y BLAST 2.2.2. Se describen, p. ej., en Altschul (1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402; Altschul (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. El software para realizar análisis BLAST está públicamente disponible a través de National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica primero identificar pares de secuencias con alto puntaje (high scoring sequence pairs o HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que o bien se correspondan o alcancen algún puntaje T umbral de valor positivo cuando se alineen con una palabra de la misma longitud en la secuencia de la base de datos. Con T se hace referencia al umbral de puntaje de la palabra vecina (Altschul (1990) supra). Estos hits de palabras vecinas iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas a fin de encontrar HSP más largos que las contengan. Los hits de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia siempre hasta tan lejos como pueda incrementarse el puntaje de alineación acumulativo. Los puntajes acumulativos se calculan usando, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntaje de recompensa para un par de residuos compatibles; siempre >0). Para secuencias de aminoácidos, se usa una matriz de puntaje para calcular el puntaje acumulativo. La extensión de los hits de palabras en cada dirección se interrumpen cuando: el puntaje de alineación acumulativo cae por X cantidad de su valor máximo obtenido; el puntaje acumulativo pasa a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de residuos con puntaje negativo; o se alcanza el final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W , T y X determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) usa como predeterminada una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$ y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como predeterminada una longitud de palabra de 3 y expectativas (E) de 10, y la matriz de puntaje BLOSUM62 (véase Henikoff & Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M=5$, $N=-4$, y una comparación de ambas cadenas. El algoritmo BLAST también efectúa un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej., Karlin & Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873). Una medida de similitud provista por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña ($P(N)$), que provee una indicación de la probabilidad mediante la cual una correspondencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de prueba al ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, o alternativamente menor que aproximadamente 0,01, o alternativamente menor que aproximadamente 0,001.

En un aspecto, las homologías de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos se evalúan usando Basic Local Alignment Search Tool ("BLAST"). Por ejemplo, se pueden usar cinco programas BLAST específicos para efectuar la siguiente tarea: (1) BLASTP y BLAST3 comparan una secuencia problema de aminoácidos contra una base de datos de secuencias de proteínas; (2) BLASTN compara una secuencia problema de nucleótidos contra una base de datos de secuencias de nucleótidos; (3) BLASTX compara los productos de traducción conceptuales de seis marcos de una secuencia problema de nucleótidos (ambas cadenas) contra una base de datos de secuencias de proteínas; (4) TBLASTN compara una secuencia problema de proteínas contra una base de datos de secuencias de nucleótidos traducidos en los seis marcos de lectura (ambas cadenas); y, (5) TBLASTX compara las traducciones de los seis marcos de una secuencia problema de nucleótidos contra las traducciones de la base de datos de secuencias de nucleótidos.

En un aspecto, los programas BLAST identifican secuencias homólogas identificando segmentos similares, que se denominan en este documento "pares de segmentos de alto puntaje", entre una secuencia de aminoácidos o ácidos nucleicos problema y una secuencia de prueba que se obtiene alternativamente de una secuencia de proteínas o ácido nucleico. Los pares de segmentos de alto puntaje se pueden identificar alternativamente (es decir, alinear) mediante una matriz de puntaje, de las que se conocen muchas en la técnica. En un aspecto, la matriz de puntaje utilizada es la matriz BLOSUM62 (Gonnet et al., Science 256:1443-1445, 1992; Henikoff and Henikoff, Proteins 17:49-61, 1993). En un aspecto, las matrices PAM o PAM250 también se pueden utilizar (véase, p. ej., Schwartz and Dayhoff, eds., 1978, Matrices for Detecting Distance Relationships: Atlas of Protein Sequence and Structure, Washington: National Biomedical Research Foundation).

En un aspecto, para determinar si un ácido nucleico tiene la identidad de secuencia que es requisito para estar dentro del alcance de la presente invención, se usa el programa NCBI BLAST 2.2.2, opciones predeterminadas para blastp. Hay aproximadamente 38 opciones de configuración en el programa BLAST 2.2.2. En este aspecto

ilustrativo, se usan todos los valores predeterminados excepto las configuraciones de filtro predeterminadas (es decir, todos los parámetros configurados como predeterminados excepto el filtro que se inactiva); en su lugar se usa la configuración “-F F”, que inhabilita el filtro. El uso del filtro predeterminado a menudo resulta en violaciones de Karlin-Altschul debido a la corta longitud de la secuencia.

- 5 Los valores predeterminados en este aspecto ilustrativo incluyen:

“Filtro para baja complejidad: activado

Tamaño de palabra: 3

Matriz: Blosum62

Costos de espacios: Existencia: 11

- 10 Extensión: 1”

Otras configuraciones predeterminadas son: filtro para baja complejidad inactivado, tamaño de palabra de 3 para proteína, matriz BLOSUM62, penalidad de existencia de espacio de -11 y una penalidad de extensión de espacio de -1. En un aspecto, la opción “-W” está predeterminada en 0. Esto significa que, si no se configura, el tamaño de palabra quedará predeterminado en 3 para proteínas y en 11 para nucleótidos.

- 15 Sistemas de ordenador y productos de programas de ordenador

Para determinar e identificar identidades de secuencias, homologías estructurales, motivos y similares *in silico*, la secuencia descrita en el presente documento puede guardarse, registrarse y manipularse en cualquier medio que se pueda leer y al que se pueda acceder con un ordenador. Se describen ordenadores, sistemas de ordenador, medios legibles de ordenador, productos de programas de ordenador y similares, que contienen (comprenden) registradas o guardadas las secuencias de ácido nucleico y los polipéptidos descritos en este documento. Tal como se emplean en esta memoria, los términos “registrar” y “guardar” se refieren a un proceso para guardar información en un medio de ordenador. El experto en la técnica puede adoptar fácilmente cualquier método conocido para registrar información en un medio de lectura de ordenador a fin de generar manufacturas que comprendan una o más de las secuencias de ácidos nucleicos y/o polipéptidos que se describen en esta invención.

- 25 Se describe un medio de lectura de ordenador que tiene registrada por lo menos una secuencia de ácidos nucleicos y/o polipéptidos descrita en este documento. Los medios de lectura de ordenador incluyen medios magnéticamente legibles, medios ópticamente legibles, medios electrónicamente legibles y medios magnéticos/ópticos. Por ejemplo, los medios de lectura de ordenador pueden ser un disco rígido, un disco diskette, una cinta magnética, CD-ROM, Digital Versatile Disk (DVD), Memoria RAM o Random Access Memory, o Memoria ROM o Read Only Memory ROM, como también otros tipos de medios conocidos por el experto en la materia.

- 35 Se describen sistemas (p. ej., sistemas basados en internet), particularmente sistemas de ordenador, que almacenan y manipulan las secuencias y la información de las secuencias descritas aquí. Un ejemplo de un sistema de ordenador 100 se ilustra en el diagrama de bloque de la Figura 1. Como se emplea en esta memoria, “un sistema de ordenador” se refiere a los componentes de hardware, componentes de software y componentes de almacenamiento de datos utilizados para analizar una secuencia de nucleótidos o polipéptidos descrita en este documento. El sistema de ordenador 100 puede incluir un procesador para procesar, acceder y manipular los datos de la secuencia. El procesador 105 puede ser cualquier tipo conocido de unidad procesadora central, tal como por ejemplo, Pentium III de Intel Corporation, o procesador similar de Sun, Motorola, Compaq, AMD o International Business Machines. El sistema de ordenador 100 es un sistema para propósitos generales que comprende el procesador 105 y uno o más componentes de almacenamiento de datos internos 110 para almacenar datos, y uno o más dispositivos de recuperación de datos para recuperar los datos almacenados en los componentes de almacenamiento de datos.

El experto en la técnica puede apreciar fácilmente que cualquiera de los sistemas de ordenador actualmente disponibles es adecuado.

- 45 En un aspecto, el sistema de ordenador 100 incluye un procesador 105 conectado a un canal que se conecta a una memoria principal 115 (alternativamente implementada como RAM) y uno o más dispositivos de almacenamiento de datos internos 110, tal como un disco rígido y/otro medio de lectura de ordenador que tiene datos registrados allí. El sistema de ordenador 100 puede además incluir uno o más dispositivos de recuperación de datos 118 para leer el registro de datos almacenado en los dispositivos de almacenamiento de datos internos 110. El dispositivo de recuperación de datos 118 puede representar, por ejemplo, un diskette, un disco compacto, una cinta magnética o un modem capaz de conectarse a un sistema de almacenamiento de datos remoto (p. ej., vía internet) etc. En algunas realizaciones, el dispositivo de almacenamiento de datos internos 110 es un medio de lectura de ordenador extraíble tal como un diskette, un disco compacto, una cinta magnética, etc. que contiene allí lógica de control y/o datos registrados.

El sistema de ordenador 100 puede incluir ventajosamente o programarse con un software apropiado para lectura de la lógica de control y/o de los datos del componente de almacenamiento de datos una vez insertado en el dispositivo de recuperación de datos. El sistema de ordenador 100 incluye una pantalla 120 que se usa para exhibir la información al usuario de un ordenador. Debe observarse también que el sistema de ordenador 100 puede estar vinculado a otros sistemas de ordenador 125a-c en una red o red de área ancha para proveer acceso centralizado al sistema de ordenador 100. El software para acceder y procesar las secuencias de nucleótidos o aminoácidos descritas en este documento puede residir en la memoria principal 115 durante la ejecución. En algunos aspectos, el sistema de ordenador 100 puede además comprender un algoritmo de comparación de secuencias para comparar una secuencia de ácido nucleico descrita en esta invención. El algoritmo y la secuencia(s) se pueden almacenar en un medio de lectura de ordenador. Un "algoritmo de comparación de secuencias" se refiere a uno o más programas que se implementan (local o remotamente) en el sistema de ordenador 100 para comparar una secuencia de nucleótidos con otra secuencia de nucleótidos y/o compuestos almacenados dentro de un medio de almacenamiento de datos. Por ejemplo, el algoritmo de comparación de secuencias puede comparar las secuencias de nucleótidos descritas en la presente memoria almacenadas en un medio de lectura de ordenador con secuencias de referencia almacenadas en un medio de lectura de ordenador para identificar homologías o motivos estructurales.

Los parámetros utilizados con los algoritmos anteriormente descritos se pueden adaptar dependiendo de la longitud de la secuencia y el grado de homología estudiado. En algunos aspectos, los parámetros pueden ser los parámetros predeterminados utilizados por los algoritmos en ausencia de instrucciones por parte del usuario.

La Figura 2 es un diagrama de flujo que ilustra un aspecto de un proceso 200 para comparar una nueva secuencia de nucleótidos o proteínas con una base de datos de secuencias con el fin de determinar los niveles de homología entre la nueva secuencia y las secuencias en la base de datos. La base de datos de secuencias puede ser una base de datos privada almacenada dentro del sistema de ordenador 100, o una base de datos pública tal como GENBANK disponible por Internet. El proceso 200 comienza en un estado de inicio 201 y luego pasa a un estado 202 en donde la nueva secuencia que se ha de comparar se almacena en una memoria en un sistema de ordenador 100. Como se analizó previamente, la memoria podría ser cualquier tipo de memoria, incluida RAM o un dispositivo de almacenamiento interno. El proceso 200 luego pasa a un estado 204 en donde una base de datos de secuencias se abre para análisis y comparación. El proceso 200 luego pasa a un estado 206 en donde la primera secuencia almacenada en la base de datos es leída en una memoria del ordenador. Se realiza luego una comparación en un estado 210 para determinar si la primera secuencia es la misma que la segunda secuencia. Es importante destacar que esta etapa no está limitada a efectuar una comparación exacta entre la nueva secuencia y la primera secuencia en la base de datos. El experto en la técnica conoce los métodos conocidos para comparar dos secuencias de nucleótidos o proteínas, incluso si no son idénticas. Por ejemplo, se pueden introducir espacios en una secuencia para elevar el nivel de homología entre las dos secuencias ensayadas. Los parámetros que controlan si se introducen espacios u otras funciones en una secuencia durante una comparación normalmente son ingresados por el usuario del sistema de ordenador. Una vez que se efectuó una comparación de las dos secuencias en el estado 210, se realiza una determinación en un estado de decisión 210 de si las dos secuencias son iguales.

Desde ya, el término "iguales" no está limitado a secuencias que son absolutamente idénticas.

Las secuencias que estén dentro de los parámetros de homología ingresados por el usuario se marcarán como "iguales" en el proceso 200. Si se determina que dos secuencias son iguales, el proceso 200 pasa a un estado 214 en el que el nombre de la secuencia de la base de datos se exhibe al usuario. Este estado notifica al usuario que la secuencia con el nombre exhibido cumple las restricciones de homología que fueron ingresadas. Una vez que el nombre de la secuencia almacenada se exhibe al usuario, el proceso 200 pasa a un estado de decisión 218 en el que se determina si existen más secuencias en la base de datos. Si no existen más secuencias en la base de datos, entonces el proceso 200 finaliza en un estado final 220. No obstante, si existen más secuencias en la base de datos, entonces el proceso 200 pasa a un estado 224 en el que un señalador se mueve hacia la próxima secuencia en la base de datos para que pueda compararse con la nueva secuencia. De este modo, la nueva secuencia se alinea y compara con cada secuencia en la base de datos. Se ha de observar que si se ha determinado en el estado de decisión 212 que las secuencias no fueron homólogas, entonces el proceso 200 pasaría inmediatamente al estado de decisión 218 con el fin de determinar si había alguna otra secuencia disponible en la base de datos para comparación. Se describe un sistema de ordenador que comprende un procesador, un dispositivo de almacenamiento de datos que tiene almacenada allí una secuencia de ácido nucleico descrita en este documento y un comparador de secuencias para efectuar la comparación. El comparador de secuencias puede indicar un nivel de homología entre las secuencias comparadas o identificar motivos estructurales, o puede identificar motivos estructurales en secuencias que se comparan con estos códigos de ácido nucleico y códigos de polipéptidos. La Figura 3 es un diagrama de flujo que ilustra una realización de un proceso 250 en un ordenador para determinar si dos secuencias son homólogas. El proceso 250 comienza en un estado de inicio 252 y luego pasa a un estado 254 en el que una primera secuencia que se ha de comparar se almacena en una memoria. La segunda secuencia que se ha de comparar se almacena luego en una memoria en un estado 256. El proceso 250 luego pasa a un estado 260 en donde el primer carácter en la primera secuencia se lee y luego pasa a un estado 262 en donde se lee el primer carácter de la segunda secuencia. Se ha de entender que si la secuencia es una secuencia de nucleótidos, entonces el carácter normalmente sería o bien A, T, C, G o U. Si la secuencia es una secuencia de proteínas, entonces puede ser un código de aminoácidos de una sola letra de modo que la primera y la segunda secuencias se puedan comparar fácilmente. Se determina luego en un estado de decisión 264 si los dos caracteres son iguales. Si

lo son, entonces el proceso 250 pasa a un estado 268 en donde se leen los próximos caracteres en la primera y en la segunda secuencia. Se determina si los próximos caracteres son iguales. Si lo son, entonces el proceso 250 continúa este circuito hasta que dos caracteres no sean iguales. Si se determina que los próximos dos caracteres no son iguales, el proceso 250 pasa a un estado de decisión 274 para determinar si hay más caracteres en alguna de las secuencias para leer. Si no hay más caracteres para leer, entonces el proceso 250 pasa a un estado 276 en el que se exhibe al usuario el nivel de homología entre la primera y la segunda secuencias. El nivel de homología se determina calculando la proporción de caracteres entre las secuencias que fueron iguales del número total de secuencias en la primera secuencia. Por ende, si cada carácter en una primera secuencia de 100 nucleótidos estuviese alineado con cada carácter en una segunda secuencia, el nivel de homología sería de 100%.

Alternativamente, el programa de ordenador puede comparar una secuencia de referencia con una secuencia descrita en este documento para determinar si las secuencias difieren en una o más posiciones. El programa puede registrar la longitud e identidad de residuos de nucleótidos o aminoácidos insertados, eliminados o sustituidos con respecto a la secuencia o bien de la referencia o una secuencia descrita en este documento. El programa de ordenador puede ser un programa que determina si una secuencia de referencia contiene un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) con respecto a una secuencia descrita en este documento, o, si una secuencia descrita en este documento comprende un SNP de una secuencia conocida. Por lo tanto, en algunos aspectos, el programa de ordenador es un programa que identifica los SNP. El método puede implementarse con los sistemas de ordenador descritos anteriormente y el método ilustrado en la Figura 3. El método se puede implementar leyendo una secuencia descrita en este documento y las secuencias de referencia a través del uso del programa de ordenador, e identificar diferencias con el programa de ordenador.

En otros aspectos el sistema basado en un ordenador comprende un identificador para identificar rasgos dentro de un ácido nucleico o polipéptido descrito en este documento. Un "identificador" se refiere a uno o más programas que identifican ciertos rasgos dentro de una secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, un identificador puede comprender un programa que identifique un marco de lectura abierto (open reading frame u ORF) en una secuencia de ácido nucleico. La Figura 4 es un diagrama de flujo que ilustra un aspecto de un proceso identificador 300 para detectar la presencia de un rasgo en una secuencia. El proceso 300 comienza en un estado de inicio 302 y luego pasa a un estado 304 en donde una primera secuencia a la que se van a revisar rasgos se almacena en una memoria 115 en el sistema de ordenador 100. El proceso 300 luego pasa a un estado 306 en el que se abre una base de datos de rasgos de secuencias. Dicha base de datos incluiría una lista de cada atributo del rasgo junto con el nombre del rasgo. Por ejemplo, el nombre de un rasgo podría ser "Codón de iniciación" y el atributo sería "ATG". Otro ejemplo sería el nombre del rasgo "TAATAA Box" y el atributo del rasgo sería "TAATAA". Un ejemplo de dicha base de datos es producido por University of Wisconsin Genetics Computer Group. Alternativamente, los rasgos pueden ser motivos de polipéptidos estructurales tales como hélices alfa, hojas beta o motivos de polipéptidos funcionales tales como sitios activos enzimáticos, motivos hélice-giro-hélice u otros motivos conocidos por el experto en la técnica. Una vez que la base de datos de rasgos se abre en el estado 306, el proceso 300 pasa a un estado 308 en donde se lee el primer rasgo de la base de datos. Se realiza luego una comparación del atributo del primer rasgo con la primera secuencia en un estado 310. Se determina en un estado de decisión 316 si se halló el atributo del rasgo en la primera secuencia. Si se halló el atributo, entonces el proceso 300 pasa a un estado 318 en el que se exhibe el nombre del rasgo encontrado para el usuario. El proceso 300 pasa luego a un estado de decisión 320 en el que se determina si existen más rasgos en la base de datos. Si no existen más rasgos, entonces el proceso 300 finaliza en un estado final 324. No obstante, si existen más rasgos en la base de datos, entonces el proceso 300 lee el siguiente rasgo de la secuencia en un estado 326 y el circuito vuelve al estado 310 en donde el atributo del siguiente rasgo se compara con la primera secuencia. Si no se encuentra el atributo del rasgo en la primera secuencia en el estado de decisión 316, el proceso 300 pasa directamente al estado de decisión 320 con el fin de determinar si existe algún otro rasgo en la base de datos. Por lo tanto, en un aspecto, un programa de ordenador identifica marcos de lectura abiertos (ORF).

Una secuencia de polipéptidos o ácido nucleico descrita en el presente documento puede almacenarse y manipularse en una diversidad de programas procesadores de datos en una variedad de formatos. Por ejemplo, una secuencia puede almacenarse como texto en un archivo de procesador de texto, tal como MICROSOFTWORD™ o WORDPERFECT™ o como un archivo ASCII en una diversidad de programas de bases de datos familiares para aquellos con experiencia en la técnica, tales como DB2, SYBASE u ORACLE™. A su vez, se pueden emplear muchos programas de ordenador y bases de datos como algoritmos de comparación de secuencias, identificadores o fuentes de secuencias de nucleótidos o secuencias de polipéptidos de referencia que compararán una secuencia de ácido nucleico descrita en este documento. Los programas y bases de datos pueden comprender: MACPATTERN™ (EMBL), DISCOVERYBASE™ (Molecular Applications Group), GENEMINE™ (Molecular Applications Group), LOOK™ (Molecular Applications Group), MACLOOK™ (Molecular Applications Group), BLAST y BLAST2 (NCBI), BLASTN y BLASTX (Altschul et al, J. Mol. Biol. 215:403,1990), FASTA (Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444, 1988), FASTDB™ (Brutlag et al. Comp. App. Biosci. 6:237-245, 1990), CATALYST™ (Molecular Simulations Inc.), CATALYST™/SHAPE™ (Molecular Simulations Inc.), CERIU2.DBACCESS™ (Molecular Simulations Inc.), HYPOGEN™ (Molecular Simulations Inc.), Insight II, (Molecular Simulations Inc.), DISCOVER™ (Molecular Simulations Inc.), CHARMm™ (Molecular Simulations Inc.), FELIX™ (Molecular Simulations Inc.), DELPHI™s (Molecular Simulations Inc.), QUANTEMM™, (Molecular Simulations Inc.), HOMOLOGY™ (Molecular Simulations Inc.), MODELER™ (Molecular Simulations Inc.), ISIS™

(Molecular Simulations Inc.), Quanta/Protein Design (Molecular Simulations Inc.), WEBLAB™ (Molecular Simulations Inc.), WEBLAB™ Diversity Explorer (Molecular Simulations Inc.), GENE EXPLORER™ (Molecular Simulations Inc.), SEQFOLD™ (Molecular Simulations Inc.), la base de datos de MDL Available Chemicals Directory, la base de datos de MDL Drug Data Report, la base de datos de Comprehensive Medicinal Chemistry, la base de datos de Derwent's World Drug Index, la base de datos de BioByteMasterFile, la base de datos de Genbank y la base de datos de Genseqn. Muchos otros programas y bases de datos serán obvios para el experto en la técnica dada la presente descripción.

Los motivos que se pueden detectar usando los programas anteriormente mencionados incluyen secuencias que codifican cremalleras de leucina, motivos hélice-giro-hélice, sitios de glucosilación, sitios de ubicuitinación, hélices alfa y láminas beta, secuencias de señalización que codifican péptidos de señalización que dirigen la segregación de las proteínas codificadas, secuencias implicadas en la regulación de la transcripción tales como homeoboxes, segmentos ácidos, sitios activos enzimáticos, sitios de unión al sustrato y sitios de escisión enzimática.

Hibridación de ácidos nucleicos

Se describen ácidos nucleicos sintéticos o recombinantes aislados que se hibridan bajo condiciones rigurosas al ácido nucleico descrito, p. ej., una secuencia expuesta en SEC ID NÚM:1, SEC ID NÚM:3, SEC ID NÚM:5, SEC ID NÚM:7, SEC ID NÚM:9, SEC ID NÚM:11, SEC ID NÚM:13, SEC ID NÚM:15, SEC ID NÚM:17, SEC ID NÚM:19, SEC ID NÚM:22 o SEC ID NÚM:23, o SEC ID NÚM:1 modificada para codificar una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (varias) o todas las variaciones de base descritas en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, o su equivalente, y sus subsecuencias y secuencias complementarias, o un ácido nucleico que codifica un polipéptido descrito en esta memoria. Las condiciones rigurosas pueden ser condiciones altamente rigurosas, condiciones de rigurosidad media, condiciones de rigurosidad baja, incluidas las condiciones de alta rigurosidad y rigurosidad reducida que se describen en este documento.

"Hibridación" hace referencia al proceso mediante el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través de pares de bases. Las reacciones de hibridación pueden ser sensibles y selectivas para que una secuencia de interés particular pueda identificarse incluso en muestras en las que está presente en bajas concentraciones. Las condiciones rigurosas pueden definirse, por ejemplo, por las concentraciones de sal o formamida en las disoluciones de prehibridación e hibridación, o por la temperatura de hibridación, y se conocen en la técnica. Por ejemplo, la rigurosidad puede aumentarse reduciendo la concentración de sal, aumentando la concentración de formamida o elevando la temperatura de hibridación, alterando el tiempo de hibridación, como se describe en detalle a continuación. En aspectos alternativos, los ácidos nucleicos descritos en el presente documento se definen por su capacidad de hibridarse bajo condiciones de rigurosidad diversa (p. ej., alta, media y baja), como se expone aquí.

Los ácidos nucleicos descritos en este documento según lo definido por su capacidad de hibridarse bajo condiciones rigurosas pueden tener entre aproximadamente cinco residuos y la longitud total del ácido nucleico descrito en esta memoria; p. ej., pueden tener por lo menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, o más, residuos de largo. También se incluyen ácidos nucleicos más cortos que de la longitud total. Estos ácidos nucleicos pueden ser útiles como, p. ej., sondas de hibridación, sondas de etiquetado, sondas de oligonucleótidos PCR, iRNA, antisentido o secuencias que codifican péptidos de unión al anticuerpo (epítopos), motivos, sitios activos y similares.

En un aspecto, los ácidos nucleicos descritos en este documento se definen por su capacidad de hibridarse bajo alta rigurosidad que comprende condiciones de aproximadamente 50% formamida a aproximadamente 37°C y 42°C.

En un aspecto, los ácidos nucleicos descritos en este documento se definen por su capacidad de hibridarse bajo rigurosidad reducida, que comprende condiciones en aproximadamente 35% a 25% de formamida a aproximadamente 30°C a 35°C.

Alternativamente, los ácidos nucleicos descritos en esta memoria se definen por su capacidad de hibridarse bajo alta rigurosidad que comprende condiciones a 42°C en 50% formamida, 5X SSPE, 0,3% SDS, y un ácido nucleico bloqueante de secuencia repetitiva, tal como cot-1 o DNA de esperma de salmón (p. ej., 200 ug/ml de DNA de esperma de salmón cizallado y desnaturalizado). En un aspecto, los ácidos nucleicos descritos en este documento se definen por su capacidad de hibridarse bajo condiciones de rigurosidad reducida que comprenden 35% formamida a temperatura reducida de 35°C.

Después de la hibridación, el filtro puede lavarse con 6X SSC, 0,5% SDS a 50°C. Estas condiciones se consideran condiciones "moderadas" por encima de 25% formamida y condiciones "bajas" por debajo de 25% formamida. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación "moderadas" sería la hibridación mencionada efectuada a 30% formamida. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación de "baja rigurosidad" sería la hibridación mencionada efectuada a 10% formamida.

El intervalo de temperatura correspondiente a un nivel de rigurosidad particular puede además reducirse calculando la relación de purina a pirimidina del ácido nucleico de interés y ajustando la temperatura de manera acorde. Los ácidos nucleicos descritos en este documento también se definen por su capacidad de hibridarse bajo condiciones

de rigurosidad alta, media y baja según lo expuesto en Ausubel and Sambrook. Las variaciones a los intervalos y condiciones mencionados anteriormente se conocen en la técnica. Las condiciones de hibridación se analizan en detalle más adelante.

El procedimiento previamente mencionado puede modificarse para identificar ácidos nucleicos que tengan niveles decrecientes de homología con la secuencia de la sonda. Por ejemplo, para obtener ácidos nucleicos de homología decreciente con la sonda detectable, se pueden usar condiciones menos rigurosas. Por ejemplo, la temperatura de hibridación puede reducirse en incrementos de 5°C desde 68°C hasta 42°C en un tampón de hibridación que tenga una concentración de Na⁺ de aproximadamente 1M. Después de la hibridación, se puede lavar el filtro con 2X SSC, 0,5% SDS a la temperatura de hibridación. Estas condiciones se consideran “moderadas” por encima de 50°C y condiciones “bajas” por debajo de 50°C. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación “moderadas” es la hibridación anteriormente mencionada efectuada a 55°C. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación de “baja rigurosidad” es la hibridación anteriormente mencionada efectuada a 45°C.

Alternativamente, la hibridación se puede llevar a cabo en tampones, tales como 6X SSC, que contienen formamida a una temperatura de 42°C. En este caso, la concentración de formamida en el tampón de hibridación se reduce en incrementos de 5% desde 50% hasta 0% para identificar clones que tengan niveles decrecientes de homología con la sonda. Después de la hibridación, se puede lavar el filtro con 6X SSC, 0,5% SDS a 50°C. Estas condiciones se consideran condiciones “moderadas” por encima de 25% formamida y condiciones “bajas” por debajo de 25% formamida.

Un ejemplo específico de condiciones de hibridación “moderadas” es la hibridación previamente mencionada efectuada a 30% formamida. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación de “baja rigurosidad” es la hibridación anteriormente mencionada efectuada a 10% formamida.

No obstante, la selección de un formato de hibridación no es crítica – es la rigurosidad de las condiciones de lavado la que fija las condiciones que determinan si un ácido nucleico está dentro del alcance que se describe en esta memoria. Las condiciones de lavado utilizadas para identificar ácidos nucleicos dentro del alcance de la presente memoria incluyen, p. ej.: una concentración de sal de aproximadamente 0,02 molar a pH 7 y una temperatura de por lo menos aproximadamente 50°C o aproximadamente 55°C a aproximadamente 60°C; o una concentración de sal de aproximadamente NaCl 0,15 M a 72°C durante aproximadamente 15 minutos; o una concentración de sal de aproximadamente 0,2X SSC a una temperatura de por lo menos aproximadamente 50°C o aproximadamente 55°C a aproximadamente 60°C durante aproximadamente 15 a aproximadamente 20 minutos; o el complejo de hibridación se lava dos veces con una disolución que tiene una concentración de sal de aproximadamente 2X SSC que contiene 0,1% SDS a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se lava dos veces por 0,1X SSC que contiene 0,1% SDS a 68°C durante 15 minutos; o condiciones equivalentes. Véase Sambrook, Tijssen y Ausubel para una descripción de tampones SSC y condiciones equivalentes.

Estos métodos se pueden usar para aislar los ácidos nucleicos descritos en este documento.

Sondas de oligonucleótidos y métodos para usarlas

Se describen ácidos nucleicos para identificar ácidos nucleicos que codifican un polipéptido con actividad de una hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa. En un aspecto, la sonda comprende por lo menos 10 bases consecutivas de un ácido nucleico descrito en este documento. Alternativamente, una sonda descrita en el presente documento puede tener por lo menos aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 150, 160, 170, 180, 190, 200 o más, o aproximadamente 10 a 50, aproximadamente 20 a 60 aproximadamente 30 a 70 bases consecutivas de una secuencia expuesta en un ácido nucleico descrito en esta memoria.

Las sondas identifican un ácido nucleico por unión y/o hibridación. Las sondas se pueden usar en ordenaciones como se describe en este documento, véase el análisis a continuación, incluidas, p. ej., ordenaciones capilares. Las sondas descritas en este documento también se pueden utilizar para aislar otros ácidos nucleicos o polipéptidos.

Las sondas descritas en este documento se pueden utilizar para determinar si una muestra biológica, tal como una muestra de tierra, contiene un organismo que tiene una secuencia de ácido nucleico descrita en esta memoria (p. ej., un ácido nucleico que codifica hidrolasa) o un organismo del cual se obtuvo el ácido nucleico. En dichos procedimientos, se obtiene una muestra biológica que aloja potencialmente el organismo del cual se aisló el ácido nucleico, y se obtienen los ácidos nucleicos de la muestra. Los ácidos nucleicos se ponen en contacto con la sonda bajo condiciones que permiten que la sonda se hibride específicamente a cualquier secuencia complementaria presente en la muestra.

Si es necesario, las condiciones que permiten que la sonda se hibride específicamente a las secuencias complementarias pueden determinarse disponiendo la sonda en contacto con secuencias complementarias de las muestras que se sabe contienen la secuencia complementaria, como también secuencias control que no contienen la secuencia complementaria. Las condiciones de hibridación, tales como la concentración de sal del tampón de hibridación, la concentración de formamida del tampón de hibridación o la temperatura de hibridación, pueden

variarse para identificar condiciones que permitan que la sonda se hibride específicamente a ácidos nucleicos complementarios (véase el análisis sobre condiciones de hibridación específicas).

Si la muestra contiene el organismo del cual se aisló el ácido nucleico, se detecta entonces la hibridación específica de la sonda. La hibridación se puede detectar etiquetando la sonda con un agente detectable tal como un isótopo radiactivo, un tinte fluorescente o una enzima capaz de catalizar la formación de un producto detectable. Los expertos en la técnica están familiarizados con muchos métodos para usar las sondas etiquetadas a fin de detectar la presencia de ácidos nucleicos complementarios en una muestra. Éstos incluyen transferencias de Southern, transferencias Northern, procedimientos de hibridación de colonias y transferencias dot. Los protocolos para cada uno de estos procedimientos se dan a conocer en Ausubel and Sambrook.

Alternativamente, se puede usar más de una sonda (por lo menos una que sea capaz de hibridarse específicamente a cualquier secuencia complementaria presente en la muestra de ácido nucleico), en una reacción de ampliación para determinar si la muestra contiene un organismo que contiene una secuencia de ácido nucleico descrita en este documento (p. ej., un organismo del cual se aisló el ácido nucleico). En un aspecto, las sondas comprenden oligonucleótidos. En un aspecto, la reacción de ampliación puede comprender una reacción PCR. Los protocolos de PCR se describen en Ausubel and Sambrook (véase el análisis sobre reacciones de ampliación). En dichos procedimientos, los ácidos nucleicos en la muestra se ponen en contacto con las sondas, se efectúa la reacción de ampliación y se detecta cualquier producto de ampliación resultante. El producto de ampliación puede detectarse efectuando electroforesis en gel en los productos de reacción y tiñendo el gel con un intercalador tal como bromuro de etidio. Alternativamente, puede etiquetarse una o más sondas con un isótopo radiactivo, y la presencia de un producto de ampliación radiactivo puede detectarse por autorradiografía después de la electroforesis en gel.

Las sondas derivadas de secuencias cercanas a los extremos 3' o 5' de una secuencia de ácido nucleico descrita en este documento también se pueden usar en procedimientos de paseo cromosómico para identificar clones que contiene secuencias genómicas adicionales, por ejemplo. Dichos métodos permiten el aislamiento de genes que codifican proteínas adicionales de interés del organismo hospedante.

En un aspecto, las secuencias de ácidos nucleicos descritas en este documento se usan como sondas para identificar y aislar ácidos nucleicos relacionados. En algunos aspectos, los ácidos nucleicos relacionados así identificados pueden ser cDNA o DNA genómicos de organismos distintos a aquel del que se aisló primero el ácido nucleico descrito en este documento. En dichos procedimientos, una muestra de ácido nucleico se pone en contacto con la sonda bajo condiciones que permiten que la sonda se hibride específicamente a secuencias relacionadas. La hibridación de la sonda a ácidos nucleicos del organismo relacionado se detecta luego usando cualquiera de los métodos anteriormente descritos.

En reacciones de hibridación de ácido nucleico, las condiciones empleadas para lograr un nivel particular de rigurosidad variarán dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se estén hibridando. Por ejemplo, la longitud, el grado de complementaridad, la composición de la secuencia de nucleótidos (p. ej., contenido de GC v. AT) y tipo de ácidos nucleicos (p. ej., RNA v. DNA) de las regiones hibridantes de los ácidos nucleicos se pueden considerar en la selección de las condiciones de hibridación. Una consideración adicional es si uno de los ácidos nucleicos está inmovilizado, por ejemplo, en un filtro. La hibridación se puede llevar a cabo bajo condiciones de baja rigurosidad, rigurosidad moderada o rigurosidad alta. Como ejemplo de hibridación de ácido nucleico, una membrana de polímero que contiene ácidos nucleicos desnaturalizados inmovilizados se prehibrida primero durante 30 minutos a 45°C en una disolución que consiste en NaCl 0,9 M, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,0, Na₂EDTA 5,0 mM, 0,5% SDS, 10X Denhardt y 0,5 mg/ml ácido polirriboadenílico. Aproximadamente 2×10^7 cpm (actividad específica 4-9 X 10^8 cpm/ug) de sonda de oligonucleótido marcada en su extremo con ³²P se añaden luego a la disolución. Después de 12-16 horas de incubación, la membrana se lava durante 30 minutos a temperatura ambiente (RT) en 1X SET (NaCl 150 mM, Tris hidrócloruro 20 mM, pH 7,8, Na₂EDTA 1 mM) que contiene 0,5% SDS, seguido de un lavado de 30 minutos en 1X SET nuevo a T_m- 10°C para la sonda de oligonucleótido. La membrana se expone luego a película autorradiográfica para detección de señales de hibridación.

Al variar la rigurosidad de las condiciones de hibridación utilizadas para identificar ácidos nucleicos, tales como cDNA o DNA genómicos, que se hibridan a una sonda detectable, se pueden identificar y aislar distintos niveles de homología con la sonda. La rigurosidad puede variarse efectuando la hibridación a temperaturas variables debajo de las temperaturas de fusión de las sondas. La temperatura de fusión, T_m, es la temperatura (bajo fuerza iónica y pH definidos) a la cual 50% de la secuencia diana se hibrida a una sonda perfectamente complementaria. Se seleccionan condiciones muy rigurosas para equivaler a aproximadamente 5°C menos que la T_m de una sonda particular. La temperatura de fusión de la sonda puede calcularse usando las siguientes fórmulas ilustrativas. Para sondas entre 14 y 70 nucleótidos de longitud, la temperatura de fusión (T_m) se calcula usando la fórmula:

$T_m = 81,5 + 16,6(\log [Na^+]) + 0,41 (\text{fracción G+C}) - (600/N)$ en donde N es la longitud de la sonda.

Si la hibridación se lleva a cabo en una disolución que contiene formamida, la temperatura de fusión se puede calcular usando la ecuación:

$T_m = 81,5 + 16,6(\log [Na^+]) + 0,41 (\text{fracción G+C}) - (0,63\% \text{ formamida}) - (600/N)$ en donde N es la longitud de la sonda.

La prehibridación se puede llevar a cabo en 6X SSC, 5X reactivo de Denhardt, 0,5% SDS, 100 µg DNA de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado o 6X SSC, 5X reactivo de Denhardt, 0,5% SDS, 100 µg DNA de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado, 50% formamida. Las fórmulas para SSC y Denhardt y otras disoluciones se mencionan, p. ej., en Sambrook.

- 5 En un aspecto, la hibridación se efectúa añadiendo la sonda detectable a las disoluciones de prehibridación mencionadas previamente. Si la sonda comprende DNA bicatenario, se desnaturaliza antes de la adición a la disolución de hibridación. El filtro se pone en contacto con la disolución de hibridación por un periodo de tiempo suficiente para permitir que la sonda se hibride a cDNA o DNA genómicos que contienen allí secuencias complementarias u homólogas. Para sondas de más de 200 nucleótidos de longitud, la hibridación se puede llevar a cabo a 15-25°C debajo de la T_m. Para sondas más cortas, tales como sondas de oligonucleótidos, la hibridación se puede llevar a cabo a 5-10°C debajo de la T_m. En un aspecto, las hibridaciones en 6X SSC se realizan a aproximadamente 68°C. En un aspecto, las hibridaciones en 50% formamida que contienen disoluciones se llevan a cabo a aproximadamente 42°C. Todas las hibridaciones mencionadas se considerarían bajo las condiciones de rigurosidad alta.
- 10
- 15 En un aspecto, después de la hibridación, el filtro se lava para eliminar cualquier sonda detectable no específicamente unida. La rigurosidad utilizada para lavar los filtros también se puede variar dependiendo de la naturaleza de los ácidos nucleicos que se están hibridando, la longitud de los ácidos nucleicos que se están hibridando, el grado de complementariedad, la composición de la secuencia de nucleótidos (p. ej., contenido de GC v. AT), y el tipo de ácido nucleico (p. ej., mRNA v. DNA). Los ejemplos de lavados en condiciones de mayor rigurosidad son los siguientes: 2X SSC, 0,1% SDS a temperatura ambiente durante 15 minutos (baja rigurosidad); 0,1X SSC, 0,5% SDS a temperatura ambiente durante 30 minutos hasta 1 hora (rigurosidad moderada); 0,1X SSC, 0,5% SDS durante 15 a 30 minutos entre la temperatura de hibridación y 68°C (alta rigurosidad); y NaCl 0,15M durante 15 minutos a 72°C (rigurosidad muy alta). Un lavado de baja rigurosidad final puede efectuarse en 0,1X SSC a temperatura ambiente. Los ejemplos anteriores ilustran puramente un conjunto de condiciones que se pueden utilizar para lavar filtros. El experto en la técnica sabría que hay varias fórmulas para distintos lavados de rigurosidad.
- 20
- 25

- Los ácidos nucleicos que se han hibridado a la sonda pueden identificarse por autorradiografía u otras técnicas convencionales. El procedimiento anterior puede modificarse para identificar ácidos nucleicos que tienen niveles decrecientes de homología con la secuencia de la sonda. Por ejemplo, para obtener ácidos nucleicos de homología decreciente con la sonda detectable, se pueden usar condiciones menos rigurosas. Por ejemplo, la temperatura de hibridación puede reducirse en incrementos de 5°C desde 68°C hasta 42°C en un tampón de hibridación que tiene una concentración de Na⁺ de aproximadamente 1M. Después de la hibridación, el filtro puede lavarse con 2X SSC, 0,5% SDS a la temperatura de hibridación. Estas condiciones se consideran condiciones “moderadas” por encima de 50°C y condiciones “bajas” por debajo de 50°C. Un ejemplo de condiciones de hibridación “moderadas” es la hibridación anteriormente mencionada efectuada a 55°C.
- 30
- 35

Un ejemplo de condiciones de hibridación de “baja rigurosidad” es la hibridación anteriormente mencionada efectuada a 45°C.

- Alternativamente, la hibridación se puede llevar a cabo en tampones, tales como 6X SSC, que contienen formamida a una temperatura de 42°C. En este caso la concentración de formamida en el tampón de hibridación puede reducirse en incrementos de 5% desde 50% hasta 0% para identificar clones que tienen niveles decrecientes de homología con la sonda. Después de la hibridación, se puede lavar el filtro con 6X SSC, 0,5% SDS a 50°C. Estas condiciones se consideran condiciones “moderadas” por encima de 25% formamida y condiciones “bajas” por debajo de 25% formamida.
- 40

- Un ejemplo específico de condiciones de hibridación “moderadas” es la hibridación anteriormente mencionada efectuada a 30% formamida. Un ejemplo específico de condiciones de hibridación de “baja rigurosidad” es la hibridación anteriormente mencionada efectuada a 10% formamida.
- 45

- Las sondas y métodos que se describen en este documento pueden usarse para aislar o identificar (p. ej., usando una ordenación) ácidos nucleicos que tienen una secuencia con por lo menos aproximadamente 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más, de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleica descrita en este documento que comprende por lo menos aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000, o más de sus bases consecutivas, y sus secuencias complementarias. La homología se puede medir usando un algoritmo de alineación, como se analizó previamente en este documento. Por ejemplo, los polinucleótidos homólogos tienen una secuencia de codificación que es una variante alélica natural de una de las secuencias de codificación descritas en este documento.
- 50
- 55

Dichas variantes alélicas pueden tener una sustitución, eliminación o adición de uno o más nucleótidos en comparación con un ácido nucleico descrito en este documento.

Adicionalmente, las sondas y métodos descritos en el presente documento se pueden aislar para identificar (p. ej., usando una ordenación), ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que tienen por lo menos aproximadamente 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%* 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más identidad de secuencia (homología) con un polipéptido descrito en este documento que comprende por lo menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 75, 100 o 150 o más de sus aminoácidos consecutivos según lo determinado usando un algoritmo de alineación de secuencias, p. ej., tal como el algoritmo FASTA versión 3.0t78 con parámetros predeterminados, o un programa BLAST 2.2.2 con ajustes ilustrativos expuestos en este documento.

10 Inhibición de la expresión de hidrolasas

Se describen ácidos nucleicos complementarios a (p. ej., secuencias antisentido) a las secuencias de ácido nucleico descritas en este documento, p. ej., secuencias codificantes de hidrolasa. Las secuencias antisentido son capaces de inhibir el transporte, el empalme o la transcripción de genes que codifican hidrolasa. La inhibición puede efectuarse a través del direccionamiento de DNA genómico o RNA mensajero. La inhibición puede efectuarse usando DNA, p. ej., una ribozima inhibidora, o un RNA, p. ej., un iRNA bicatenario, que comprende una secuencia descrita en este documento. La transcripción o función de ácido nucleico dirigido puede inhibirse, por ejemplo, por hibridación y/o escisión. Se describen en la presente memoria conjuntos de inhibidores que comprenden oligonucleótidos capaces de unir el gen de hidrolasa y/o mensajero, en cualquier caso previniendo o inhibiendo la producción o función de hidrolasa. La asociación puede ser a través de la hibridación específica de la secuencia. Otra clase útil de inhibidores incluye oligonucleótidos que causan inactivación o escisión de mensaje de hidrolasa. El oligonucleótido puede tener actividad enzimática que causa dicha escisión, tal como ribozimas. El oligonucleótido puede modificarse químicamente o conjugarse con una enzima o composición capaz de escindir el ácido nucleico complementario. Se puede estudiar un grupo de muchos distintos tal como los oligonucleótidos para aquellos con actividad deseada.

25 Oligonucleótidos antisentido

Se describen oligonucleótidos antisentido capaces de unirse al mensaje de hidrolasa que puede inhibir la actividad de hidrolasa dirigiendo mRNA o DNA genómico. Las estrategias para diseñar oligonucleótidos antisentido se describen en la bibliografía científica y de patentes, y el experto en la técnica puede diseñar dichos oligonucleótidos de hidrolasa usando los nuevos reactivos descritos en este documento. Por ejemplo, los protocolos de paseo de genes/mapeo de RNA para detectar oligonucleótidos antisentido eficaces se conocen en la técnica, véase, p. ej., Ho (2000) *Methods Enzymol.* 314:168-183, que describen un ensayo de mapeo de RNA, que se basa en técnicas moleculares estándar para proporcionar un método fácil y confiable para selección de secuencias antisentido potentes. Véase también Smith (2000) *Eur. J. Pharm. Sci.* 11:191-198.

En un aspecto, los ácidos nucleicos naturales generados o aislados de manera recombinante se usan como oligonucleótidos antisentido. Los oligonucleótidos antisentido pueden tener cualquier longitud, por ejemplo, en aspectos alternativos, los oligonucleótidos antisentido tienen entre aproximadamente 5 y 100, aproximadamente 10 y 80, aproximadamente 15 y 60, aproximadamente 18 y 40. Los oligonucleótidos antisentido pueden ser RNA o DNA monocatenario o bicatenario. La longitud óptima puede determinarse por detección de rutina. Los oligonucleótidos antisentido pueden estar presentes en cualquier concentración. La concentración óptima se puede determinar por detección de rutina. Se puede usar una amplia variedad de nucleótidos sintéticos, no naturales, y se conocen los análogos de ácido nucleico que pueden abordar este posible problema. Por ejemplo, se pueden usar ácidos nucleicos peptídicos (PNA) que contienen cadenas principales no iónicas, tales como unidades de N-(2-aminoetil) glicina. También se pueden emplear los oligonucleótidos antisentido que tienen uniones fosforotioato, como se describe en los documentos WO 97/03211; WO 96/39154; Mata (1997) *Toxicol Appl Pharmacol* 144:189-197; Antisense Therapeutics, ed. Agrawal (Humana Press, Totowa, N.J., 1996). Se describen en esta memoria oligonucleótidos antisentido que tienen análogos de esqueletos de DNA sintéticos, que también incluyen fosforoditioato, metilfosfonato, fosforamidato, alquil fosfotriéster, sulfamato, 3'-tioacetal, metilen (metilimino), 3'-N-carbamato y ácidos nucleicos de morfolino carbamato, como se describió precedentemente.

Se puede emplear la metodología de química combinatoria para crear grandes cantidades de oligonucleótidos que pueden detectarse rápidamente para oligonucleótidos específicos que tienen afinidades de unión y especificidades apropiadas hacia cualquier diana, tal como las secuencias de hidrolasa antisentido descritas en este documento (véase, p. ej., Gold (1995) *J. of Biol. Chem.* 270:13581-13584).

Ribozimas inhibidoras

Se describen ribozimas capaces de unirse a un mensaje de hidrolasa que puede inhibir la actividad de hidrolasa dirigiendo mRNA. Las estrategias para diseñar ribozimas y seleccionar la secuencia antisentido específica de hidrolasa para direccionamiento se describen en la bibliografía científica y de patentes, y el experto en la técnica puede diseñar dichas ribozimas usando los nuevos reactivos descritos en este documento. Las ribozimas actúan uniendo un RNA diana a través de la porción de unión de RNA diana de una ribozima que se mantiene próxima a una porción enzimática del RNA que escinde el RNA diana. Por lo tanto, la ribozima reconoce y se une a un RNA

diana a través de pares de bases complementarios, y una vez unida al sitio correcto, actúa enzimáticamente para escindir e inactivar el RNA diana. La escisión de un RNA diana en dicho modo destruirá su capacidad de dirigir la síntesis de una proteína codificada si la escisión ocurre en la secuencia codificante. Después de que una ribozima se ha unido y escindido su RNA diana, típicamente se libera de ese RNA y entonces puede unirse y escindir nuevas dianas repetidamente.

En algunas circunstancias, la naturaleza enzimática de una ribozima puede ser ventajosa en relación a otras tecnologías, de modo tal que una tecnología antisentido (si una molécula de ácido nucleico simplemente se une a una diana de ácido nucleico para bloquear su transcripción, traducción o asociación con otra molécula) como la concentración eficaz de ribozima necesaria para efectuar un tratamiento terapéutico puede ser menor que un oligonucleótido antisentido. Esta ventaja potencial refleja la capacidad de la ribozima para actuar enzimáticamente. Por lo tanto, una molécula de una sola ribozima es capaz de escindir muchas moléculas de RNA diana. Además, una ribozima es típicamente un inhibidor altamente específico, donde la especificidad de inhibición depende no solamente del mecanismo de unión de los pares de base, sino también del mecanismo mediante el cual la molécula inhibe la expresión de RNA al cual se une. Es decir, la inhibición es causada por escisión de la diana de RNA y entonces la especificidad se define como la relación del índice de escisión del RNA dirigido sobre el índice de escisión del RNA no dirigido. Este mecanismo de escisión depende de factores adicionales a aquellos implicados en los pares de bases. Por consiguiente, la especificidad de acción de una ribozima puede ser mayor que aquella del oligonucleótido antisentido que se une al mismo sitio de RNA.

La molécula de RNA de la ribozima enzimática se puede formar en un motivo cabeza de martillo, pero también se puede formar en el motivo de una horquilla, virus de hepatitis delta, RNA de tipo RNase P o intrón del grupo I (en asociación con una secuencia guía de RNA). Los ejemplos de dichos motivos cabeza de martillo son descritos por Rossi (1992) *Aids Research and Human Retroviruses* 8:183; los motivos horquilla por Hampel (1989) *Biochemistry* 28:4929, y Hampel (1990) *Nuc. Acids Res.* 18:299; el motivo del virus de hepatitis delta por Perrotta (1992) *Biochemistry* 31:16; el motivo RNaseP por Guerrier-Takada (1983) *Cell* 35:849; y el intrón del grupo I por Cech (patente de Estados Unidos núm. 4.987.071). La mención de estos motivos específicos no tiene como fin ser limitante; los expertos en la técnica reconocerán que una molécula de RNA enzimática descrita en este documento puede tener un sitio de unión al sustrato específico complementario a una o más de las regiones de RNA del gen diana, y tiene una secuencia de nucleótidos dentro o que rodea ese sitio de unión al sustrato que imparte una actividad de escisión de RNA a la molécula.

Interferencia de RNA (RNAi)

Se describen en este documento moléculas inhibidoras de RNA, llamadas moléculas de "RNAi", que comprenden una secuencia de hidrolasa descrita en este documento. La molécula de RNAi puede comprender una molécula de RNA bicatenaria (dsRNA), p. ej., siRNA y/o miRNA. La RNAi puede inhibir la expresión de un gen o transcrito de hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa). En un aspecto, la molécula RNAi, p. ej., siRNA y/o miRNA, tiene aproximadamente 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 o más nucleótidos de doble longitud. Si bien la invención no está limitada por ningún mecanismo de acción particular, la RNAi puede entrar en una célula y causar la degradación de un RNA monocatenario RNA (ssRNA) de secuencias similares o idénticas, incluyendo mRNA endógenos. Cuando una célula se expone a RNA bicatenario (dsRNA), el mRNA del gen homólogo se degrada selectivamente mediante un proceso llamado interferencia de RNA (RNAi). Un mecanismo básico posible detrás de RNAi es la ruptura de un RNA bicatenario (dsRNA) que se corresponde con una secuencia génica específica en piezas cortas llamadas RNA de interferencia corta, que desencadenan la degradación de mRNA que se corresponde con su secuencia.

En un aspecto, las RNAi que se describen en este documento se usan en compuestos terapéuticos silenciadores de genes, véase, p. ej., Shuey (2002) *Drug Discov. Today* 7:1040-1046. Se describen métodos para degradar selectivamente RNA usando las RNAi. El proceso se puede practicar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En un aspecto, las moléculas RNAi descritas en este documento se pueden usar para generar una mutación de pérdida de la función en una célula, un órgano o un animal. Los métodos para elaborar y usar moléculas RNAi para degradar selectivamente RNA se conocen en la técnica, véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 6.506.559; 6.511.824; 6.515.109; 6.489.127.

Modificación de ácidos nucleicos

Se describen métodos para generar variantes de los ácidos nucleicos, p. ej., aquellos que codifican una hidrolasa o un anticuerpo descrito en este documento. Estos métodos pueden repetirse o usarse en diversas combinaciones para generar hidrolasas o anticuerpos que tienen una actividad alterada o distinta, o una estabilidad alterada o distinta a aquella de una hidrolasa o un anticuerpo codificado por el ácido nucleico molde. Estos métodos pueden también repetirse o usarse en diversas combinaciones, p. ej., para generar variaciones en la expresión de genes/mensajes, traducción de mensajes o estabilidad de mensajes. En otro aspecto, la composición genética de una célula se altera, p. ej., por modificación de un gen homólogo *ex vivo*, seguida por su reinserción en la célula.

El término “variante” puede incluir los polinucleótidos o polipéptidos descritos en este documento modificados en uno o más pares de bases, codones, intrones, exones o residuos de aminoácidos (respectivamente) e incluso retener la actividad biológica de una hidrolasa descrita en la presente memoria.

Las variantes pueden producirse con cualquier número de medios, incluidos métodos tales como, por ejemplo, PCR propenso a error, transposición, transposición, mutagénesis dirigida al oligonucleótido, PCR de ensamblaje, mutagénesis de PCR sexual, mutagénesis *in vivo*, mutagénesis casete, mutagénesis de conjunto recursiva, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica del sitio, GeneReassembly, GSSMSM y cualquiera de sus combinaciones. Las técnicas para producir hidrolasas variantes que tienen actividad en un pH o temperatura, por ejemplo, que es diferente de la hidrolasa de tipo salvaje, se incluyen en este documento.

Un ácido nucleico descrito en este documento puede alterarse por distintos medios. Por ejemplo, métodos aleatorios o métodos estocásticos o no estocásticos, o métodos de “evolución dirigida”, véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 6.361.974. Los métodos para mutación aleatoria de genes se conocen en la técnica, véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 5.830.696. Por ejemplo, se pueden usar mutágenos para mutar aleatoriamente un gen. Los mutágenos incluyen, p. ej., luz ultravioleta o radiación gamma, o un mutágeno químico, p. ej., mitomicina, ácido nitroso, psoralens fotoactivado, solos o en combinación, para inducir rupturas de DNA receptivas para repararse por recombinación. Otros mutágenos químicos incluyen, por ejemplo, bisulfato de sodio, ácido nitroso, hidroxilamina, hidrazina o ácido fórmico. Otros mutágenos son análogos de precursores de nucleótidos, p. ej., nitrosoguanidina, 5-bromouracil, 2-aminopurina, o acridina. Estos agentes pueden añadirse a una reacción PCR del precursor de nucleótidos, mutando así la secuencia. También se pueden utilizar agentes intercalantes tales como proflavina, acriflavina, quinacrina y similares.

Se puede usar cualquier técnica de biología molecular, p. ej., mutagénesis PCR aleatoria, véase, p. ej., Rice (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5467-5471; o mutagénesis casete múltiple combinatoria, véase, p. ej., Crameri (1995) Biotechniques 18:194-196. Alternativamente, los ácidos nucleicos, p. ej., genes, pueden re-ensamblarse después de la fragmentación aleatoria o “estocástica”, véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 6.291.242; 6.287.862; 6.287.861; 5.955.358; 5.830.721; 5.824.514; 5.811.238; 5.605.793. En aspectos alternativos, se introducen modificaciones, adiciones o eliminaciones por PCR propenso a error, transposición, mutagénesis dirigida al oligonucleótido, PCR de ensamblaje, mutagénesis de PCR sexual, mutagénesis *in vivo*, mutagénesis casete, mutagénesis de conjunto recursiva, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica del sitio, Gene Site Saturation MutagenesisSM (GSSMSM), re-ensamblaje de ligadura sintética (SLR o GeneReassembly), recombinación, recombinación de secuencias recursivas, mutagénesis de DNA modificado por fosfotioato, mutagénesis de molde que contiene uracil, mutagénesis doble discontinua, mutagénesis de reparación de apareamiento erróneo puntual, mutagénesis de cepas hospedantes deficientes de reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis de eliminación, mutagénesis de selección por restricción, mutagénesis de purificación por restricción, síntesis de genes artificiales, mutagénesis de conjunto, creación de multímeros de ácidos nucleicos quiméricos y/o una combinación de estos y otros métodos.

Las siguientes publicaciones describen una diversidad de procedimientos de recombinación recursivos y/o métodos que se pueden incorporar a los métodos descritos en este documento: Stemmer (1999) “Molecular breeding of viruses for targeting and other clinical properties” Tumor Targeting 4:1-4; Ness (1999) Nature Biotechnology 17:893-896; Chang (1999) “Evolution of a cytokine using DNA family shuffling” Nature Biotechnology 17:793-797; Minshull (1999) “Protein evolution by molecular breeding” Current Opinion in Chemical Biology 3:284-290; Christians (1999) “Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling” Nature Biotechnology 17:259-264; Crameri (1998) “DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution” Nature 391:288-291; Crameri (1997) “Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling,” Nature Biotechnology 15:436-438; Zhang (1997) “Directed evolution of an effective fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening” Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4504-4509; Patten et al. (1997) “Applications of DNA Shuffling to Pharmaceuticals and Vaccines” Current Opinion in Biotechnology 8:724-733; Crameri et al. (1996) “Construction and evolution of antibody-phage libraries by DNA shuffling” Nature Medicine 2:100-103; Gates et al. (1996) “Affinity selective isolation of ligands from peptide libraries through display on a lac repressor ‘headpiece dimer’ ” Journal of Molecular Biology 255:373-386; Stemmer (1996) “Sexual PCR and Assembly PCR” en: The Encyclopedia of Molecular Biology. VCH Publishers, Nueva York, pág.447-457; Crameri and Stemmer (1995)

“Combinatorial multiple cassette mutagenesis creates all the permutations of mutant and wildtype cassettes” BioTechniques 18:194-195; Stemmer et al. (1995) “Single-step assembly of a gene and entire plasmid from large numbers of oligodeoxyribonucleotides” Gene, 164:49-53; Stemmer (1995) “The Evolution of Molecular Computation” Science 270:1510; Stemmer (1995) “Searching Sequence Space” Bio/Technology 13:549-553; Stemmer (1994) “Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling” Nature 370:389-391; y Stemmer (1994) “DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: *In vitro* recombination for molecular evolution”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751.

Los métodos de mutación para generar diversidad incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio (Ling et al. (1997) “Approaches to DNA mutagenesis: an overview” Anal Biochem. 254(2): 157-178; Dale et al. (1996) “Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method” Methods Mol. Biol. 57:369-374; Smith (1985) “*In vitro* mutagenesis” Ann. Rev. Genet. 19:423-462; Botstein & Shortle (1985) “Strategies and

applications of in vitro mutagenesis" *Science* 229:1193-1201; Carter (1986) "Site-directed mutagenesis" *Biochem. J.* 237:1-7; y Kunkel (1987) "The efficiency of oligonucleotide directed mutagenesis" en *Nucleic Acids & Molecular Biology* (Eckstein, F. y Lilley, D. M. J. eds., Springer Verlag, Berlín)); mutagénesis que usa moldes que contienen uracil (Kunkel (1985) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Proc. Natl. Acad. Sei. USA* 82:488-492; Kunkel et al. (1987) "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection" *Methods in Enzymol.* 154, 367-382; y Bass et al. (1988) "Mutant Trp repressors with new DNA-binding specificities" *Science* 242:240-245); mutagénesis dirigida a oligonucleótidos (*Methods in Enzymol.* 100: 468-500 (1983); *Methods in Enzymol.* 154: 329-350 (1987); Zoller & Smith (1982) "Oligonucleotide-directed mutagenesis using M13-derived vectors: an efficient and general procedure for the production of point mutations in any DNA fragment" *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6500; Zoller & Smith (1983) "Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors" *Methods in Enzymol.* 100:468-500; y Zoller & Smith (1987) "Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template" *Methods in Enzymol.* 154:329-350); mutagénesis de DNA modificado con fosforotioato (Taylor et al. (1985) "The use of phosphorothioate-modified DNA in restriction enzyme reactions to prepare nicked DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8749-8764; Taylor et al. (1985) "The rapid generation of oligonucleotide-directed mutations at high frequency using phosphorothioate-modified DNA" *Nucl. Acids Res.* 13: 8765-8787 (1985); Nakamaye (1986) "Inhibition of restriction endonuclease Nci I cleavage by phosphorothioate groups and its application to oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 14: 9679-9698; Sayers et al. (1988) "Y-T Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis" *Nucl. Acids Res.* 16:791-802; y Sayers et al. (1988) "Strand specific cleavage of phosphorothioate-containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide" *Nucl. Acids Res.* 16: 803-814); mutagénesis que usa DNA doble discontinuo (Kramer et al. (1984) "The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction" *Nucl. Acids Res.* 12: 9441-9456; Kramer & Fritz (1987) *Methods in Enzymol.* "Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA" 154:350-367; Kramer et al. (1988) "Improved enzymatic in vitro reactions in the gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed construction of mutations" *Nucl. Acids Res.* 16: 7207; y Fritz et al. (1988) "Oligonucleotide-directed construction of mutations: a gapped duplex DNA procedure without enzymatic reactions in vitro" *Nucl. Acids Res.* 16: 6987-6999).

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

Detalles adicionales de muchos de los métodos precedentemente mencionados se pueden hallar en *Methods in Enzymology* Volumen 154, que también describe controles útiles para resolución de problemas con métodos de mutagénesis.

Los protocolos adicionales utilizados en los métodos descritos en el presente documento incluyen aquellos descritos en la patente de Estados Unidos núm. 5.605.793 para Stemmer (Feb. 25,1997), "Methods for In Vitro Recombination;" patente de Estados Unidos núm. 5.811.238 para Stemmer et al. (Sep. 22, 1998) "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination;" patente de Estados Unidos núm. 5.830.721 para Stemmer et al. (Nov. 3, 1998), "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;" patente de Estados Unidos núm. 5.834.252 para Stemmer, et al. (Nov. 10, 1998) "End-Complementary Polymerase Reaction;" patente de Estados Unidos núm. 5.837.458 para Minshull, et al. (Nov. 17,1998), "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering;" WO 95/22625, Stemmer y Crameri, "Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;" WO 96/33207 por Stemmer y Lipschutz "End Complementary Polymerase Chain Reaction;" WO 97/20078 por Stemmer y Crameri "Methods for Generating Polynucleotides having Desired Characteristics by Iterative Selection and Recombination;" WO 97/35966 por Minshull y Stemmer, "Methods and Compositions for Cellular and Metabolic Engineering;" WO 99/41402 por Punnonen et al. "Targeting of Genetic Vaccine Vectors;" WO 99/41383 por Punnonen et al. "Antigen Library Immunization;" WO 99/41369 por Punnonen et al. "Genetic Vaccine Vector Engineering;" WO 99/41368 por Punnonen et al. "Optimization of Immunomodulatory Properties of Genetic Vaccines;" EP 752008 por Stemmer y Crameri, "DNA Mutagenesis by Random Fragmentation and Reassembly;" EP 0932670 por Stemmer "Evolving Cellular DNA Uptake by Recursive Sequence Recombination;" WO 99/23107 por Stemmer et al., "Modification of

Virus Tropism and Host Range by Viral Genome Shuffling;" WO 99/21979 por Apt et al., "Human Papillomavirus Vectors;" WO 98/31837 por del Cardayre et al. "Evolution of Whole Cells and Organisms by Recursive Sequence Recombination;" WO 98/27230 por Patten y Stemmer, "Methods and Compositions for Polypeptide Engineering;" WO 98/27230 por Stemmer et al., "Methods for Optimization of Gene Therapy by Recursive Sequence Shuffling and Selection," WO 00/00632, "Methods for Generating Highly Diverse Libraries," WO 00/09679, "Methods for Obtaining in Vitro Recombined Polynucleotide Sequence Banks and Resulting Sequences," WO 98/42832 por Arnold et al., "Recombination of Polynucleotide Sequences Using Random or Defined Primers," WO 99/29902 por Arnold et al., "Method for Creating Polynucleotide and Polipeptide Sequences," WO 98/41653 por Vind, "An in Vitro Method for Construction of a DNA Library," WO 98/41622 by Borchert et al., "Method for Constructing a Library Using DNA Shuffling", y WO 98/42727 por Pati y Zarling, "Sequence Alterations using Homologous Recombination."

Los protocolos que se pueden usar (proporcionando detalles con respecto a varios métodos que generan diversidad) se describen, p. ej., en la solicitud de patente de Estados Unidos de serie núm. (USSN) 09/407,800, "SHUFFLING OF CODON ALTERED GENES" por Patten et al. presentada el 28 de septiembre de 1999; "EVOLUTION OF WHOLE CELLS AND ORGANISMS BY RECURSIVE SEQUENCE RECOMBINATION" por del Cardayre et al., patente de Estados Unidos núm. 6.379.964; "OLIGONUCLEOTIDE MEDIATED NUCLEIC ACID RECOMBINATION" por Crameri et al., patentes de Estados Unidos núm. 6.319.714; 6.368.861; 6.376.246; 6.423.542; 6.426.224 y PCT/US00/01203; "USE OF CODON-VARIED OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS FOR SYNTHETIC SHUFFLING" por Welch et al., patente de Estados Unidos núm. 6.436.675; "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" por Selifonov et al., presentada el 18 de enero de 2000, (PCT/US00/01202) y, p. ej., "METHODS FOR MAKING CHARACTER STRINGS, POLYNUCLEOTIDES & POLYPEPTIDES HAVING DESIRED CHARACTERISTICS" por Selifonov et al., presentada el 18 de julio de 2000 (serie de Estados Unidos núm. 09/618.579); "METHODS OF POPULATING DATA STRUCTURES FOR USE IN EVOLUTIONARY SIMULATIONS" por Selifonov y Stemmer, presentada el 18 de junio de 2000 (PCT/US00/01 138); y "SINGLE-STRANDED NUCLEIC ACID TEMPLATE-MEDIATED RECOMBINATION AND NUCLEIC ACID FRAGMENT ISOLATION" por Affholter, presentada el 6 de septiembre de 2000 (serie de EE. UU. núm. 09/656.549); y las patentes de Estados Unidos núm. 6.177.263; 6.153.410.

Se usan los métodos no estocásticos o de "evolución dirigida" que incluyen, p. ej., gene site saturation mutagenesisSM (GSSMSM), re-ensamblaje de ligadura sintético (SLR o GeneReassembly), o una de sus combinaciones para modificar los ácidos nucleicos descritos en este documento para generar hidrolasas con propiedades nuevas o alteradas (p. ej., actividad bajo condiciones altamente ácidas o alcalinas, altas temperaturas y similares). Los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos modificados se pueden estudiar para detectar una actividad antes de ensayarse para actividad proteolítica u otra. Se puede emplear cualquier modalidad o protocolo de ensayo, p. ej., usar una plataforma de ordenación capilar. Véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 6.361.974; 6.280.926; 5.939.250.

Mutagénesis de saturación, o tecnología GSSMSM

En un aspecto descrito en este documento, se usa modificación génica no estocástica, un "proceso de evolución dirigida" para generar hidrolasas y anticuerpos con propiedades nuevas o alteradas. Las variaciones de este método se han denominado "Mutagénesis de saturación del sitio génico", "mutagénesis de saturación del sitio", "mutagénesis de saturación" o simplemente "GSSMSM". Se puede usar en combinación con otros procesos de mutagenización. En un aspecto, se describen en el presente documento métodos para elaborar enzimas y anticuerpos usando tecnología GSSMSM, p. ej., como se describe en este documento y también en las patentes de Estados Unidos núm. 6.171.820; 6.579.258; 6.238.884.

En un aspecto, la tecnología GSSMSM comprende proporcionar un polinucleótido de molde y una pluralidad de oligonucleótidos, en donde cada oligonucleótido comprende una secuencia homóloga al polinucleótido de molde, dirigiendo así una secuencia específica del polinucleótido de molde, y una secuencia que es una variante del gen homólogo; generar polinucleótidos de descendencia que comprenden variaciones de secuencias no estocásticas replicando el polinucleótido de molde con los oligonucleótidos, generando así polinucleótidos que comprenden variaciones de secuencias génicas homólogas.

En un aspecto, se usan cebadores de codones que contienen una secuencia N,N,G/T degenerada para introducir mutaciones puntuales en un polinucleótido, como para generar un conjunto de polipéptidos de descendencia en los que una gama completa de sustituciones de aminoácidos simples está representada en cada posición de aminoácido, p. ej., un residuo de aminoácido en un sitio activo enzimático o sitio de unión al ligando dirigido para ser modificado. Estos oligonucleótidos pueden comprender una primera secuencia homóloga contigua, una secuencia N,N,G/T degenerada, y, opcionalmente, una segunda secuencia homóloga. Los productos de traducción de descendencia en dirección 3' a partir del uso de dichos oligonucleótidos incluyen todos los cambios de aminoácidos posibles en cada sitio de aminoácido a lo largo del polipéptido, porque la degeneración de la secuencia N,N,G/T incluye codones para los 20 aminoácidos. En un aspecto, uno de dichos oligonucleótidos degenerados (comprendido por, p. ej., un casete N,N,G/T degenerado) se usa para someter cada codón original en un molde de polinucleótidos parental a una amplia gama de sustituciones de codones. En otro aspecto, se usan por lo menos dos casetes degenerados – o bien en el mismo oligonucleótido o no, para someter por lo menos dos codones originales en un molde de polinucleótidos parental a una gama completa de sustituciones de codones. Por ejemplo, más de

una secuencia N,N,G/T puede estar contenida en un oligonucleótido para introducir mutaciones de aminoácidos en más de un sitio. Esta pluralidad de secuencias N,N,G/T puede ser directamente contigua, o estar separada por una o más secuencias adicionales. En otro aspecto, los oligonucleótidos que sirven para introducir adiciones o eliminaciones se pueden usar o bien solos o en combinación con los codones que contienen una secuencia N,N,G/T, para introducir cualquier combinación o permutación de adiciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos.

En un aspecto, se efectúa mutagénesis simultánea de dos o más posiciones de aminoácidos contiguos, usando un oligonucleótido que contiene tripletes N,N,G/T contiguos, es decir, una secuencia (N,N,G/T) degenerada. En otro aspecto, se usan casetes degenerados que tienen menos degeneración que la secuencia N,N,G/T. Por ejemplo, puede ser conveniente en algunos casos usar (p. ej., en un oligonucleótido) una secuencia triplete degenerada comprendida solamente por un N, en donde dicho N puede estar en la primera, segunda o tercera posición del triplete. Se puede usar cualquier otra base, incluida cualquier combinación y sus permutaciones en las dos posiciones restantes del triplete. Alternativamente, puede ser conveniente en algunos casos usar (p. ej., un oligo) una secuencia de triplete N,N,N degenerada.

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

En un aspecto, cada recipiente de reacción de mutagénesis de saturación contiene polinucleótidos que codifican por lo menos 20 moléculas de polipéptidos de descendencia (p. ej., hidrolasa, p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) de modo tal que los 20 aminoácidos naturales están representados en una posición de aminoácido específica correspondiente a la posición del codón mutagenizado en el polinucleótido parental (otros aspectos usan menos de las 20 combinaciones naturales). Los polipéptidos de descendencia degenerada de 32 pliegues generados a partir de cada recipiente de reacción de mutagénesis de saturación pueden someterse a ampliación clonal (p. ej., clonarse en un hospedante adecuado, p. ej., hospedante *E. coli*, usando, p. ej., un vector de expresión) y someterse a detección de expresión. Cuando un polipéptido de descendencia individual es identificado por detección por exhibir un cambio favorable en las propiedades (en comparación con el polipéptido parental, tal como mayor selectividad para hidrólisis de ésteres de palmitato frente a hidrólisis de ésteres de oleato), se puede secuenciar para identificar la correspondiente sustitución de aminoácidos favorables contenida allí.

En un aspecto, tras mutagenizar cada una de las posiciones de aminoácidos en un polipéptido parental usando la mutagénesis de saturación descrita en este documento, se pueden identificar cambios de aminoácidos favorables en más de una posición de aminoácido. Se pueden generar una o más moléculas de descendencia que contienen una combinación de todas o de parte de estas sustituciones de aminoácidos favorables. Por ejemplo, si se van a identificar 2 cambios de aminoácidos favorables específicos en cada una de las 3 posiciones de aminoácidos en un polipéptido, las permutaciones incluyen 3 posibilidades en cada posición (ningún cambio del aminoácido original, y cada uno de los dos cambios favorables) y 3 posiciones. Por consiguiente, hay $3 \times 3 \times 3$ o 27 posibilidades totales, incluidas 7 que se examinaron previamente - 6 mutaciones puntuales individuales (es decir, 2 en cada una de las tres posiciones) y ningún cambio en cualquier posición.

En otro aspecto, la mutagénesis de saturación del sitio se pueden usar junto con otro medio estocástico o no estocástico para variar la secuencia, p. ej., ensamblaje de ligadura sintética (véase a continuación), transposición, quimerización, recombinación y otros procesos de mutagénesis y agentes de mutagenización. Se describen en este documento procesos de mutagenización que incluyen mutagénesis de saturación, utilizada en un modo iterativo.

Re-ensamblaje de ligadura sintética (SLR)

Se describen sistemas de modificación de genes no estocásticos denominados "re-ensamblaje de ligadura sintética" o simplemente "SLR", también conocidos como tecnología "GeneReassembly", un "procedimiento de evolución dirigida" para generar polipéptidos, p. ej., las enzimas (tales como hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) o anticuerpos descritos en este documento, con propiedades nuevas o alteradas. SLR es un

método para ligar fragmentos de oligonucleótidos entre sí de manera no estocástica. Este método difiere de la transposición estocástica de oligonucleótidos en el sentido que los bloques de construcción no se transponen, concatenan o quimerizan aleatoriamente, sino que son ensamblados de manera no estocástica. Véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 6.773.900; 6.740.506; 6.713.282; 6.635.449; 6.605.449; 6.537.776.

- 5 En un aspecto, SLR comprende las siguientes etapas (a) proveer un polinucleótido de molde, en donde el polinucleótido de molde comprende la codificación de la secuencia de un gen homólogo; (b) proveer una pluralidad de polinucleótidos de bloques de construcción, en donde los polinucleótidos de bloques de construcción están diseñados para re-ensamblaje de entrecruzamiento con el polinucleótido de molde en una secuencia predeterminada, y un polinucleótido de bloques de construcción comprende una secuencia que es una variante del
- 10 gen homólogo y una secuencia homóloga al polinucleótido de molde que flanquea la secuencia variante; (c) combinar un polinucleótido de bloques de construcción con un polinucleótido de molde, de modo tal que el polinucleótido de bloques de construcción se re-ensambla cruzado con el polinucleótido de molde para generar polinucleótidos que comprenden variaciones de las secuencias génicas.

- 15 SLR no depende de la presencia de altos niveles de homología entre los polinucleótidos que se han de reordenar. Por consiguiente, este método puede usarse de forma no estocástica para generar genotecas (o conjuntos) de moléculas de descendencia comprendidas por más de 10^{100} quimeras distintas.

Se puede usar SLR para generar genotecas compuestas por más de 10^{1000} quimeras de descendencia distinta.

- 20 Se describen métodos no estocásticos para producir un conjunto de moléculas de ácido nucleico quiméricas finalizadas que tienen un orden de ensamblaje general que se elige por diseño. Este método incluye las etapas de generar por diseño una pluralidad de bloques de construcción de ácido nucleico específicos que tienen extremos ligables mutuamente compatibles útiles, y ensamblar estos bloques de construcción de ácido nucleico, de manera tal que se logre un orden de ensamblaje general diseñado.

- 25 Los extremos ligables mutuamente compatibles de los bloques de construcción de ácido nucleico que se han de ensamblar se consideran "útiles" para este tipo de ensamblaje ordenado si permiten que los bloques de construcción se acoplen en órdenes predeterminados. Por lo tanto, el orden de ensamblaje general en el que se pueden acoplar los bloques de construcción de ácido nucleico es especificado por el diseño de los extremos ligables. Si se ha de usar más de una etapa de ensamblaje, entonces el orden del ensamblaje general en el que los bloques de construcción de ácido nucleico pueden acoplarse se especifica también por el orden secuencial de la etapa o etapas de ensamblaje. En un aspecto, las piezas de construcción aneladas se tratan con una enzima, tal como una ligasa
- 30 (p. ej., T4 DNA ligasa), para lograr el enlace covalente de las piezas de construcción.

- En un aspecto, el diseño de los bloques de construcción de oligonucleótidos se obtiene analizando un conjunto de moldes de secuencias de ácido nucleico progenitor que sirve como base para producir un conjunto de descendencia de polinucleótidos quiméricos finalizados. Estos moldes de oligonucleótidos parentales sirven por lo tanto como
- 35 fuente de información de secuencias que ayuda en el diseño de los bloques de construcción de ácido nucleico que se van a mutagenizar, p. ej., quimerizar o transponer. En un aspecto de este método, las secuencias de una pluralidad de moldes de ácido nucleico parentales se alinean en orden para seleccionar uno o más puntos de demarcación. Los puntos de demarcación se pueden localizar en cualquier área de homología, y están comprendidos por uno o más nucleótidos. Estos puntos de demarcación están alternativamente compartidos por al menos dos de los moldes progenitores. Los puntos de demarcación pueden de esta forma usarse para delinear los
- 40 límites de los bloques de construcción del oligonucleótido que se van a generar para reordenar los polinucleótidos parentales. Los puntos de demarcación identificados y seleccionados en las moléculas progenitoras sirven como puntos de quimerización potencial en el ensamblaje de las moléculas de descendencia quimérica finales. Un punto de demarcación puede ser un área de homología (comprendida por lo menos por una base de nucleótidos homóloga) compartida por lo menos por dos secuencias de polinucleótidos parentales. Alternativamente, un punto de demarcación puede ser un área de homología compartida por al menos la mitad de las secuencias de polinucleótidos parentales, o puede ser un área de homología compartida por al menos dos tercios de las
- 45 secuencias de polinucleótidos parentales. Un punto de demarcación útil es un área de homología compartida por al menos tres cuartos de las secuencias de polinucleótidos parentales, o puede ser compartida por casi todas las secuencias de polinucleótido parentales. En un aspecto, un punto de demarcación es un área de homología compartida por todas las secuencias de polinucleótidos parentales.
- 50

- En un aspecto, un re-ensamblaje de ligadura se realiza exhaustivamente con el fin de generar una genoteca exhaustiva de polinucleótidos quiméricos de descendencia. En otros términos, todas las combinaciones ordenadas posibles de los bloques de construcción de ácido nucleico están representadas en el conjunto de moléculas de ácido nucleico quiméricas finalizadas. Simultáneamente, en otro aspecto, el orden de ensamblaje (es decir, el orden de
- 55 ensamblaje de cada bloque de construcción en la secuencia 5' a 3' de cada ácido nucleico quimérico finalizado) en cada combinación es por diseño (o no estocástico) como se describió anteriormente. Se describen métodos no estocásticos que reducen la posibilidad de productos secundarios no deseados.

En otro aspecto, el método de re-ensamblaje de ligadura se lleva a cabo en forma sistemática. Por ejemplo, el método se lleva a cabo con el fin de generar una genoteca sistemáticamente compartimentalizada de moléculas de

descendencia, con compartimientos que pueden detectarse sistemáticamente, p. ej., uno por uno. Se describen en este documento métodos que comprenden el uso selectivo y juicioso de bloques de construcción de ácido nucleico específicos, acoplados con el uso selectivo y juicioso de reacciones de ensamblaje de etapas secuenciales; se puede lograr un diseño en el que se preparan conjuntos específicos de productos de descendencia en cada uno de los diversos recipientes de reacción. Esto permite que se efectúe un examen sistemático y un procedimiento de detección. Por consiguiente, estos métodos permiten que se examine sistemáticamente un número potencialmente muy grande de moléculas de descendencia en grupos más pequeños. Dada su capacidad de efectuar quimerizaciones en un modo altamente flexible pero incluso exhaustivo y sistemático, particularmente cuando hay un bajo nivel de homología entre las moléculas progenitoras, estos métodos proporcionan la generación de una genoteca (o conjunto) comprendido por un gran número de moléculas de descendencia. Debido a la naturaleza no estocástica de los presentes métodos de re-ensamblaje de ligadura, las moléculas de descendencia generadas pueden comprender una genoteca de moléculas de ácido nucleico quiméricas finalizadas que tienen un orden de ensamblaje general que se elige por diseño.

Los métodos de mutagénesis de saturación y evolución dirigida optimizada también se pueden utilizar para generar especies moleculares de distinta descendencia.

En un aspecto, los métodos de este documento proporcionan libertad de elección y control con respecto a la selección de puntos de demarcación, el tamaño y el número de los bloques de construcción de ácido nucleico y el tamaño y diseño de acoplamientos. El requerimiento para homología intermolecular puede ser altamente relajado. De hecho, los puntos de demarcación pueden incluso elegirse en áreas de poca o ninguna homología intermolecular. Por ejemplo, debido al titubeo del codón, es decir la degeneración de codones, las sustituciones de nucleótidos pueden introducirse en los bloques de ácido nucleico sin alterar el aminoácido originalmente codificado en el correspondiente molde progenitor. Alternativamente, un codón puede alterarse de modo tal que se altere la codificación de un aminoácido original. En un aspecto, las sustituciones pueden introducirse en el bloque de construcción con el fin de incrementar la incidencia de puntos de demarcación homólogos intermoleculares y por lo tanto permitir un aumento en el número de acoplamientos que se han de lograr entre los bloques de construcción, que a su vez permite que se genere un mayor número de moléculas quiméricas de descendencia.

En otro aspecto, la naturaleza sintética de la etapa en la que se generan los bloques de construcción permite el diseño y la introducción de nucleótidos (p. ej., uno o más nucleótidos, que pueden ser, por ejemplo, codones o intrones o secuencias reguladoras) que pueden posteriormente eliminarse opcionalmente en un procedimiento *in vitro* (p. ej., por mutagénesis) o en un procedimiento *in vivo* (p. ej., utilizando capacidad de empalme de genes de un organismo hospedante). Se apreciará que en muchos casos la introducción de estos nucleótidos puede ser conveniente por muchos motivos, además del beneficio potencial de crear un punto de demarcación útil.

En un aspecto, un bloque de construcción de ácido nucleico se utiliza para introducir un intrón. Por consiguiente, los intrones funcionales se introducen en un gen artificial fabricado de acuerdo con los métodos descritos en este documento. El intrón o los intrones introducidos artificialmente pueden ser funcionales en células hospedantes para empalme de genes de manera muy similar a los intrones naturales que sirven funcionalmente en el empalme de genes.

Sistema de evolución dirigida, optimizada

Se describen en este documento sistemas de modificación de genes no estocásticos denominados "sistema de evolución dirigida optimizada" para generar hidrolasas y anticuerpos con propiedades nuevas o alteradas. La evolución dirigida optimizada se refiere al uso de ciclos repetidos de reclasificación reductora, recombinación y selección, que permiten la evolución molecular dirigida de ácidos nucleicos a través de recombinación. La evolución dirigida optimizada permite la generación de una gran población de secuencias quiméricas evolucionadas, en donde la población generada se enriquece significativamente para secuencias que tienen un número predeterminado de eventos de entrecruzamiento.

Un evento de entrecruzamiento es un punto en una secuencia quimérica en donde ocurre un desplazamiento desde una variante parental hacia otra variante parental. Dicho punto está normalmente en la coyuntura de donde los oligonucleótidos de dos compuestos originales que se ligan entre sí para formar una sola secuencia. Este método permite el cálculo de las concentraciones correctas de secuencias de oligonucleótidos para que la población quimérica final de secuencias se enriquezca para el número elegido de eventos de entrecruzamiento. Esto ofrece más control para elegir las variantes quiméricas que tienen un número predeterminado de eventos de entrecruzamiento.

Además, este método ofrece una forma conveniente de explorar una enorme cantidad de espacio de variante de proteína posible en comparación con otros sistemas. Previamente, si uno generaba, por ejemplo, 10 moléculas quiméricas durante una reacción, era extremadamente difícil ensayar un número tan alto de variantes quiméricas para una actividad particular. A su vez, una porción importante de la población de descendencia tenía un alto número de eventos de entrecruzamiento que resultaba en proteínas que tenían menor probabilidad de tener niveles aumentados de una actividad particular. Con el uso de estos métodos, la población de moléculas quiméricas puede enriquecerse para aquellas variantes que tienen un número particular de eventos de entrecruzamiento. Por lo tanto,

si bien uno todavía puede generar 10^{13} moléculas químéricas durante una reacción, cada una de las moléculas elegidas para análisis posterior muy probablemente tendrá, por ejemplo, solamente tres eventos de entrecruzamiento. Dado que la población de descendencia resultante puede sesgarse para tener un número predeterminado de eventos de entrecruzamiento, se reducen los límites en la variedad funcional entre las moléculas químéricas. Esto ofrece un número más manejable de variables al calcular qué oligonucleótido de los polinucleótidos parentales originales podría ser responsable de afectar un rasgo particular.

Un método para crear una secuencia de polinucleótidos de descendencia química consiste en crear oligonucleótidos correspondientes a fragmentos o porciones de cada secuencia parental.

Cada oligonucleótido incluye una región única de superposición de modo que el mezclado de los oligonucleótidos entre sí resulte en una nueva variante que tenga cada fragmento de oligonucleótido ensamblado en el orden correcto. Alternativamente, los protocolos para practicar los métodos descritos en este documento se hallan en las patentes de Estados Unidos núm. 6.773.900; 6.740.506; 6.713.282; 6.635.449; 6.605.449; 6.537.776; 6.361.974.

El número de oligonucleótidos generado para cada variante parental tiene una relación con el número total de entrecruzamientos resultantes en la molécula química que se crea en último lugar. Por ejemplo, se podrían proporcionar tres variantes de secuencias de nucleótido parentales para someterse a una reacción de ligadura con el fin de encontrar una variante química que tenga, por ejemplo, mayor actividad a alta temperatura. Como ejemplo, se puede generar un conjunto de 50 secuencias de oligonucleótidos correspondiente a cada una de las porciones de cada variante parental. Por consiguiente, durante el proceso de re-ensamblaje de ligadura podría haber hasta 50 eventos de entrecruzamiento dentro de cada una de las secuencias químéricas. La probabilidad de que cada uno de los polinucleótidos químéricos generados contenga oligonucleótidos de cada variante parental en orden alterno es muy baja. Si cada fragmento de oligonucleótido está presente en la reacción de ligadura en la misma cantidad molar, es probable que en algunas posiciones, los oligonucleótidos del mismo polinucleótido parental se ligan entre sí y por lo tanto no se produzca un evento de entrecruzamiento. Si la concentración de cada oligonucleótido de cada variante parental se mantiene constante durante alguna etapa de ligadura en este ejemplo, hay 1/3 de probabilidad (suponiendo 3 variantes parentales) de que un oligonucleótido de la misma variante parental se ligue dentro de la secuencia química y no produzca entrecruzamiento.

Por ende, se puede determinar una función de densidad de probabilidad (PDF) para predecir la población de eventos de entrecruzamiento que probablemente ocurrirán durante cada etapa en una reacción de ligadura dado un número determinado de variantes parentales, un número de oligonucleótidos correspondientes a cada variante, y las concentraciones de cada variante durante cada etapa de la reacción de ligadura. La estadística y la matemática detrás de determinar la PDF se describe a continuación. Utilizando estos métodos, se puede calcular dicha función de densidad de probabilidad y por lo tanto enriquecer la población de descendencia química para un número predeterminado de eventos de entrecruzamiento que resultan de una reacción de ligadura particular. Además, se puede predeterminar un número diana de eventos de entrecruzamiento, y el sistema puede luego programarse para calcular las cantidades de partida de cada oligonucleótido parental durante cada etapa en la reacción de ligadura para dar como resultado una función de densidad de probabilidad que se centra en el número predeterminado de eventos de entrecruzamiento. Estos métodos se refieren al uso de ciclos repetidos de reclasificación reductora, recombinación y selección que permiten la evolución molecular dirigida de un ácido nucleico que codifica un polipéptido a través de recombinación. Este sistema permite la generación de una gran población de secuencias químéricas evolucionadas, en donde la población generada es significativamente enriquecida para secuencias que tienen un número predeterminado de eventos de entrecruzamiento. Un evento de entrecruzamiento es un punto en una secuencia química en la que ocurre un desplazamiento en la secuencia desde una variante parental hacia otra variante parental. Dicho punto es normalmente en la situación en la que los oligonucleótidos de dos variantes parentales se ligan entre sí para formar una sola secuencia. El método permite el cálculo de las concentraciones correctas de secuencias de oligonucleótidos para que la población química final de secuencias se enriquezca para el número seleccionado de eventos de entrecruzamiento.

Esto proporciona más control sobre la elección de variantes químéricas que tienen un número predeterminado de eventos de entrecruzamiento.

Determinación de eventos de entrecruzamiento

Los aspectos descritos en este documento incluyen un sistema y un software que recibe una función de densidad de probabilidad (PDF) de entrecruzamiento deseada, el número de genes parentales que se va a re-ensamblar y el número de fragmentos en el re-ensamblaje como datos entrantes. Los resultados de este programa consisten en una "PDF de fragmentos" que se puede utilizar para determinar una fórmula para producir genes re-ensamblados, y la PDF de entrecruzamiento estimada de esos genes. El procesamiento descrito en este documento se realiza alternativamente en MATLAB™ (The Mathworks, Natick, Massachusetts) un lenguaje de programación y entorno de desarrollo para cómputos técnicos.

Procesos iterativos

Se describen procesos iterativos que pueden repetirse iterativamente. Por ejemplo, un ácido nucleico (el ácido nucleico) responsable de un fenotipo de anticuerpo o hidrolasa alterada se identifica, re-aísla, se modifica nuevamente y se re-ensaya para actividad. Este proceso puede repetirse iterativamente hasta que se modifica un fenotipo deseado. Por ejemplo, una ruta anabólica o catabólica bioquímica entera puede modificarse en una célula, incluida la actividad proteolítica.

De modo similar, si se determina que un oligonucleótido particular no tienen ningún efecto sobre el rasgo deseado (p. ej., un nuevo fenotipo de hidrolasa), puede eliminarse como una variable sintetizando oligonucleótidos parentales más largos que incluyen la secuencia que se ha de eliminar. Dado que incorporar la secuencia dentro de una secuencia más grande previene cualquier evento de entrecruzamiento, ya no habrá ninguna variación de esta secuencia en los polinucleótidos de descendencia. Esta práctica iterativa para determinar qué oligonucleótidos están más relacionados con el rasgo deseado, y cuáles no están relacionados, permite la exploración más eficiente de todas las variantes de proteína posibles que podrían proporcionar un rasgo o actividad particular.

Transposición *in vivo*

Se utiliza transposición *in vivo* de moléculas en los métodos descritos en este documento que proporcionan las variantes descritas de los polipéptidos descritos en esta memoria, p. ej., anticuerpos, hidrolasas y similares. La transposición *in vivo* se puede efectuar utilizando propiedades naturales de células para recombinar multímeros. Si bien la recombinación *in vivo* ha provisto la ruta natural principal a la diversidad molecular, la recombinación genética sigue siendo un proceso relativamente complejo que implica 1) el reconocimiento de homologías; 2) escisión de cadenas, invasión de cadenas y etapas metabólicas que conducen a la producción de quiasma recombinante; y finalmente 3) la resolución de quiasma en moléculas recombinadas discretas. La formación del quiasma requiere el reconocimiento de secuencias homólogas.

Se describen métodos para producir un polinucleótido híbrido de por lo menos un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido. Se describen métodos utilizados para producir un polinucleótido híbrido introduciendo por lo menos un primer polinucleótido y un segundo polinucleótido que comparten por lo menos una región de homología de secuencia parcial en una célula hospedante adecuada. Las regiones de homología de secuencia parcial promueven los procesos que resultan en la reorganización de secuencias produciendo un polinucleótido híbrido. En un aspecto, la expresión "polinucleótido híbrido" abarca cualquier secuencia de nucleótidos que resulta de un método descrito en esta memoria, y contiene una secuencia de por lo menos dos secuencias de polinucleótidos. Dichos polinucleótidos híbridos pueden resultar de eventos de recombinación intermoleculares que promueven la integración de secuencias entre moléculas de DNA. Además, dichos polinucleótidos híbridos pueden resultar de proceso de reclasificación reductora intramolecular que utilizan secuencias repetidas para alterar una secuencia de nucleótidos dentro de una molécula de DNA.

Producción de variantes de secuencia

Se describen métodos para preparar variantes de secuencias de las secuencias de ácido nucleico e hidrolasa, y anticuerpo descritas en la presente invención, para aislar hidrolasas que usan los ácidos nucleicos y polipéptidos descritos en este documento. Se describen variantes de un gen de hidrolasa descrito en este documento, que pueden alterarse mediante cualquier medio, incluidos, p. ej., métodos aleatorios o estocásticos, o no estocásticos o métodos de "evolución dirigida", como se describió anteriormente.

Se describen métodos para generar una variante de un ácido nucleico que codifica un polipéptido que tiene actividad de hidrolasa, p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, que comprenden las etapas de: (a) proveer un ácido nucleico de molde que comprende un ácido nucleico descrito en el presente documento; y (b) modificar, eliminar o añadir uno o más nucleótidos en la secuencia de molde, o su combinación, para generar una variante del ácido nucleico de molde. En un aspecto, el método puede además comprender expresar el ácido nucleico variante para generar una hidrolasa variante, p. ej., un polipéptido de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa. Las modificaciones, adiciones o eliminaciones se pueden introducir con un método que comprende PCR propenso a error, transposición, mutagénesis dirigida al oligonucleótido, PCR de ensamblaje, mutagénesis de PCR sexual, mutagénesis *in vivo*, mutagénesis casete, mutagénesis de conjunto recursiva, mutagénesis de conjunto exponencial, mutagénesis específica del sitio, Gene Site Saturation MutagenesisSM (GSSMSM), re-ensamblaje de ligadura sintética (SLR o GeneReassembly) o una de sus combinaciones. En otro aspecto, las modificaciones, adiciones o eliminaciones se introducen por un método que comprende recombinación, recombinación de secuencias recursiva, mutagénesis de DNA modificada con fosfotioato, mutagénesis de molde que contiene uracil, mutagénesis doble discontinua, mutagénesis de reparación de apareamiento erróneo puntual, mutagénesis de cepas hospedantes deficientes de reparación, mutagénesis química, mutagénesis radiogénica, mutagénesis de eliminación, mutagénesis de restricción-selección, mutagénesis de restricción-purificación, síntesis de genes artificiales, mutagénesis de conjunto, creación de multímeros de ácidos nucleicos quiméricos y una de sus combinaciones.

En un aspecto, el método puede repetirse en forma iterativa hasta que se produce una hidrolasa, p. ej., una lipasa, una saturasa, una palmitasa y/o una estearatasa que tiene una actividad alterada o distinta o una estabilidad alterada o distinta de aquella de un polipéptido codificado por el ácido nucleico de molde. En un aspecto, la hidrolasa

variante, p. ej., polipéptido de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa es termotolerante y retiene cierta actividad después de exponerse a una temperatura elevada. En otro aspecto, la hidrolasa variante, p. ej., polipéptido de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa posee mayor glucosilación en comparación con la hidrolasa, p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa codificada por un ácido nucleico de molde.

- 5 Alternativamente, la hidrolasa variante, p. ej., polipéptido de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa posee actividad de hidrolasa, p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa a alta temperatura, donde la hidrolasa, p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa codificada por el ácido nucleico de molde no es activa a alta temperatura. En un aspecto, el método puede repetirse iterativamente hasta que se produce una hidrolasa, p. ej., una secuencia que codifica una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa que tiene uso de un codón alterado de
10 aquel del ácido nucleico molde. En otro aspecto, el método puede repetirse iterativamente hasta que se produce un gen de hidrolasa, p. ej., un gen de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, que tiene niveles superiores o inferiores de expresión de mensaje o estabilidad de aquel del ácido nucleico molde. En otro aspecto, la formulación del producto de hidrolasa final, p. ej., producto de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, permite un incremento o una modulación del rendimiento de la hidrolasa, p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa en el producto.
- 15 Las variantes aisladas pueden ocurrir naturalmente. Las variantes también pueden crearse *in vitro*. Las variantes pueden crearse usando técnicas de modificación genética tales como mutagénesis dirigida al sitio, mutagénesis química aleatoria, procedimientos de eliminación de Exonucleasa III y técnicas de clonación estándar. Alternativamente, dichas variantes, fragmentos, análogos o derivados se pueden crear usando procedimientos de síntesis química o de modificación. Otros métodos para preparar variantes también serán familiares para el experto
20 en la técnica. Éstos incluyen procedimientos en los que las secuencias de ácido nucleico obtenidas de aislamientos naturales se modifican para generar ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que tienen características que potencian su valor en aplicaciones industriales o de laboratorio. En dichos procedimientos, se genera y caracteriza una gran cantidad de secuencias variantes que tienen una o más diferencias de nucleótidos con respecto a la secuencia obtenida del aislamiento natural. Estas diferencias de nucleótidos pueden producir cambios de
25 aminoácidos con respecto a los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos de los aislamientos naturales.

Por ejemplos, las variantes pueden crearse usando PCR propenso a error. En PCR propenso a error, la reacción PCR se lleva a cabo bajo condiciones en las que la fidelidad de copiado de la DNA polimerasa es baja, de forma tal que se obtiene un alto índice de mutaciones puntuales en toda la longitud del producto PCR. PCR propenso a error se describe, p. ej., en Leung, D.W., et al., Technique, 1:11-15, 1989) y Caldwell, R. C. & Joyce G.F., PCR Methods
30 Applic., 2:28-33, 1992. En síntesis, en dichos procedimientos, los ácidos nucleicos que se van a mutagenizar se mezclan con cebadores PCR, tampón de reacción, MgCl₂, MnCl₂, Taq polimerasa y una concentración apropiada de dNTP para lograr un alto índice de mutación puntual en toda la longitud del producto PCR. Por ejemplo, la reacción se puede llevar a cabo usando 20 fmoles de ácido nucleico que se van a mutagenizar, 30 pmol de cada cebador PCR, un tampón de reacción que comprende KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM (pH 8,3) y 0,01% gelatina, MgCh 7 mM,
35 MnCh 0,5 mM, 5 unidades de Taq polimerasa, dGTP 0,2 mM, dATP 0,2 mM, dCTP 1 mM y dTTP 1 mM. La reacción PCR se puede llevar a cabo por 30 ciclos de 94°C durante 1 min, 45°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. Sin embargo, se ha de apreciar que estos parámetros pueden ser modificados según corresponda. Los ácidos nucleicos mutagenizados se clonan en un vector apropiado y se evalúan las actividades de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos mutagenizados.

40 Las variantes pueden también crearse usando mutagénesis dirigida al oligonucleótido para generar mutaciones específicas del sitio en cualquier DNA clonado de interés. La mutagénesis de oligonucleótidos se describe, p. ej., en Reidhaar-Olson (1988) Science 241:53-57. En resumen, en dichos procedimientos, una pluralidad de oligonucleótidos bicatenarios que portan una o más mutaciones que se introducirán en el DNA clonado se sintetizan e insertan en el DNA clonado que se va a mutagenizar.

45 Clones que contienen el DNA mutagenizado se recuperan y se evalúan las actividades de los polipéptidos que codifican.

Otro método para generar variantes es PCR de ensamblaje. La reacción PCR de ensamblaje implica el ensamblaje de un producto PCR de una mezcla de pequeños fragmentos de DNA. Ocurre una gran cantidad de reacciones PCR distintas en paralelo en el mismo vial, donde los productos de una reacción ceban los productos de otra reacción. La
50 reacción PCR de ensamblaje se describe, p. ej., en la patente de Estados Unidos núm. 5.965.408.

Incluso otro método para generar variantes es la mutagénesis de PCR sexual. En la mutagénesis de PCR sexual, la recombinación homóloga forzada ocurre entre moléculas de DNA de secuencias de DNA diferentes pero altamente relacionadas *in vitro*, como consecuencia de fragmentación aleatoria de la molécula de DNA basada en homología de secuencia, seguida por fijación del entrecruzamiento por extensión de cebadores en una reacción PCR. La
55 mutagénesis PCR sexual se describe, p. ej., en Stemmer (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-10751. En síntesis, en dichos procedimientos, una pluralidad de ácidos nucleicos que se han de recombinar se digieren con DNase para generar fragmentos que tienen un tamaño de 50-200 nucleótidos. Los fragmentos del tamaño promedio deseado se purifican y resuspenden en una mezcla PCR. La reacción PCR se lleva a cabo bajo condiciones que facilitan la recombinación entre los fragmentos de ácido nucleico. Por ejemplo, la reacción PCR puede llevarse a
60 cabo resuspendiendo los fragmentos purificados a una concentración de 10-30 ng/l en una disolución de 0,2 mM de

cada dNTP, MgCl₂ 2,2 mM, KCl 50 mM, Tris HCl 10 mM, pH 9,0 y 0,1% Triton X-100. Se añaden 2,5 unidades de Taq polimerasa por 100:1 de mezcla de reacción y se lleva a cabo PCR usando el siguiente régimen: 94°C durante 60 segundos, 94°C durante 30 segundos, 50-55°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos (30-45 veces) y 72°C durante 5 minutos. No obstante, se ha de apreciar que estos parámetros pueden variar según corresponda. En algunos aspectos, los oligonucleótidos pueden incluirse en las reacciones PCR. En otros aspectos, el fragmento Klenow de DNA polimerasa I se puede usar en un primer conjunto de reacciones PCR y se puede usar Taq polimerasa en un conjunto subsiguiente de reacciones PCR. Las secuencias recombinantes se aíslan y se evalúan las actividades de los polipéptidos que codifican.

Las variantes pueden también crearse por mutagénesis *in vivo*. En algunos aspectos, las mutaciones aleatorias en una secuencia de interés se generan propagando la secuencia de interés en una cepa bacteriana, tal como una cepa de *E. coli*, que porta mutaciones en una o más de las rutas de reparación de DNA. Dichas cepas “mutadoras” tienen un índice de mutación aleatoria superior que una variante parental de tipo salvaje. La propagación del DNA en una de estas cepas eventualmente generará mutaciones aleatorias dentro del DNA. Las cepas mutadoras adecuadas para uso en mutagénesis *in vivo* se describen, p. ej., en la publicación PCT núm. WO 91/16427.

Las variantes pueden también generarse usando mutagénesis casete. En la mutagénesis casete, una pequeña región de una molécula de DNA bicatenario se reemplaza con un “casete” de oligonucleótido sintético que difiere de la secuencia nativa. El oligonucleótido a menudo contiene la secuencia nativa completa y/o parcialmente aleatorizada.

La mutagénesis de conjunto recursiva también se puede emplear para generar variantes. La mutagénesis de conjunto recursiva es un algoritmo para modificación de proteínas (mutagénesis de proteínas) desarrollado para producir diversas poblaciones de mutantes fenotípicamente relacionados cuyos miembros difieren en secuencia de aminoácidos. Este método usa un mecanismo de retroalimentación para controlar tandas sucesivas de mutagénesis casete combinatoria. La mutagénesis de conjunto recursiva se describe, p. ej., en Arkin (1992) Proc. Nad. Acad. Sci. USA 89:7811-7815.

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

En algunos aspectos, las variantes se crean usando procedimientos de transposición, en donde porciones de una pluralidad de ácidos nucleicos que codifican distintos polipéptidos se condensan entre sí para crear secuencias de ácido nucleico químicas que codifican polipéptidos quiméricos como se describe en, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 5.965.408; 5.939.250.

Se describen variantes de polipéptidos que comprenden secuencias en las que no más de los residuos de aminoácidos (p. ej., de un polipéptido ilustrativo, p. ej., SEC ID NÚM:2, SEC ID NO:4, SEC ID NÚM:6, SEC ID NÚM:8, SEC ID NÚM:10, SEC ID NÚM:12, SEC ID NÚM:14, SEC ID NÚM:16, SEC ID NÚM:18 o SEC ID NÚM:20 o SEC ID NÚM:2 que tienen una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (varias) o todas las variaciones de aminoácidos descritas en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, o su equivalente) se sustituyen con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (p. ej., un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede o no ser uno codificado por el código genético. Las sustituciones conservadoras son aquellas que sustituyen un aminoácido determinado en un polipéptido por otro aminoácido de características similares. Por ende, los polipéptidos descritos en este documento incluyen aquellos con sustituciones conservadoras de secuencias, p. ej., las secuencias ilustrativas descritas en el presente documento (p. ej., SEC ID NÚM:2, SEC ID NÚM:4, SEC ID NÚM:6, SEC ID NÚM:8, SEC ID NÚM:10, SEC ID NÚM:12, SEC ID NÚM:14, SEC ID NÚM:16, SEC ID NÚM:18 o SEC ID NO:20 o SEC ID NÚM:2 que tienen una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (varias) o todas las variaciones de aminoácidos descritas en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, o su equivalente), incluidos, aunque sin limitarse a ello, los siguientes reemplazos: reemplazos de un aminoácido alifático tal como alanina, valina, leucina e isoleucina con otro aminoácido alifático; reemplazo de una serina con una treonina o viceversa; reemplazo de un residuo ácido tal como ácido aspártico y ácido glutámico con otro residuo ácido; reemplazo de un residuo que porta un grupo amida, tal como asparagina y glutamina, con otro residuo que porta un grupo amida; intercambio de un residuo básico tal como lisina y arginina con otro residuo básico; y reemplazo de un residuo aromático tal como fenilalanina, tirosina o triptófano con otro residuo aromático. Otras variantes son aquellas en las que uno o más de los residuos de aminoácidos de los polipéptidos descritos en este documento incluyen un grupo sustituyente.

Otras variantes descritas en este documento son aquellas en las que el polipéptido se asocia con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido, por ejemplo, polietilenglicol. Las variantes adicionales descritas en este documento son aquellas en las que aminoácidos adicionales se condensan al polipéptido, tal como una secuencia líder, una secuencia segregante, una secuencia de proproteína o una secuencia que facilita la purificación, enriquecimiento o estabilización del polipéptido. En algunos aspectos, las variantes,

fragmentos, derivados y análogos de los polipéptidos descritos en este documento retienen la misma función o actividad biológica que los polipéptidos ilustrativos, p. ej., una actividad proteolítica, como se describe en el presente documento. En otros aspectos, la variante, fragmento, derivado o análogo incluye una proproteína, de modo tal que la variante, fragmento, derivado o análogo puede activarse por escisión de la porción de la proproteína para producir un polipéptido activo.

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

Se describen métodos para modificar ácidos nucleicos que codifican hidrolasa para modificar el uso de codones. Se describen métodos para modificar codones en un ácido nucleico que codifica una hidrolasa para aumentar o reducir su expresión en una célula hospedante, p. ej., una célula bacteriana, de insecto, de mamífero, de levadura o vegetal. También se describen ácidos nucleicos que codifican una hidrolasa modificada para aumentar su expresión en una célula hospedante, la hidrolasa así modificada, y métodos para elaborar las hidrolasas modificadas. El método comprende identificar un codón “no preferido” o uno “menos preferido” en ácido nucleico que codifica hidrolasa y reemplazar uno o más de estos codones no preferidos o menos preferidos con un “codón preferido” que codifica el mismo aminoácido que el codón reemplazado y por lo menos un codón no preferido o menos preferido en el ácido nucleico que ha sido reemplazado por un codón preferido que codifica el mismo aminoácido. Un codón preferido es un codón sobrerrepresentado en secuencias codificantes en genes de la célula hospedante y un codón no preferido o menos preferido es un codón subrepresentado en las secuencias codificantes en genes de la célula hospedante.

Las células hospedantes para expresar los ácidos nucleicos, casetes de expresión y vectores descritos en esta memoria incluyen células bacterianas, de levadura, de hongos, células vegetales, células de insectos y células mamíferas.

Se describen métodos para optimizar el uso de codones en todas estas células, ácidos nucleicos alterados por codones y polipéptidos elaborados por los ácidos nucleicos alterados por codones. Las células hospedantes ilustrativas incluyen bacterias gramnegativas, tales como *Escherichia coli* y *Pseudomonas fluorescens*; bacterias grampositivas, tales como *Lactobacillus gasseri*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus cremoris*, *Bacillus subtilis*. Las células hospedantes ilustrativas también incluyen organismos eucariotas, p. ej., diversas levaduras tales como la especie *Saccharomyces*., incluidas *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichiapastoris* y *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Aspergillus niger*, y células y líneas celulares mamíferas, y células y líneas celulares de insectos. Otras células hospedantes ilustrativas incluyen células bacterianas, tales como *E. coli*, *Streptomyces*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, células fúngicas, tales como *Aspergillus*, de levadura tales como cualquier especie de *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Schwanniomyces*, incluyendo *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* o *Schizosaccharomyces pombe*, células de insecto tales como *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*, células animales tales como CHO, COS o melanoma Bowes y adenovirus. La selección de un hospedante apropiado está dentro de las capacidades del experto en la técnica. Se describen ácidos nucleicos y polipéptidos optimizados para expresión en estos organismos y especies.

Por ejemplo, los codones de un ácido nucleico que codifica una hidrolasa aislada de una célula bacteriana se modifican de forma tal que el ácido nucleico se expresa de manera óptima en una célula bacteriana diferente a las bacterias de las cuales deriva la hidrolasa, una célula de levadura, hongo o planta, una célula de insecto o una célula mamífera. Los métodos para optimizar codones se conocen en la técnica, véanse, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 5.795.737; Baca (2000) Int. J. Parasitol. 30:113-118; Hale (1998) Protein Expr. Purif. 12:185-188; Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253. Véase también Narum (2001) Infect. Immun. 69:7250-7253, que describe la optimización de codones en sistemas de ratón; Outchkourov (2002) Protein Expr. Purif. 24:18-24, que describe la optimización de codones en levadura; Feng (2000) Biochemistry 39:15399-15409, que describe la optimización de codones en *E. coli*; Humphreys (2000) Protein Expr. Purif. 20:252-264, que describe que la optimización del uso de codones afecta la segregación en *E. coli*.

Animales no humanos transgénicos

Se describen animales no humanos transgénicos que comprenden un ácido nucleico, un polipéptido (p. ej., una hidrolasa o un anticuerpo descritos en la presente invención), un casete de expresión, un vector, una célula transfectada o transformada descrita en la presente invención. Los animales no humanos transgénicos pueden ser, p. ej., cabras, conejos, ovejas, cerdos, vacas, ratas y ratones, que comprenden los ácidos nucleicos descritos en esta memoria. Estos animales se pueden usar, p. ej., como modelos *in vivo* para estudiar la actividad de hidrolasa, o como modelos para detectar agentes que cambian la actividad de la hidrolasa *in vivo*. Las secuencias codificantes para los polipéptidos que se han de expresar en los animales transgénicos no humanos se pueden diseñar para ser constitutivas, o bajo el control de factores reguladores de transcripción inducibles o específicos de desarrollo o específicos de tejido. Los animales no humanos transgénicos se pueden diseñar y generar usando cualquier método conocido en la técnica; véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 6.211.428; 6.187.992; 6.156.952; 6.118.044; 6.111.166; 6.107.541; 5.959.171; 5.922.854; 5.892.070; 5.880.327; 5.891.698; 5.639.940; 5.573.933; 5.387.742; 5.087.571, que describen la preparación y el uso de células y huevos transformados, y ratones, ratas, conejos, ovejas, cerdos y vacas transgénicos. Véase también, p. ej., Pollock (1999) J. Immunol. Methods 231:147-157, que describe la producción de proteínas recombinantes en la leche de animales transgénicos lecheros; Baguisi

(1999) Nat. Biotechnol. 17:456-461, que demuestra la producción de cabras transgénicas. La patente de Estados Unidos núm. 6.211.428 describe la elaboración y el uso de mamíferos no humanos transgénicos que expresan en sus cerebros un constructo de ácido nucleico que comprende una secuencia de DNA. La patente de Estados Unidos núm. 5.387.742 describe la inyección de secuencias de DNA sintético o recombinante clonado a embriones de ratón fertilizados, implantando los embriones en hembras pseudo-preñadas, y desarrollando hasta término ratones transgénicos cuyas células expresan proteínas relacionadas con la patología de la enfermedad de Alzheimer. La patente de Estados Unidos núm. 6.187.992, describe la elaboración y el uso de ratones transgénicos cuyo genoma comprende una ruptura del gen que codifica la proteína precursora amiloide (APP).

También pueden emplearse “animales con genes inactivados” para poner en práctica los métodos descritos en esta memoria. Por ejemplo, en un aspecto, los animales transgénicos o modificados descritos en el presente documento comprenden un “animal con genes inactivados”, p. ej., un “ratón con genes inactivados”, modificado para no expresar un gen endógeno, que se reemplaza con un gen que expresa una hidrolasa, o una proteína de fusión que comprende una hidrolasa descrita en este documento. Como se observó precedentemente, los genes inactivados funcionales también se pueden generar usando secuencias antisentido descritas en este documento, p. ej., moléculas de RNAi bicatenarias.

Plantas y semillas transgénicas

Se describen plantas y semillas transgénicas que comprenden un ácido nucleico, un polipéptido (p. ej., una hidrolasa o un anticuerpo descritos en este documento), un casete de expresión o vector, o una célula transfectada o transformada descrita en la presente invención. La planta transgénica puede ser dicotiledónea o monocotiledónea. Se describen métodos para preparar y usar las plantas y semillas transgénicas. La planta transgénica o célula vegetal que expresa un polipéptido descrito en este documento se puede interpretar de acuerdo con cualquier método conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 6.309.872.

Los ácidos nucleicos y constructos de expresión descritos en este documento se pueden introducir en una célula vegetal a través de cualquier medio. Por ejemplo, los ácidos nucleicos o constructos de expresión se pueden introducir en el genoma de un hospedante vegetal deseado, o los ácidos nucleicos o constructos de expresión pueden ser episomas. La introducción en el genoma de una planta deseada puede ser tal que la producción de hidrolasa del hospedante se regule por elementos de control de traducción o transcripción endógenos. Se describen “plantas con genes inactivados” en donde la inserción de la secuencia génica, p. ej., por recombinación homóloga, ha perturbado expresión del gen endógeno. Los medios para generar plantas “con genes inactivados” se conocen en la técnica, véase, p. ej., Strepp (1998) Proc Natl. Acad. Sci. USA 95:4368-4373; Miao (1995) Plant J 7:359-365. Véase el análisis sobre plantas transgénicas a continuación.

Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento se pueden utilizar para conferir rasgos deseados esencialmente a cualquier planta, p. ej., plantas que producen semillas de aceite, incluyendo salvado de arroz, colza, girasol, oliva, palma o soja, y similares, o a plantas que producen glucosa o almidón, tales como maíz, patata, trigo, arroz, cebada y similares. Los ácidos nucleicos que se describen en este documento se pueden usar para manipular rutas metabólicas de una planta con el fin de optimizar o alterar la expresión del hospedante de una hidrolasa o sustrato o producto de una hidrolasa, p. ej., un aceite, un lípido, tal como un mono-, di- o tri-acilglicérido y similar. Pueden alterar las relaciones de lípidos, conversión de lípidos y recambio en una planta. Esto puede facilitar el procesamiento industrial de una planta. Alternativamente, las hidrolasas descritas en esta memoria pueden usarse en la producción de una planta transgénica para producir un compuesto producido no naturalmente por esa planta. Esto puede reducir los costes de producción o crear un nuevo producto.

En un aspecto, la primera etapa en la producción de una planta transgénica implica elaborar un constructo de expresión para expresión en una célula vegetal. Estas técnicas se conocen en la materia. Pueden incluir seleccionar y clonar un promotor, una secuencia codificante para facilitar la unión eficiente de ribosomas a mRNA y seleccionar las secuencias finalizadoras apropiadas del gen.

Un promotor constitutivo ilustrativo es CaMV35S, del virus mosaico de coliflor, que generalmente resulta en un alto grado de expresión en plantas. Otros promotores son más específicos y responden a pistas en el entorno interno o externo de la planta. Un promotor inducible de luz ilustrativo es el promotor del gen cab, que codifica la proteína de unión a clorofila a/b.

En un aspecto, el ácido nucleico se modifica para lograr mayor expresión en una célula vegetal. Por ejemplo, una secuencia descrita en este documento es propensa a tener un porcentaje mayor de pares de nucleótidos A-T en comparación con aquella en una planta, una de las cuales prefieren pares de nucleótidos G-C.

En consecuencia, los nucleótidos A-T en la secuencia codificante se pueden sustituir con nucleótidos G-C sin cambiar significativamente la secuencia de aminoácidos para mejorar la producción del producto génico en células vegetales.

El gen marcador seleccionable se puede añadir al constructo génico para identificar células o tejidos vegetales que han integrado exitosamente el transgen. Esto puede ser necesario porque lograr la incorporación y expresión de genes en células vegetales es un evento raro, que ocurre en solamente un pequeño porcentaje de los tejidos o

células direccionados. Los genes marcadores seleccionables codifican proteínas que proporcionan resistencia a agentes que normalmente son tóxicos para las plantas, tal como antibióticos o herbicidas. Solamente las células vegetales que tienen integrado el gen marcador seleccionable sobreviven cuando se desarrollan en un medio que contiene el antibiótico o herbicida apropiado. En cuanto a los genes insertados, los genes marcadores también requieren secuencias promotoras y de terminación para el correcto funcionamiento.

En un aspecto, la producción de plantas o semillas transgénicas comprende incorporar las secuencias descritas en este documento y, opcionalmente, genes marcadores en un constructo de expresión diana (p. ej., un plásmido, un fago), junto con posicionamiento de secuencias promotoras y terminadoras. Esto puede implicar transferir el gen modificado en la planta a través de un método adecuado. Por ejemplo, un constructo puede introducirse directamente en el DNA genómico de la célula vegetal usando técnicas tales como electroporación y microinyección de protoplastos de células vegetales, o los constructos pueden introducirse directamente al tejido vegetal usando métodos balísticos, tales como bombardeo de partículas de DNA. Por ejemplo, véase, p. ej., Christou (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:197-203; Pawlowski (1996) *Mol. Biotechnol.* 6:17-30; Klein (1987) *Nature* 327:70-73; Takumi (1997) *Genes Genet. Syst.* 72:63-69, que analiza el uso de bombardeo de partículas para introducir transgenes en trigo, y Adam (1997) *supra*, para uso de bombardeo de partículas para introducir YAC en células vegetales. Por ejemplo, Rinehart (1997) *supra*, usaron bombardeo de partículas para generar plantas de algodón transgénicas. Los aparatos para acelerar partículas se describen en la patente de Estados Unidos núm. 5.015.580; y el instrumento para aceleración de partículas comercialmente disponible BioRad (Biolistics) PDS-2000; véanse también, John, patente de Estados Unidos núm. 5.608.148; y Ellis, patente de Estados Unidos núm. 5.681.730, que describe la transformación de gimnospermas mediada por partículas.

En un aspecto, los protoplastos pueden inmovilizarse e inyectarse con ácidos nucleicos, p. ej., un constructo de expresión. Si bien la regeneración de la planta de protoplastos no es sencilla con cereales, la regeneración de la planta es posible en legumbres usando embriogénesis somática de callo derivado de protoplasto. Los tejidos organizados pueden transformarse con DNA desnudo usando técnica de pistola de genes, en donde el DNA se recubre con microproyectiles de tungsteno, disparo 1/100 el tamaño de las células, que portan el DNA profundo en las células y organelos. El tejido transformado es luego inducido a regenerarse, usualmente por embriogénesis somática. Esta técnica ha sido exitosa en varias especies de cereales que incluyen maíz y arroz.

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

Alternativamente, los ácidos nucleicos, p. ej., un constructo de expresión, pueden combinarse con regiones flanqueantes de T-DNA adecuadas e introducirse en un vector hospedante de *Agrobacterium tumefaciens* convencional. Las funciones de virulencia del hospedante *Agrobacterium tumefaciens* dirigirán la inserción del constructo y marcador adyacente en el DNA de la célula hospedante cuando la célula es infectada por la bacteria. Las técnicas de transformación mediadas por *Agrobacterium tumefaciens*, incluidos el desarmado y el uso de vectores binarios, se describen en la bibliografía científica. Véase, p. ej., Horsch (1984) *Science* 233:496-498; Fraley (1983) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 80:4803 (1983); *Gene Transfer to Plants*, Potrykus, ed. (Springer-Verlag, Berlín 1995). El DNA en una célula de *A. tumefaciens* está contenido en el cromosoma bacteriano como también en otra estructura conocida como plásmido Ti (inductor de tumor). El plásmido Ti contiene un fragmento de DNA denominado T-DNA (~20 kb de longitud) que se transfiere a la célula vegetal en el proceso de infección y una serie de genes vir (virulencia) que dirigen el proceso de infección. *A. tumefaciens* puede solamente infectar una planta a través de heridas: cuando la raíz o el tallo de una planta está lastimado, desprende ciertas señales químicas, en respuesta a las cuales, los genes vir de *A. tumefaciens* se activan y dirigen una serie de eventos necesarios para la transferencia del T-DNA del plásmido Ti al cromosoma de la planta. El T-DNA ingresa luego en la célula de la planta a través de la herida. Una especulación es que el T-DNA espera hasta que el DNA de la planta está siendo replicado o transcrito, entonces se inserta en el DNA de la planta expuesto. Con el fin de usar *A. tumefaciens* como vector transgénico, la sección inductora de tumor de T-DNA debe ser eliminada, mientras retiene las regiones limítrofes de T-DNA y los genes vir. El transgen se inserta luego entre las regiones limítrofes de T-DNA, en donde se transfiere a la célula vegetal y se integra a los cromosomas de la planta.

Se describen métodos para la transformación de plantas monocotiledóneas que usan los ácidos nucleicos descritos en este documento, incluidos importantes cereales, véase Hiei (1997) *Plant Mol. Biol.* 35:205-218. Véase también, p. ej., Horsch, *Science* (1984) 233:496; Fraley (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:4803; Thykjaer (1997) *supra*; Park (1996) *Plant Mol. Biol.* 32:1135-1148, que analiza la integración de T-DNA en DNA genómico. Véase también D'Halluin, patente de Estados Unidos núm. 5.712.135, que describe un proceso para la integración estable de un DNA que comprende un gen que es funcional en una célula de un cereal, u otra planta monocotiledónea.

En un aspecto, la tercera etapa puede implicar la selección y regeneración de las plantas enteras capaces de transmitir el gen diana incorporado a la siguiente generación. Dichas técnicas de regeneración dependen de ciertas fitohormonas en un medio de crecimiento de cultivo de tejido, típicamente dependiendo de un marcador de biocida y/o herbicida que se ha introducido junto con las secuencias de nucleótidos deseadas. La regeneración de la planta a partir de protoplastos cultivados se describe en Evans et al., *Protoplasts Isolation and Culture, Handbook of Plant*

Cell Culture, pág. 124-176, MacMillan Publishing Company, New York, 1983; y Binding, *Regeneration of Plants, Plant Protoplasts*, pág. 21-73, CRC Press, Boca Raton, 1985. La regeneración puede también obtenerse a partir de explantes de callo vegetal, órganos u otras partes de ésta. Dichas técnicas de regeneración se describen en general en Klee (1987) Ann. Rev. of Plant Phys. 38:467-486. Para obtener plantas enteras de tejidos transgénicos tales como embriones inmaduros, pueden desarrollarse bajo condiciones ambientales controladas en una serie de medios que contienen nutrientes y hormonas, un proceso conocido como cultivo de tejido. Una vez que se generan las plantas enteras y producen semillas, comienza la evaluación de la descendencia.

Después de incorporar establemente el casete de expresión en las plantas transgénicas, puede introducirse en otras plantas por cruzamiento sexual. Se puede usar cualquiera de un número de técnicas de cruce convencionales, dependiendo de las especies que se han de cruzar. Ya que la expresión transgénica de los ácidos nucleicos descritos en este documento conduce a cambios fenotípicos, las plantas que comprenden los ácidos nucleicos recombinantes descritos en este documento pueden cruzarse sexualmente con una segunda planta para obtener un producto final. Por lo tanto, la semilla descrita en este documento puede derivar de una cruce entre dos plantas transgénicas descritas en el presente documento, o de una cruce entre una planta descrita en este documento y otra planta. Los efectos deseados (p. ej., expresión de los polipéptidos descritos en este documento para producir una planta con contenido de lípido o aceite alterado, aumentado y/o reducido) se pueden mejorar cuando ambas plantas parentales expresan los polipéptidos que se describen en el presente documento. Los efectos deseados pueden pasarse a generaciones de plantas futuras por medios de propagación estándar.

Los ácidos nucleicos y polipéptidos descritos en este documento se expresan o insertan en cualquier planta o semilla. Las plantas transgénicas descritas en esta memoria pueden ser dicotiledóneas o monocotiledóneas. Los ejemplos de las plantas transgénicas monocotiledóneas descritas en este documento son césped, tal como césped de los prados (pasto azul, *Poa*), pasto forrajero tal como festuca, *lolium*, césped templado, tal como *Agrostis*, y cereales, p. ej., trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz (mazorca). Los ejemplos de plantas transgénicas dicotiledóneas descritas en este documento son tabaco, legumbres, tal como lupines, papa, remolacha azucarera, guisante, frijoles y frijoles de soja, y plantas crucíferas (familia *Brassicaceae*), como coliflor, colza, y el organismo modelo muy relacionado *Arabidopsis thaliana*. Por lo tanto, las plantas y semillas transgénicas descritas en esta memoria incluyen una amplia gama de plantas, que incluyen, aunque sin limitarse a ello, especies de los géneros *Anacardium*, *Arachis*, *Asparagus*, *Atropa*, *Avena*, *Brassica*, *Citrus*, *Citrullus*, *Capsicum*, *Carthamus*, *Cocos*, *Coffea*, *Cucumis*, *Cucurbita*, *Daucus*, *Elaeis*, *Fragaria*, *Glycine*, *Gossypium*, *Helianthus*, *Heterocallis*, *Hordeum*, *Hyoscyamus*, *Lactuca*, *Linum*, *Lolium*, *Lupinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Manihot*, *Majorana*, *Medicago*, *Nicotiana*, *Olea*, *Oryza*, *Panicum*, *Pennisetum*, *Persea*, *Phaseolus*, *Pistachio*, *Pisum*, *Pyrus*, *Prunus*, *Raphanus*, *Ricinus*, *Secale*, *Senecio*, *Sinapis*, *Solarium*, *Sorghum*, *Theobromus*, *Trigonella*, *Triticum*, *Vicia*, *Vitis*, *Vigna* y *Zea*.

Los ácidos nucleicos descritos en esta invención se expresan en plantas que contienen células de fibra, incluyendo, p. ej., algodón, árbol de algodón de seda (Kapok, Ceiba pentandra), *Chilopsis Linearis* (planta del desierto), arbusto de la creosota, *krascheninnikovia lanata* (*winterfat*), balsa, ramio, cáñamo, fibra de cáñamo, rosa de Jamaica, yute, sisal, abacá y lino. Las plantas transgénicas descritas en este documento pueden ser miembros del género *Gossypium*, incluidos miembros de cualquier especie *Gossypium*, tal como *G. arboreum*; *G. herbaceum*, *G. barbadense* y *G. hirsutum*.

Las plantas transgénicas descritas en este documento se pueden usar para producir grandes cantidades de los polipéptidos (p. ej., anticuerpos, hidrolasas) descritos en este documento. Por ejemplo, véase Palmgren (1997) Trends Genet. 13:348; Chong (1997) Transgenic Res. 6:289-296 (producción de proteína de la leche humana beta-caseína en plantas de patata transgénicas usando un promotor de mannopina sintasa bidireccional inducible de auxina (mas1',2') con métodos de transformación del disco de la hoja mediados por *Agrobacterium tumefaciens*).

Usando procedimientos conocidos, el experto puede detectar las plantas descritas en la presente memoria, detectando el incremento o la disminución de mRNA de un transgen o proteína en plantas transgénicas. Los medios para detectar y cuantificar mRNA o proteínas se conocen en la técnica.

Se describen en la presente memoria ácidos grasos o derivados de ácidos grasos de plantas transgénicas descritas en esta invención, p. ej., plantas transgénicas oleaginosas. En un aspecto, se producen plantas transgénicas oleaginosas que comprenden por lo menos una hidrolasa descrita en este documento. En un aspecto, la planta transgénica comprende un gen de hidrolasa operativamente unido a un promotor, permitiendo una expresión del gen o bien en compartimientos celulares, extracelulares o de tejido distintos a aquellos en los que se acumulan los lípidos de la planta, o permitiendo la inducción exógena de la hidrolasa. En un aspecto, las semillas y/o frutos que contienen los lípidos de las plantas se recogen, las semillas y/o frutos se trituran (si es necesario después del tratamiento de inducción del gen de hidrolasa (p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) como para poner en contacto los lípidos con la hidrolasa descrita en este documento contenida en las semillas y/o frutos. La mezcla puede dejarse incubando para permitir la hidrólisis enzimática de los lípidos del material base por acción catalítica de la lipasa descrita en este documento contenida en el material triturado. En un aspecto, los ácidos grasos formados por la hidrólisis se extraen y/o convierten con el fin de obtener los derivados de ácido graso deseados.

Este proceso de hidrólisis enzimática descrito en la presente memoria utiliza condiciones de operación leves y puede ser a pequeña escala y usar instalaciones económicas. En este aspecto, la planta descrita en esta invención se

induce para producir la hidrolasa para transformación de lípidos de la planta. Usando esta estrategia, se previene que la enzima entre en contacto con los lípidos de las plantas que se almacenan como para evitar cualquier riesgo de hidrólisis prematura (“autodegradación de la planta”) antes de cosechar.

5 Las unidades de trituración e incubación pueden ser ligeras y de pequeña escala; muchas se conocen en la industria agrícola y se pueden implementar en sitios en donde se cosechan las plantas.

En un aspecto, las plantas transgénicas descritas en este documento se producen por transformación de plantas oleaginosas naturales. Las plantas genéticamente transformadas descritas en este documento se reproducen sexualmente como para traducir semillas transgénicas. Estas semillas se pueden utilizar para obtener descendencia transgénica de la planta.

10 En un aspecto, el gen de hidrolasa está operativamente unido a un promotor inducible para prevenir cualquier contacto prematuro de la hidrolasa y el lípido de la planta. Este promotor puede dirigir la expresión del gen en compartimientos distintos de donde se acumulan los lípidos o el promotor puede iniciar la expresión de la hidrolasa en un momento deseado por inducción exógena.

Polipéptidos y péptidos

15 Se describen polipéptidos sintéticos y recombinantes aislados, que tienen una identidad de secuencia (p. ej., al menos 50% de identidad de secuencia) con la SEC NÚM:2, SEC ID NÚM:4, SEC ID NÚM:6, SEC ID NÚM:8, SEC ID NÚM: 10, SEC ID NÚM: 12, SEC ID NÚM: 14, SEC ID NÚM:16, SEC ID NÚM:18, o SEC ID NÚM:20 o SEC ID NÚM:2 que tienen una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (varias) o todas las variaciones de aminoácidos que se describen en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, o su equivalente. Se describen ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que tienen una secuencia expuesta en SEC ID NÚM:2, SEC ID NÚM:4, SEC ID NÚM:6, SEC ID NÚM:8, SEC ID NÚM: 10, SEC ID NÚM: 12, SEC ID NÚM: 14, SEC ID NÚM: 16, SEC ID NÚM: 18, o SEC ID NÚM:20 o SEC ID NÚM:2 que tienen una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (varias) o todas las variaciones de aminoácidos descritas en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, o su equivalente.

25 La identidad de secuencia puede ser en la longitud total del polipéptido, o la identidad puede ser sobre una región de por lo menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o más residuos. Los polipéptidos descritos en el presente documento también pueden ser más cortos que toda la longitud de los polipéptidos ilustrativos. Se describen polipéptidos que comprenden solamente una subsecuencia de una secuencia descrita en este documento. Las subsecuencias ilustrativas pueden tener aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o más residuos.

35 En aspectos alternativos, los polipéptidos (péptidos, fragmentos) pueden oscilar en tamaño entre aproximadamente 5 y la longitud total de un polipéptido, p. ej., una enzima descrita en la presente invención; en donde los tamaños ilustrativos son de aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700 o más residuos, p. ej., residuos contiguos de una hidrolasa ilustrativa descrita en este documento. Los péptidos descritos en este documento pueden ser útiles como, p. ej., sondas de etiquetado, proteína que expresa actividad de hidrolasas, tolerágenos, motivos, sitios activos de hidrolasa.

40 Los polipéptidos descritos en este documento también incluyen anticuerpos capaces de unirse a una hidrolasa descrita en esta memoria.

Los polipéptidos descritos en este documento también incluyen secuencias de aminoácidos que son “sustancialmente idénticas” a las secuencias descritas en el presente documento, incluidas secuencias que difieren de una secuencia de referencia por una o más sustituciones, eliminaciones o inserciones de aminoácidos conservadoras o no conservadoras, particularmente cuando dicha sustitución ocurre en un sitio que no es el sitio activo de la molécula, y siempre que el polipéptido retenga esencialmente sus propiedades funcionales. Una sustitución de aminoácidos conservadora, por ejemplo, sustituye un aminoácido por otro de la misma clase (p. ej., sustitución de un aminoácido hidrófobo, tal como isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, o sustitución de un aminoácido polar por otro, tal como sustitución de arginina por lisina, ácido glutámico por ácido aspártico o glutamina por asparagina). Uno o más aminoácidos pueden eliminarse, por ejemplo, de una hidrolasa, resultando en la modificación de la estructura del polipéptido, sin alterar en gran medida su actividad biológica. Por ejemplo, los ácidos amino- o carboxil-terminales que no se requieren para actividad de hidrolasa se pueden eliminar.

“Aminoácido” o “secuencia de aminoácidos” puede incluir un oligopéptido, péptido, polipéptido o secuencia de proteína, o un fragmento, porción o subunidad de cualquiera de éstos, y moléculas naturales o sintéticas.

55 Los términos “polipéptido” y “proteína” pueden incluir ácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir., isoésteres de péptidos, y pueden contener aminoácidos modificados distintos de los aminoácidos codificados por los 20 genes. El término “polipéptido” también incluye péptidos y fragmentos de polipéptidos, motivos y similares. El término incluye también polipéptidos glucosilados. Los péptidos y polipéptidos

descritos en esta invención también incluyen todas las formas “miméticas” y “peptidomiméticas”, como se describe en más detalle continuación.

Los polipéptidos descritos en este documento incluyen hidrolasas en forma activa o inactiva.

5 Por ejemplo, los polipéptidos descritos en este documento incluyen proproteínas antes de la “maduración” o procesamiento de secuencias prepro, p. ej., por una enzima de procesamiento de proproteínas, tal como una proproteína convertasa para generar una proteína madura “activa”. Los polipéptidos descritos en este documento incluyen hidrolasas inactivas por otros motivos, p. ej., antes de la “activación” por un evento de procesamiento post-traducción, p. ej., una acción de endo o exo-peptidasa o proteinasa, un evento de fosforilación, una amidación, una glucosilación o una sulfación, un evento de dimerización y similares.

10 Los métodos para identificar secuencias de dominio “prepro” y secuencias de señalización se conocen en la técnica, véase, p. ej., Van de Ven (1993) Crit. Rev. Oncog. 4(2):115-136. Por ejemplo, para identificar una secuencia prepro, la proteína se purifica del espacio extracelular y la secuencia de la proteína N-terminal se determina y compara con la forma no procesada.

15 Los polipéptidos descritos en la presente invención incluyen todas las formas activas, incluidas las subsecuencias activas, p.ej., dominios catalíticos o sitios activos, de una enzima descrita en esta memoria. Se describen dominios catalíticos o sitios activos que se exponen a continuación.

20 Se describen péptidos o polipéptidos que comprenden o consisten en un dominio de sitio activo pronosticado a través del uso de una base de datos tal como Pfam (que es una gran compilación de alineaciones de secuencias múltiples y modelos Markov ocultos que cubren muchas familias de proteínas comunes, Las base de datos de la familia de proteínas Pfam, A. Bateman, E. Bimey, L. Cerruti, R. Durbin, L. Etwiller, S.R. Eddy, S. Griffiths-Jones, K.L. Howe, M. Marshall y E.L.L. Sonnhammer, Nucleic Acids Research, 30(1):276-280,2002) o equivalente.

25 Se describen polipéptidos con o sin una secuencia de señalización y/o una secuencia prepro. Se describen polipéptidos con secuencias de señalización heterólogas y/o secuencias prepro. La secuencia prepro (incluida una secuencia descrita en este documento utilizada como dominio prepro heterólogo) se puede localizar en el extremo amino terminal o carboxi terminal de la proteína. Se describen secuencias de señalización sintéticas o recombinantes aislada, secuencias prepro y dominios catalíticos (p. ej., “sitios activos”) que comprenden o consisten en las secuencias descritas en este documento. La secuencia de señalización, dominios prepro y/o dominio catalítico descritos en este documento pueden ser parte de una proteína de fusión, p. ej., como un dominio heterólogo en proteína quimérica. Se describen ácidos nucleicos que codifican estos dominios catalíticos (CD),
30 dominios prepro y secuencias de señalización (SP, p. ej., un péptido que tiene una secuencia que comprende/consiste en los residuos aminoterminales de un polipéptido descrito en el presente documento). Se describen secuencias de señalización que comprenden un péptido que comprende/consiste en una secuencia expuesta en los residuos 1 a 12, 1 a 13, 1 a 14, 1 a 15, 1 a 16, 1 a 17, 1 a 18, 1 a 19, 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24, 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 28, 1 a 30, 1 a 31, 1 a 32, 1 a 33, 1 a 34, 1 a 35, 1 a 36, 1 a 37, 1 a 38, 1 a 39, 1 a 40, 1 a 41, 1 a 42, 1 a 43, 1 a 44, 1 a 45, 1 a 46, 1 a 47, 1 a 48, 1 a 49 o 1 a 50, de un polipéptido descrito en la presente invención.

40 Los polipéptidos y péptidos descritos en este documento pueden aislarse de fuentes naturales, ser polipéptidos sintéticos o generados de manera recombinante. Los péptidos y proteínas se pueden expresar en forma recombinante *in vitro* o *in vivo*. Los péptidos y polipéptidos descritos en este documento pueden prepararse y aislarse usando cualquier método conocido en la técnica. El polipéptido y los péptidos descritos en el presente documento pueden también sintetizarse, en todo o en parte, usando métodos químicos conocidos en la técnica. Véase p. ej., Caruthers (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 215-223; Horn (1980) Nucleic Acids Res. Symp. Ser. 225-232; Banga, A.K., Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA. Por ejemplo, se puede efectuar la síntesis de péptidos usando diversas técnicas de fase sólida (véase, p. ej., Roberge (1995) Science 269:202; Merrifield (1997) Methods Enzymol. 289:3-13) y se puede lograr la síntesis automatizada, p. ej., usando el Sintetizador Peptídico ABI 431A (Perkin Elmer) de acuerdo con las instrucciones provistas por el fabricante.

50 Los péptidos y polipéptidos descritos en este documento también pueden glucosilarse. La glucosilación puede añadirse después de la traducción o bien químicamente o por mecanismos biosintéticos celulares, en donde los últimos incorporan el uso de motivos de glucosilación conocidos, que pueden ser nativos para la secuencia o pueden añadirse como un péptido o añadirse en la secuencia que codifica el ácido nucleico. La glucosilación puede estar unida por O o unida por N.

55 Polipéptidos o proteínas “recombinantes” hacen referencia a polipéptidos o proteínas producidos por técnicas de DNA recombinantes producidas por técnicas de DNA recombinantes, es decir, producidas a partir de células transformadas por un constructo de DNA exógeno que codifica el polipéptido o la proteína deseada. Los ácidos nucleicos “sintéticos” (incluidos los oligonucleótidos descritos), polipéptidos o proteínas descritos en esta invención incluyen aquellos preparados por síntesis química, p. ej., como se describe a continuación.

“Fragmentos”, tal como se emplean en la presente memoria, son una porción de una proteína natural que puede existir en por lo menos dos conformaciones distintas. Los fragmentos pueden tener la misma o sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la proteína natural. “Fragmentos enzimáticamente activos”, tal como se emplean en esta memoria, son una porción de una secuencia de aminoácidos (que codifica una proteína) que retiene por lo menos una actividad funcional de la proteína a la que se relaciona. “Sustancialmente igual” significa una secuencia de aminoácidos que es en gran medida, pero no completamente, igual, pero retiene por lo menos una actividad funcional de la secuencia a la cual está relacionada. En general, dos secuencias de aminoácidos son “sustancialmente iguales” o “sustancialmente homólogas” si son por lo menos aproximadamente 85% idénticas. También se incluyen fragmentos que tienen estructuras tridimensionales diferentes de la proteína natural. Un ejemplo de esto es una molécula “pro-forma”, tal como una proproteína de baja actividad que puede modificarse por escisión para producir una enzima madura con actividad significativamente mayor.

Los péptidos y polipéptidos descritos en este documento, como se definió previamente, incluyen todas las formas “miméticas” y “peptidomiméticas”. Formas “miméticas” y “peptidomiméticas” hacen referencia a un compuesto químico sintético que tiene sustancialmente las mismas características estructurales y/o funcionales que los polipéptidos descritos en este documento. El mimético puede estar o bien totalmente compuesto por análogos sintéticos, no naturales de aminoácidos, o ser una molécula química de aminoácidos de péptidos parcialmente naturales y análogos de aminoácidos parcialmente no naturales. El mimético también puede incorporar cualquier cantidad de sustituciones conservadoras de aminoácidos naturales, siempre y cuando dichas sustituciones tampoco alteren sustancialmente la estructura y/o actividad del mimético. Como con los polipéptidos descritos en el presente documento que son variantes conservadoras, la experimentación de rutina determinará si un mimético está dentro del alcance de la presente memoria, es decir, que su estructura y/o función no está sustancialmente alterada. Por lo tanto, en un aspecto, una composición mimética está dentro del alcance de la presente invención si tiene actividad de una hidrolasa.

Las composiciones miméticas de polipéptidos descritas en este documento pueden contener cualquier combinación de componentes estructurales no naturales. En un aspecto alternativo, las composiciones miméticas descritas en este documento incluyen uno o todos los siguientes tres grupos estructurales: a) grupos de unión de residuos que no sea un enlace amida natural (“enlace peptídico”); b) residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácidos naturales; o c) residuos que pueden inducir mimica estructural secundaria, es decir, inducir o estabilizar una estructura secundaria, p. ej., una conformación giro beta, giro gamma, lámina beta, o alfa helicoidal, y similares. Por ejemplo, un polipéptido descrito en este documento puede caracterizarse como mimético cuando todos o algunos de sus residuos están unidos por medios químicos que no son enlaces peptídicos naturales. Los residuos peptidomiméticos individuales pueden unirse mediante enlaces peptídicos, que no sean los enlaces químicos o medios de acoplamiento, como p. ej., glutaraldehído, ésteres N-hidroxisuccinimida, maleimidas bifuncionales, N,N'-díciclohexilcarbodiimida (DCC) o N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC). Los grupos de unión que pueden ser una alternativa a las uniones de enlace amida tradicional (“enlace peptídico”) incluyen, p. ej., cetometileno (p. ej., -C(=O)-CH₂- para -C(=O)-NH-), aminometileno (CH₂-NH), etileno, olefina (CH=CH), éter (CH₂-O), tioéter (CH₂-S), tetrazol (CN₄-), tiazol, retroamida, tioamida o éster (véase, p. ej., Spatola (1983) en *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides and Proteins*, Vol. pag 267-357, “Peptide Backbone Modifications,” Marcell Dekker, NY).

Un polipéptido descrito en este documento puede también caracterizarse como mimético conteniendo todos o algunos residuos no naturales en lugar de residuos de aminoácidos naturales. Los residuos no naturales se describen en la bibliografía científica y de patentes; algunas composiciones no naturales ilustrativas útiles como miméticos de residuos de aminoácidos naturales y pautas se describen a continuación. Los miméticos de aminoácidos aromáticos se pueden generar reemplazando por, p. ej., D- o L-naftilalanina; D- o L-fenilglicina; D- o L-2-tienilalanina; D- o L-1, -2, 3- o 4-pirenilalanina; D- o L-3-tieneilalanina; D- o L-(2-piridinil)-alanina; D- o L-(3-piridinil)-alanina; D- o L-(2-pirazinil)-alanina; D- o L-(4-isopropil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilglicina; D-(trifluorometil)-fenilalanina; D-p-fluoro-fenilalanina; D- o L-p-bifenilfenilalanina; D- o L-p-metoxi-bifenilfenilalanina; D- o L-2-indol(alquil)alaninas; y D- o L-alquilalaninas, en donde el alquilo puede ser metilo, etilo, propilo, hexilo, butilo, pentilo, isopropilo, iso-butilo, sec-isotilo, iso-pentilo sustituido o no sustituido o aminoácidos no aromáticos. Los anillos aromáticos de aminoácidos no naturales incluyen, p. ej., anillos aromáticos de tiazolilo, tiofenilo, pirazolilo, bencimidazolilo, naftilo, furanilo, pirrolilo y piridiloftilo, furanilo, pirrolilo y piridilo.

Los miméticos de aminoácidos ácidos se pueden generar por sustitución, p. ej., con aminoácidos no carboxilato mientras se mantiene una carga negativa; (fosfono)alanina; treonina sulfatada. También se pueden modificar selectivamente grupos laterales carboxilo (p. ej., aspartilo o glutamilo) por reacción con carbodiimidas (R'-N-C-N-R'⁵) tales como, p. ej., 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia- 4,4- dimetolpentil) carbodiimida. Aspartilo o glutamilo también pueden convertirse a residuos asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio. Los miméticos de aminoácidos básicos pueden generarse por sustitución con, p. ej., (además de lisina y arginina) los aminoácidos ornitina, citrulina o ácido (guanidino)-acético, o ácido (guanidino)alquil-acético, en donde el alquilo se define como anteriormente. Un derivado de nitrilo (p. ej., que contiene un resto CN en lugar de COOH) puede sustituirse por asparagina o glutamina. Los residuos asparaginilo y glutaminilo pueden desaminarse a los correspondientes residuos aspartilo o glutamilo. Los miméticos de residuos arginina pueden generarse haciendo reaccionar arginilo con, p. ej., uno o más reactivos convencionales incluidos, p. ej., fenilgloxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclo-hexanodiona o ninhidrina, alternativamente bajo condiciones alcalinas. Los miméticos de residuos tirosina se pueden generar haciendo reaccionar tirosilo con, p. ej., compuestos diazonio aromáticos o tetranitrometano. Se

pueden usar N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies O-acetil tirosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente. Los miméticos de residuos cisteína se pueden generar haciendo reaccionar residuos cisteinilo con, p. ej., alfa-haloacetatos tales como ácido 2-cloroacético o cloroacetamida y las correspondientes aminas; para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los miméticos de residuos cisteína también se pueden generar haciendo reaccionar residuos cisteinilo con, p. ej., bromo-trifluoroacetona, ácido alfa-bromo-beta-(5-imidozoi) propiónico; fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidias, 3-nitro-2-piridil disulfuro; metil 2-piridil disulfuro; p-cloromercuribenzoato; 2-cloromercuri-4 nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol. Los miméticos de lisina se pueden generar (y los residuos aminoterminales se pueden alterar) haciendo reaccionar lisinilo con, p. ej., ácido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. Lisina y miméticos de residuos que contienen alfa-amino pueden también generarse por reacción con imidoésteres, tales como metil picolinimidato, piridoxal fosfato, piridoxal, cloroborohidruro, ácido trinitro-bencenosulfónico, O-metilisourea, 2,4,-pentanodiona y reacciones catalizadas con transamidasa con glioxilato. Los miméticos de metionina pueden generarse por reacción con, p. ej., sulfóxido de metionina. Los miméticos de prolina incluyen, p. ej., ácido pipecólico, ácido tiazolidina carboxílico, 3- o 4-hidroxiprolina, deshidroprolina, 3- o 4-metilprolina o 3,3,-dimetilprolina. Los miméticos de residuos histidina pueden generarse por reacción de histidilo con, p. ej., dietilprocarbonato o bromuro de para-bromofenacilo. Otros miméticos incluyen, p. ej., aquellos generados por hidroxilación de prolina y lisina; fosforilación de los grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo; metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina e histidina; acetilación de la amina N-terminal; metilación de residuos amida de cadena principal o sustitución con N-metil aminoácidos; o amidación de grupos carboxilo C-terminales.

Un residuo, p. ej., un aminoácido de un polipéptido descrito en el presente documento puede reemplazarse con un aminoácido (o residuo peptidomimético) de la quiralidad opuesta. Por consiguiente, cualquier aminoácido natural de la configuración L (que también puede denominarse R o S, dependiendo de la estructura de la entidad química) puede reemplazarse por el aminoácido del mismo tipo estructural químico o por un peptidomimético, pero de la quiralidad opuesta, denominado el D-aminoácido, pero también denominado la forma R o S.

Se describen métodos para modificar los polipéptidos descritos en este documento por procedimientos naturales, tales como procesamiento post-traducción (p. ej., fosforilación, acilación, etc), o por técnicas de modificación química, y los resultantes polipéptidos modificados. Las modificaciones pueden ocurrir en el polipéptido, incluida la estructura principal del péptido, las cadenas laterales de aminoácidos y los términos amino o carboxilo. Se ha de apreciar que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en distintos sitios en un polipéptido determinado. Además, un polipéptido determinado puede tener muchos tipos de modificaciones. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto heme, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de un fosfatidilinositol, ciclización de entrecruzamiento, formación de un enlace disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodinación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfación y adición de aminoácidos mediada por RNA de transferencia a proteína tal como arginilación. Véanse, p. ej., Creighton, T.E., *Proteins - Structure and Molecular Properties* 2ª Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pág. 1-12 (1983).

Los métodos de síntesis peptídica química de fase sólida también se pueden emplear para sintetizar los polipéptidos, o sus fragmentos, descritos en este documento. Dicho método se ha conocido en la técnica desde comienzos de los años sesenta (Merrifield, R. B., *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963) (Véanse también Stewart, J. M. and Young, J. D., *Solid Phase Peptide Synthesis*, 2ª Ed., Pierce Chemical Co., Rockford, Ill., pág. 11-12) y se han empleado en kits de diseño y síntesis de péptidos de laboratorio comerciales (Cambridge Research Biochemicals). Dichos kits de laboratorio comerciales han utilizado en general las descripciones de H. M. Geysen et al, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81:3998 (1984) y dan a conocer la sintetización de péptidos en las puntas de una multitud de "varillas" o "clavijas" los cuales están conectados a una placa individual. Cuando se utiliza dicho sistema, una placa de varillas o clavijas se invierte y se inserta en una segunda placa de los correspondientes pocillos o reservorios, que contienen disoluciones para unir o anclar un aminoácido apropiado a las puntas de las clavijas o varillas. Al repetir dicha etapa del procedimiento, es decir, invertir e insertar las puntas de las varillas y clavijas en las disoluciones apropiadas, se construyen los aminoácidos en los péptidos deseados. A su vez, está disponible un número de sistemas de síntesis de péptidos FMOC. Por ejemplo, se puede llevar a cabo el ensamblaje de un polipéptido o fragmento en un soporte sólido usando un sintetizador de péptidos automático Applied Biosystems, Inc. Modelo 431 A™. Dicho equipo ofrece acceso a los péptidos descritos en este documento, o bien por síntesis directa o por síntesis de una serie de fragmentos que pueden acoplarse usando otras técnicas conocidas.

Enzimas

Se describen hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas, p. ej., proteínas que comprenden por lo menos aproximadamente 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o más, o la secuencia de identidad completa (100%), con un polipéptido ilustrativo descrito en el presente documento (p. ej., SEC ID NÚM:2,

SEC ID NÚM:4, SEC ID NÚM:6, SEC ID NÚM:8, SEC ID NÚM: 10, SEC ID NÚM:12, SEC ID NÚM:14, SEC ID NÚM:16, SEC ID NÚM:18, o SEC ID NÚM:20 o SEC ID NÚM:2) que tiene una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más (varias) o todas las variaciones de aminoácidos descritas en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23, o su equivalente, anticuerpos que se unen a ellas, y métodos para prepararlas y usarlas.

Los polipéptidos descritos en esta invención pueden tener cualquier actividad de hidrolasa p. ej., actividad de lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa. En aspectos alternativos, una actividad de una enzima descrita en este documento comprende hidrólisis o síntesis de lípidos o aceites. Las hidrolasas descritas en la presente memoria pueden modificar aceites por hidrólisis, acidólisis, alcoholólisis, glicerólisis, esterificación, transesterificación y/o interesterificación, incluidas reacciones de "migración forzada".

En aspectos alternativos, las hidrolasas descritas en el presente documento pueden tener actividades modificadas o nuevas en comparación con las hidrolasas ilustrativas o las actividades descritas en este documento.

Se describen hidrolasas con y sin secuencias de señalización, y las secuencias de señalización propiamente dichas. Se describen hidrolasas inmovilizadas, anticuerpos anti-hidrolasa y sus fragmentos. Se describen proteínas para inhibir la actividad de hidrolasa, p. ej., anticuerpos que se unen al sitio activo de hidrolasa.

Se describen en este documento homodímeros y heterocomplejos, p. ej., proteínas de fusión, heterodímeros, etc., que comprenden las hidrolasas descritas en este documento. Se describen en este documento hidrolasas que tienen actividad sobre una amplia gama de temperaturas altas y bajas, y de pH (p. ej., condiciones acuosas ácidas y básicas).

En un aspecto, una o más hidrolasas (p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) descritas en este documento se usan para la síntesis biocatalítica de lípidos estructurados, es decir, lípidos que contienen un conjunto definido de ácidos grasos distribuidos en un modo definido en la estructura del glicerol, incluidas alternativas de manteca de cacao, ácidos grasos polinsaturados (PUFA), 1,3-diacyl glicéridos (DAG), 2-monoacylglicéridos (MAG y triacylglicéridos (TAG).

Se describen métodos para generar enzimas que tienen K_{cat}/K_m alterado (superior o inferior).

En un aspecto, se emplea mutagénesis dirigida al sitio para crear enzimas hidrolasa adicionales con especificidades de sustrato alternativas. Esto puede hacerse, por ejemplo, rediseñando la región de unión al sustrato o el sitio activo de la enzima. En un aspecto, las hidrolasas descritas en este documento son más estables a altas temperaturas, tales como 80 °C u 85 °C hasta 90 °C o 95 °C, en comparación con las hidrolasas de organismos convencionales o moderados.

Diversas proteínas descritas en el presente documento tienen actividad de una hidrolasa, p. ej., lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa, bajo diversas condiciones. Se describen en esta memoria métodos para elaborar hidrolasas con distinta eficiencia catalítica y estabilidades a temperatura, agentes oxidantes y condiciones de pH. Estos métodos pueden usar, p. ej., las técnicas de mutagénesis dirigida al sitio y/o mutagénesis aleatoria. En un aspecto, puede usarse evolución dirigida para producir hidrolasas con especificidades y estabilidad alternativas.

Las proteínas descritas en este documento se usan en métodos que identifican moduladores de hidrolasa, p. ej., activadores o inhibidores. En síntesis, las muestras de prueba (p. ej., compuestos, tales como miembros de genotecas de péptidos o combinatorias, caldos, extractos y similares) se añaden a ensayos de hidrolasa para determinar su capacidad de modular, p. ej., inhibir o activar, escisión de sustrato. Estos inhibidores se pueden utilizar en la industria e investigar para reducir o prevenir la isomerización no deseada. Los moduladores hallados usando los métodos descritos en esta memoria se pueden emplear para alterar (p. ej., reducir o aumentar) el espectro de actividad de una hidrolasa.

Se describen métodos para descubrir hidrolasas que usan los ácidos nucleicos, polipéptidos y anticuerpos descritos en este documento. En un aspecto, se detectan genotecas de fago lambda para descubrimiento de hidrolasas basado en expresión. Se describen en la presente invención genotecas de fagos lambda para uso en la detección a fin de permitir la detección de clones tóxicos; acceso mejorado al sustrato; necesidad reducida de modificación genética de un hospedante, derivando el potencial de cualquier desviación que resulte de una escisión masiva de la genoteca; y crecimiento más rápido a bajas densidades de los clones.

La detección de genotecas de fagos de lambda puede ser en fase líquida o en fase sólida. Se describen métodos para detección en fase líquida. Esto puede ofrecer una mayor flexibilidad en las condiciones de ensayo; flexibilidad adicional del sustrato; mayor sensibilidad de clones débiles; y facilidad de automatización en comparación con la detección de fase sólida.

Se describen métodos para usar las proteínas y ácidos nucleicos descritos en la presente memoria, que implican automatización robótica. Esto permite la ejecución de muchos miles de reacciones biocatalíticas y ensayos de detección en un periodo de tiempo breve, p. ej., por día, como también la garantía de un alto nivel de precisión y

reproductibilidad (véase el análisis de ordenaciones a continuación). En consecuencia, una genoteca de compuestos derivados se puede producir en cuestión de semanas.

Se describen en este documento enzimas hidrolasa que son hidrolasas no naturales que tienen una actividad, estabilidad, especificidad de sustrato, perfil de pH y/o desempeño de hidrolasa característico diferente, en comparación con la hidrolasa no natural. Estas hidrolasas tienen todas secuencias de aminoácidos que no se encuentran en la naturaleza. Pueden derivarse por sustitución de una pluralidad de residuos de aminoácidos de una hidrolasa precursora con distintos aminoácidos. La hidrolasa precursora puede ser una hidrolasa natural o una hidrolasa recombinante. En un aspecto, las variantes de hidrolasa abarcan la sustitución de cualquiera de los L-aminoácidos naturales en las posiciones de los residuos de aminoácidos designadas.

10 Secuencias de señalización de hidrolasa, dominios prepro y catalíticos

Se describen secuencias de señalización (p. ej., péptidos de señalización (SP)), dominios prepro y dominios catalíticos (CD). Los SP, dominios prepro y/o CD descritos en este documento pueden ser péptidos sintéticos o recombinantes aislados o pueden ser parte de una proteína de fusión, p. ej., como un dominio heterólogo en una proteína quimérica. Se describen ácidos nucleicos que codifican estos dominios catalíticos (CD), dominios prepro y secuencias de señalización (SP, p. ej., un péptido que tiene una secuencia que comprende/consiste en residuos aminoterminales de un polipéptido descrito en este documento). Se describen secuencias de señalización que comprenden un péptido que comprende/consiste en una secuencia expuesta en los residuos 1 a 12, 1 a 13, 1 a 14, 1 a 15, 1 a 16, 1 a 17, 1 a 18, 1 a 19, 1 a 20, 1 a 21, 1 a 22, 1 a 23, 1 a 24, 1 a 25, 1 a 26, 1 a 27, 1 a 28, 1 a 28, 1 a 30, 1 a 31, 1 a 32, 1 a 33, 1 a 34, 1 a 35, 1 a 36, 1 a 37, 1 a 38, 1 a 39, 1 a 40, 1 a 41, 1 a 42, 1 a 43, 1 a 44 (o un péptido más largo) de un polipéptido descrito en el presente documento. Se describen secuencias de señalización sintéticas o recombinantes aisladas que comprenden/consisten en una secuencia de señalización descrita en este documento derivada de otra enzima descrita en la presente invención, u otro tipo de enzima o polipéptido.

Las secuencias de señalización de hidrolasa (SP), CD y/o prepro descritas en este documento pueden ser péptidos aislados, o secuencias unidas a otro polipéptido de hidrolasa o no hidrolasa, p. ej., como una proteína de fusión (quimérica). Se describen polipéptidos que comprenden secuencias de señalización de hidrolasa descritas en este documento. En un aspecto, los polipéptidos que comprenden secuencias de señalización de hidrolasa SP, CD y/o prepro descritos en este documento comprenden secuencias heterólogas a las hidrolasas descritas en este documento (p. ej., una proteína de fusión que comprende SP, CD y/o prepro descrita en este documento y secuencias de otra proteína hidrolasa o no hidrolasa). Se describen hidrolasas con secuencias SP, CD y/o prepro heterólogas, p. ej., secuencias con una secuencia de señalización de levadura. Una hidrolasa descrita en este documento puede comprender SP y/o prepro heteróloga en un vector, p. ej., un vector serie pPIC (Invitrogen, Carlsbad, CA).

En un aspecto, las secuencias de SP, CD y/o prepro que se describen en este documento se identifican siguiendo la identificación de nuevos polipéptidos de hidrolasa. Las rutas mediante las cuales se clasifican y transportan las proteínas a su localización celular correcta por lo general se denominan rutas de direccionamiento de proteínas. Uno de los elementos más importantes en todos estos sistemas de direccionamiento es una secuencia de aminoácidos corta en el término amino de un polipéptido recientemente sintetizado llamado secuencia de señalización. Esta secuencia de señalización dirige una proteína hacia su localización apropiada en la célula y se elimina durante el transporte o cuando la proteína alcanza su destino final. La mayoría de las proteínas segregadas o membranas lisosomales tienen una secuencia de señalización amino-terminal que las marca para translocación en el lumen de la retícula endoplasmática. Las secuencias de señalización pueden variar en longitud de 13 a 45 o más residuos de aminoácidos. Se conocen en la técnica diversos métodos de reconocimiento de secuencias de señalización. Por ejemplo, en un aspecto, se identifican nuevos péptidos de señalización de hidrolasa por un método denominado SignalP. SignalP utiliza una red neural combinada que reconoce los péptidos de señalización y sus sitios de escisión. (Nielsen et al., "Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites". Protein Engineering, vol. 10, núm. 1, págs. 1-6 (1997).

Se ha de entender que en algunos aspectos, las hidrolasas descritas en este documento pueden no tener SP y/o secuencias prepro, y/o dominios catalíticos (CD). En un aspecto, se describen en el presente documento polipéptidos (p. ej., hidrolasas) que carecen de todo o parte de una SP, un CD y/o un dominio prepro. En otro aspecto, se describen en esta memoria ácidos nucleicos que codifican una secuencia de señalización (SP), un CD y/o prepro de una hidrolasa operativamente unida a una secuencia de ácido nucleico de una hidrolasa diferente, u opcionalmente, puede ser conveniente una secuencia de señalización (SP) y/o dominio prepro de una proteína no hidrolasa.

Se describen en este documento polipéptidos sintéticos o recombinantes aislados que comprenden secuencias de señalización (SP), dominio prepro y/o dominios catalíticos (CD) descritos en este documento y secuencias heterólogas. Las secuencias heterólogas son secuencias que no están naturalmente asociadas (p. ej., a una hidrolasa) con una SP, dominio prepro y/o CD. La secuencia a la cual la SP, el dominio prepro y/o CD no está naturalmente asociada puede estar en el extremo aminoterminal, de la SP, el dominio prepro y/o CD, el extremo carboxiterminal y/o en ambos extremos de SP y/o CD. Se describen en este documento polipéptidos recombinantes o sintéticos aislados que comprenden (o consisten en) un polipéptido que comprende una secuencia de señalización

(SP), dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) descrito en la presente memoria, con la salvedad que no está asociado con ninguna secuencia a la cual se asocia naturalmente (p. ej., una secuencia de hidrolasa). Se describen en este documento ácidos nucleicos aislados o recombinantes que codifican estos polipéptidos. Por lo tanto, en un aspecto, el ácido nucleico sintético o recombinante aislado descrito en este documento comprende una secuencia codificante para una secuencia de señalización (SP), dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) descrito en este documento y una secuencia heteróloga (es decir, una secuencia naturalmente no asociada con la secuencia de señalización (SP), dominio prepro y/o dominio catalítico (CD) descrito en este documento). La secuencia heteróloga puede estar en el extremo terminal 3', en el extremo terminal 5' y/o en ambos extremos de la SP, dominio prepro y/o secuencia codificante CD.

Se describen fusiones de subsecuencias N-terminales o C-terminales de las enzimas descritas en esta memoria (p. ej., secuencias de señalización, secuencias prepro) con otros polipéptidos, proteínas activas o fragmentos de proteínas. La producción de una enzima descrita en este documento (p. ej., una hidrolasa, p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) puede también lograrse expresando la enzima como una proteína de fusión inactiva que después es activada por un evento de escisión proteolítico (usando actividad de proteasa endógena o exógena, p. ej., tripsina) que produce la separación de la pareja de la proteína de fusión y la enzima madura, p. ej., hidrolasa descrita en este documento. En un aspecto, la proteína de fusión que se describe en este documento se expresa a partir de un constructo de nucleótido híbrido que codifica un solo marco de lectura abierto que contiene los siguientes elementos: la secuencia de nucleótidos para la proteína de fusión, una secuencia enlazadora (definida como una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos flexible que une dos dominios de proteínas menos flexibles), sitio de reconocimiento de escisión y la secuencia de la enzima madura (p. ej., cualquier enzima descrita en este documento, p. ej., una hidrolasa). En aspectos alternativos, la proteína de fusión puede comprender una secuencia de pectatoliasa, una secuencia de xilanasas, una secuencia de ácido fosfatídico u otra secuencia, p. ej., una secuencia que se ha demostrado previamente que se sobreexpresa en un sistema hospedante de interés. Se puede usar cualquier sistema hospedante (véase el análisis anterior), por ejemplo, *E. coli* o *Pichia pastoris*. La disposición de las secuencias de nucleótidos en la construcción de nucleótidos quimérica puede determinarse en base a los niveles de expresión de proteína logrados con cada constructo de fusión. Procediendo del extremo 5' del constructo de nucleótido al extremo 3' del constructo, en un aspecto, las secuencias de nucleótidos se ensamblan de la siguiente manera: secuencia de señalización/proteína de fusión/secuencia enlazadora/sitio de reconocimiento de escisión de proteasa/enzima madura (p. ej., cualquier enzima descrita en la presente invención, p. ej., una hidrolasa) o secuencia de señalización/secuencia pro/enzima madura/secuencia enlazadora/proteína de fusión. La expresión de la enzima (p. ej., cualquier enzima descrita en este documento, p. ej., una hidrolasa) como proteína de fusión inactiva puede mejorar la expresión general de la secuencia de enzimas, puede reducir cualquier toxicidad potencial asociada con la producción excesiva de enzima activa y/o puede aumentar la vida útil de la enzima antes del uso debido a que la enzima estaría inactiva hasta que la proteína de fusión, p. ej., pectato liasa se separara de la enzima, p. ej., la hidrolasa descrita en este documento.

Se describen en este documento formulaciones específicas para la activación de una hidrolasa descrita en la presente invención expresada como proteína de fusión. En un aspecto, la activación de la actividad de hidrolasa expresada en una proteína de fusión se logra usando una actividad proteolítica o potencialmente una actividad proteolítica con una peptidasa aminoterminal o carboxiterminal (la peptidasa puede ser una enzima descrita en esta memoria, u otra enzima). Este evento de activación puede lograrse en una diversidad de formas y en una diversidad de puntos en el proceso de fabricación/almacenamiento antes de la aplicación en desgomado de aceite. Los procesos ilustrativos incluyen: escisión por una actividad endógena expresada por el hospedante tras la segregación del constructo de fusión en el medio de fermentación; escisión por actividad de una proteasa endógena que se activa o entra en contacto con un constructo de fusión de manera intracelular tras la ruptura de células hospedantes; pasaje del constructo de fusión en bruto o purificado por una columna de actividad de proteasa inmovilizada para lograr la escisión y la activación de una enzima (p. ej., la hidrolasa descrita en este documento, p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) antes de la formulación de la enzima; tratamiento del constructo de fusión bruto o purificado con una fuente soluble de actividad proteolítica; activación de una hidrolasa (p. ej., una hidrolasa descrita en este documento) en la refinería de aceite, usando una fuente o bien soluble o insoluble de actividad proteolítica inmediatamente antes del uso en el proceso; y/o activación de actividad de una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa descrita en este documento) haciendo circular continuamente la formulación del constructo de fusión a través de una columna de actividad de proteasa inmovilizada a temperatura reducida (por ejemplo, cualquiera entre aproximadamente 4°C y 20°C). Este evento de activación se puede obtener antes de la administración al sitio de uso o puede ocurrir en el sitio en la refinería de aceite.

Glucosilación

Los péptidos y polipéptidos descritos en este documento (p. ej., hidrolasas, anticuerpos) pueden también glucosilarse, por ejemplo, en un aspecto, comprendiendo por lo menos un sitio de glucosilación, p. ej., una glucosilación unida en N o unida en O. En un aspecto, el polipéptido se puede glucosilar después de expresarse en *P. pastoris* o a *S. pombe*. La glucosilación puede añadirse después de la traducción o bien químicamente o por mecanismos biosintéticos celulares, en donde estos últimos incorporan el uso de motivos de glucosilación conocidos, que pueden ser nativos a la secuencia o añadirse como un péptido, o añadirse en la secuencia codificante de ácido nucleico.

Hidrolasas híbridas y genotecas de péptidos

Se describen hidrolasas híbridas (p. ej., proteínas sintéticas) y proteínas de fusión, incluidas genotecas de péptidos, que comprenden las secuencias descritas en esta invención. Las genotecas de péptidos descritas en este documento se pueden utilizar para aislar moduladores de péptidos (p. ej., activadores o inhibidores) de dianas. Las genotecas de péptidos descritas en este documento se pueden usar para identificar parejas de unión formales de dianas, como ligandos, p. ej., citocinas, hormonas y similares.

En un aspecto, las proteínas de fusión descritas en el presente documento (p. ej., el resto peptídico) se estabilizan de forma conformacional (relativa a péptidos lineales) para permitir una mayor afinidad de unión hacia las dianas. En otro aspecto, se describen en este documento fusiones de hidrolasas descritas aquí y otros péptidos, incluidos péptidos conocidos y aleatorios. Se pueden condensar en un modo tal que la estructura de la enzima o el anticuerpo (p. ej., hidrolasa) no se perturba de modo significativo y el péptido es estabilizado metabólicamente o estructuralmente en forma conformacional. Esto posibilita la creación de una genoteca de péptidos que es fácilmente monitoreada para su presencia dentro de las células y su cantidad.

Se describen variantes de secuencias de aminoácidos que pueden ser caracterizadas por una naturaleza predeterminada de la variación, una característica que las diferencia de una forma natural, p. ej., una variación alélica o de interespecie de una secuencia de hidrolasa. En un aspecto, las variantes descritas en este documento exhiben la misma actividad biológica cualitativa que el análogo natural. Alternativamente, las variantes pueden seleccionarse por tener características modificadas. En un aspecto, si bien el sitio o la región para introducir una variación de una secuencia de aminoácido se predetermina, la mutación propiamente dicha no necesita determinarse. Por ejemplo, con el fin de optimizar el desempeño de una mutación en un sitio determinado, se puede efectuar mutagénesis aleatoria en el codón o región diana y las variantes de hidrolasa expresadas detectarse para combinación óptima de la actividad deseada. Las técnicas para efectuar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados del DNA que tienen una secuencia conocida se conocen, como se describe en este documento, por ejemplo, mutagénesis del cebador M13 y mutagénesis PCR. La detección de mutantes se puede efectuar usando ensayos de actividades proteolíticas. En aspectos alternativos, las sustituciones de aminoácidos pueden ser residuos individuales; las inserciones pueden estar en el orden de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, aunque se pueden efectuar inserciones considerablemente mayores. Las eliminaciones pueden oscilar entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70 residuos o más. Para obtener un derivado final con las propiedades óptimas, se pueden utilizar sustituciones, eliminaciones, inserciones o cualquier combinación de éstas.

En general estos cambios se realizan en unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula. No obstante, se pueden tolerar cambios mayores en determinadas circunstancias.

Se describen hidrolasas en las que la estructura del esqueleto del polipéptido, la estructura secundaria o terciaria, p. ej., una estructura alfa-helicoidal o beta-lámina, ha sido modificada. En un aspecto, la carga o hidrofobicidad ha sido modificada. En un aspecto, el volumen de una cadena lateral ha sido modificado. Los cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica se realizan seleccionando sustituciones que son menos conservadoras. Por ejemplo, se pueden efectuar sustituciones que afectan más significativamente: la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de la alteración, por ejemplo una estructura alfa-helicoidal o beta-lámina; una carga o un sitio hidrófobo de la molécula, que puede estar en un sitio activo; o una cadena lateral. Se describen proteínas que comprenden sustituciones de secuencias descritas en este documento, p. ej., donde (a) residuos hidrófilos, p. ej., serilo treonilo, se sustituyen con un residuo hidrófobo, p. ej., leucilo, isoleucilo, fenilalanilo, valilo o alanilo; (b) una cisteína o prolina se sustituye con cualquier otro residuo; (c) un residuo que tiene una cadena lateral electropositiva, p. ej., lisilo, arginilo o histidilo, se sustituye con un residuo electronegativo, p. ej., glutamilo o aspartilo; o (d) un residuo que tiene una cadena lateral voluminosa, p. ej., fenilalanina, se sustituye con uno que no tiene una cadena lateral, p. ej., glicina. Las variantes pueden exhibir la misma actividad biológica cualitativa (es decir, actividad de hidrolasa), aunque pueden seleccionarse variantes para modificar las características de las hidrolasas según sea necesario.

En un aspecto, las hidrolasas que se describen en este documento comprenden epítomos o marcas de purificación, secuencias de señalización u otras secuencias de fusión, etc. En un aspecto, las hidrolasas descritas en este documento se pueden condensar a un péptido aleatorio para formar un polipéptido de fusión. Por "condensado" u "operativamente unido" en la presente memoria se hace referencia a que el péptido aleatorio y la hidrolasa están vinculados entre sí, en un modo tal que se minimiza la alteración de la estabilidad de la estructura de hidrolasa, p. ej., retiene la actividad de la hidrolasa. El polipéptido de fusión (o polinucleótido de fusión que codifica el polipéptido de fusión) puede comprender otros componentes también, incluidos múltiples péptidos en múltiples bucles.

En un aspecto, los péptidos (p. ej., subsecuencias de hidrolasa) y los ácidos nucleicos que los codifican se aleatorizan, o bien se aleatorizan totalmente o se sesgan en su aleatorización, p. ej., en la frecuencia del nucleótido/residuo en general o por posición. "Aleatorizado" significa que cada ácido nucleico y péptido consiste en nucleótidos y aminoácidos esencialmente aleatorios, respectivamente. En un aspecto, los ácidos nucleicos que dan origen a los péptidos pueden sintetizarse químicamente y, por lo tanto, pueden incorporar cualquier nucleótido en cualquier posición. Por consiguiente, cuando los ácidos nucleicos se expresan para formar péptidos, cualquier residuo de aminoácido puede incorporarse en cualquier posición. El proceso sintético puede diseñarse para generar

ácidos nucleicos aleatorizados, para permitir la formación de todas o la mayoría de las combinaciones posibles en la longitud del ácido nucleico, formando así una genoteca de ácidos nucleicos aleatorizados. La genoteca puede proporcionar una población estructural lo suficientemente diversa de productos de expresión aleatorizados para efectuar un intervalo suficiente desde el punto de vista de las probabilidades de respuestas celulares a fin de proporcionar una o más células que exhiban una respuesta deseada. Se describen en este documento genotecas de interacción lo suficientemente grandes como para que por lo menos uno de sus miembros tenga una estructura que le aporte afinidad hacia alguna molécula, proteína u otro factor.

Metodologías de detección y dispositivos de monitoreo "en línea"

En la práctica de los métodos de la presente memoria, se puede emplear una diversidad de aparatos y metodologías junto con los polipéptidos y ácidos nucleicos descritos en la presente invención, p. ej., para detectar polipéptidos para actividad de hidrolasa, para detectar compuestos como activadores potenciales o inhibidores de actividad de una hidrolasa (p. ej., para detección potencial de un fármaco), para anticuerpos que se unen a un polipéptido descrito en este documento, para ácidos nucleicos que se hibridan a un ácido nucleico descrito en este documento, para detectar células que expresan un polipéptido descrito en este documento y similares. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 6.337.187.

Ordenaciones capilares

Se pueden utilizar ordenaciones capilares, tales como GIGAMATRIX™, Diversa Corporation, San Diego, CA, en los métodos descritos en este documento. Los ácidos nucleicos o polipéptidos descritos en este documento se pueden inmovilizar o aplicarse a una ordenación, incluidas ordenaciones capilares. Las ordenaciones pueden utilizarse para detectar o monitorear genotecas de composiciones (p. ej., moléculas pequeñas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) para su capacidad de unirse o modular la actividad de un ácido nucleico o polipéptido descrito en este documento. Las ordenaciones capilares proporcionan otro sistema para sostener y detectar muestras. Por ejemplo, un aparato de detección de muestras puede incluir una pluralidad de capilares formados en una ordenación de capilares adyacentes, en donde cada capilar comprende por lo menos una pared que define un lumen para retener una muestra. El aparato puede además incluir material intersticial dispuesto entre capilares adyacentes en la ordenación, y uno o más indicios de referencia formados dentro del material intersticial. Un capilar para detectar una muestra, en donde el capilar se adapta para unirse en una ordenación de capilares, puede incluir una primera pared que define un lumen para retener la muestra, y una segunda pared de un material de filtro, para filtrar la energía de excitación provista al lumen para excitar la muestra.

Un polipéptido o ácido nucleico, p. ej., un ligando o un sustrato, puede introducirse en un primer componente en por lo menos una porción de un capilar u ordenación capilar. Cada capilar de la ordenación capilar puede comprender por lo menos una pared que define un lumen para retener el primer componente. Se puede introducir una burbuja de aire en el capilar detrás del primer componente. Se puede introducir un segundo componente en el capilar, en donde el segundo componente es separado del primer componente por la burbuja de aire. Una muestra de interés puede introducirse como un primer líquido etiquetado con una partícula detectable en un capilar de una ordenación capilar, en donde cada capilar de la ordenación capilar comprende por lo menos una pared que define un lumen para retener el primer líquido y la partícula detectable, y donde la por lo menos una pared está recubierta con un material de unión para unir la partícula detectable con la por lo menos una pared. El método puede además incluir eliminar el primer líquido del tubo capilar, en donde la partícula detectable unida se mantiene dentro del capilar, e introducir un segundo líquido en el tubo capilar.

La ordenación capilar puede incluir una pluralidad de capilares individuales que comprenden por lo menos una pared externa que define un lumen. La pared externa del capilar puede ser una o más paredes condensadas entre sí. De modo similar, la pared puede definir un lumen que tiene forma cilíndrica, cuadrada, hexagonal o cualquier otra forma geométrica, siempre y cuando las paredes formen un lumen para retención de un líquido o muestra. Los capilares o la ordenación capilar pueden mantenerse juntos para formar una estructura plana. Los capilares pueden unirse entre sí, al estar condensados (p. ej., donde los capilares son de vidrio), pegados, enlazados o engrampados de lado a lado. La ordenación capilar puede estar formada por cualquier número de capilares individuales, por ejemplo, un intervalo entre 100 y 4.000.000 capilares. Una ordenación capilar puede formar una placa de microtitulación que tiene aproximadamente 100.000 o más capilares individuales unidos entre sí.

Ordenaciones o "biochips"

Los ácidos nucleicos o los polipéptidos descritos en este documento se pueden inmovilizar o aplicar a una ordenación. Las ordenaciones se pueden usar para detectar o monitorear genotecas de composiciones (p. ej., moléculas pequeñas, anticuerpos, ácidos nucleicos, etc.) por su capacidad de unirse o modular la actividad de un ácido nucleico o un polipéptido descrito en este documento. Por ejemplo, en un aspecto descrito en esta memoria, un parámetro monitoreado es la expresión de transcrito de un gen de hidrolasa. Uno o más, o todos los transcritos de una célula, se pueden medir por hibridación de una muestra que comprende transcritos de la célula, o ácidos nucleicos representativos de o complementarios a los transcritos de una célula, por hibridación a ácidos nucleicos inmovilizados en una ordenación o un "biochip". Usando una "ordenación" de ácidos nucleicos en un microchip, algunos o todos los transcritos de una célula pueden cuantificarse simultáneamente. Alternativamente, las

ordenaciones que comprenden ácido nucleico genómico pueden también utilizarse para determinar el genotipo de una cepa recién modificada preparada por los métodos descritos en este documento. Las ordenaciones de polipéptidos también pueden usarse para cuantificar simultáneamente una pluralidad de proteínas. La presente invención se puede poner en práctica con cualquier "ordenación" conocida, también denominada "micro-ordenación" u "ordenación de ácido nucleico" u "ordenación de polipéptido" u "ordenación de anticuerpo" o "biochip," o sus variantes. Las ordenaciones son genéticamente una pluralidad de "puntos" o "elementos diana", donde cada elemento diana comprende una cantidad definida de una o más moléculas biológicas, p. ej., oligonucleótidos, inmovilizadas a un área definida de una superficie de un sustrato para unión específica a una molécula de muestra, p. ej., transcritos de mRNA.

Las "ordenaciones" o "micro-ordenaciones" o "biochips" o "chips" descritos en este documento pueden comprender una pluralidad de elementos diana, donde cada elemento diana comprende una cantidad definida de uno o más polipéptidos (incluidos anticuerpos) o ácidos nucleicos inmovilizados a un área definida de una superficie de sustrato.

En un aspecto, las hidrolasas se usan como formas inmovilizadas. Se puede usar cualquier método de inmovilización, p. ej., inmovilización en un soporte inerte tal como dietilaminoetil-celulosa, vidrio poroso, quitina o células. Las células que expresan las hidrolasas descritas en el presente documento pueden inmovilizarse entrecruzando, p. ej., con glutaraldehído a una superficie del sustrato.

En la práctica de los métodos descritos en este documento, se puede incorporar en todo o en parte cualquier ordenación y/o método conocido para preparar y usar ordenaciones, o sus variaciones, como se describe, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos núm. 6.277.628; 6.277.489; 6.261.776; 6.258.606; 6.054.270; 6.048.695; 6.045.996; 6.022.963; 6.013.440; 5.965.452; 5.959.098; 5.856.174; 5.830.645; 5.770.456; 5.632.957; 5.556.752; 5.143.854; 5.807.522; 5.800.992; 5.744.305; 5.700.637; 5.556.752; 5.434.049; véanse también, p. ej., los documentos WO 99/51773; WO 99/09217; WO 97/46313; WO 96/17958; véanse también, p. ej., Johnston (1998) Curr. Biol. 8:R171-R174; Schummer (1997) Biotechniques 23:1087-1092; Kern (1997) Biotechniques 23:120-124; Solinas-Toldo (1997) Genes, Chromosomes & Cancer 20:399-407; Bowtell (1999) Nature Genetics Supp. 21:25- 32. Véanse también las solicitudes de patentes de Estados Unidos núm. 20010018642; 20010019827; 20010016322; 20010014449; 20010014448; 20010012537; 20010008765.

Anticuerpos y métodos de detección basados en anticuerpos

Se describen anticuerpos sintéticos o recombinantes aislados que se unen específicamente a una hidrolasa descrita en este documento. Estos anticuerpos se pueden usar para aislar, identificar o cuantificar la hidrolasa descrita en este documento o polipéptidos relacionados. Estos anticuerpos se pueden utilizar para aislar otros polipéptidos descritos en la presente memoria u otras hidrolasas relacionadas.

Los "anticuerpos" descritos en este documento pueden comprender péptido(s) o polipéptido(s) derivados de, modelados después o sustancialmente codificados por un gen de inmunoglobulina o genes de inmunoglobulina, o sus fragmentos, capaces de unirse específicamente a un antígeno o epítipo, véanse, p. ej., Fundamental Immunology, Tercera Edición, W.E. Paul, ed., Raven Press, N Y. (1993); Wilson (1994) J. Immunol. Methods 175:267-273; Yarmush (1992) J. Biochem. Biophys. Methods 25:85-97. El término anticuerpo incluye porciones de unión al antígeno, es decir, "sitios de unión al antígeno", (p. ej., fragmentos, subsecuencias, regiones de determinación de complementaridad (CDR)) que retienen la capacidad de unirse al antígeno, incluidos (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un grupo individual de un anticuerpo, (v) un fragmento cLAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementaridad aislada (CDR). Los anticuerpos monocatenarios también se incluyen por referencia en el término "anticuerpo." Se describen anticuerpos, incluidos sitios de unión al antígeno y anticuerpos monocatenarios que se unen específicamente a una hidrolasa descrita en este documento. En la práctica de los métodos descritos en este documento, los polipéptidos que tienen actividad de una hidrolasa también se pueden utilizar.

Los anticuerpos se pueden utilizar en inmunoprecipitación, tinción, columnas de inmuoafinidad y similares. Si se desea, se pueden generar secuencias que codifican anticuerpos específicos por inmunización seguida de aislamiento de un polipéptido o ácido nucleico, ampliación o clonación e inmovilización de un of polipéptido en una ordenación descrita en esta memoria.

Alternativamente, los métodos descritos en este documento se pueden emplear para modificar la estructura de un anticuerpo producido por una célula que se va a modificar, p. ej., la afinidad de un anticuerpo puede aumentarse o reducirse. Asimismo, la capacidad de elaborar o modificar anticuerpos puede consistir en un fenotipo modificado en una célula por los métodos que se describen en el presente documento.

Los métodos de inmunización, producción y aislamiento de anticuerpos (policlonales y monoclonales) se conocen en la técnica y se describen en la bibliografía científica y de patentes, véase, p. ej., Coligan, CURRENT PROTOCOLS

IN IMMUNOLOGY, Wiley/Greene, NY (1991); Stites (eds.) BASIC AND CLINICAL IMMUNOLOGY (7^a ed.) Lange Medical Publications, Los Altos, CA ("Stites"); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (2^a ed.) Academic Press, New York, NY (1986); Kohler (1975) Nature 256:495; Harlow (1988) ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publications, New York. Los anticuerpos también pueden generarse *in vitro*, p. ej., usando genotecas de exhibición de fagos que expresan sitios de unión al anticuerpo recombinante, además de los métodos *in vivo* tradicionales que emplean animales. Véase, p. ej., Hoogenboom (1997) Trends Biotechnol. 15:62-70; Katz (1997) Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:27-45.

Se pueden usar polipéptidos o péptidos para generar anticuerpos, que se unen específicamente a los polipéptidos descritos en esta memoria. Los anticuerpos resultantes se pueden usar en procedimientos de cromatografía de inmunoafinidad para aislar o purificar el polipéptido o determinar si el polipéptido está presente en una muestra biológica. En dichos procedimientos, una preparación de proteínas, tal como un extracto, o una muestra biológica, se pone en contacto con un anticuerpo capaz de unirse específicamente a uno de los polipéptidos descritos en este documento.

En procedimientos de inmunoafinidad, el anticuerpo se une a un soporte sólido, tal como una perla u otra matriz de columna. La preparación de proteínas se dispone en contacto con el anticuerpo bajo condiciones en las que el anticuerpo se une específicamente a uno de los polipéptidos descritos en este documento. Después de un lavado para eliminar proteínas unidas no específicas, se eluyen los polipéptidos específicamente unidos.

La capacidad de las proteínas en una muestra biológica de unirse a un anticuerpo se puede determinar usando cualquiera de una diversidad de procedimientos familiares para el experto en la técnica. Por ejemplo, la unión se puede determinar etiquetando un anticuerpo con una etiqueta detectable tal como un agente fluorescente, una etiqueta enzimática o un radioisotopo. Alternativamente, la unión del anticuerpo a la muestra se puede detectar usando un anticuerpo secundario que tiene allí dicha etiqueta detectable. Los ensayos particulares incluyen ensayos ELISA, ensayos sándwich, radioinmunoensayos y transferencias Western.

Los anticuerpos policlonales generados contra los polipéptidos descritos en este documento se pueden obtener por inyección directa de los polipéptidos a un animal, o administrando los polipéptidos a un animal no humano. El anticuerpo así obtenido se unirá al polipéptido propiamente dicho. De este modo, incluso una secuencia que codifica solamente un fragmento del polipéptido se puede usar para generar anticuerpos que pueden unirse a todo el polipéptido nativo. Dichos anticuerpos pueden luego usarse para aislar el polipéptido de las células que expresan ese polipéptido.

Para preparación de anticuerpos monoclonales, se puede emplear cualquier técnica que provea anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuas. Los ejemplos incluyen la técnica de hibridoma, la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas y la técnica de hibridoma EBV (véase, p. ej., Cole (1985) en Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pág. 77-96).

Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, p. ej., patente de Estados Unidos núm. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos monocatenarios hacia los polipéptidos que se describen en este documento. Alternativamente, se pueden usar ratones transgénicos para expresar anticuerpos humanizados hacia estos polipéptidos o sus fragmentos.

Los anticuerpos generados hacia los polipéptidos descritos en este documento (incluidos idiotipos) se pueden usar para identificar polipéptidos similares de otros organismos y muestras. En dichas técnicas, los polipéptidos del organismo se ponen en contacto con el anticuerpo y se detectan aquellos polipéptidos que se unen específicamente al anticuerpo. Se puede emplear cualquiera de los procedimientos previamente descritos para detectar la unión al anticuerpo.

Hidrolasas inmovilizadas

En un aspecto, las hidrolasas descritas en esta memoria, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas, se usan como formas inmovilizadas, p. ej., para procesar lípidos, en la síntesis estructurada de lípidos, para digerir proteínas y similares. Las lipasas inmovilizadas que se describen en esta memoria se pueden utilizar, p. ej., para hidrólisis de triacilglicéridos, diacilglicéridos o ésteres, o para la esterificación o transesterificación de ácidos grasos, diacilglicéridos o triacilglicéridos, o en la interesterificación de grasas. En un aspecto, la lipasa es específica para esterificación de ácidos grasos con alcohol, específica de 1,3 o específica para la hidrólisis de glicéridos parciales, ésteres o triacilglicéridos. Las lipasas inmovilizadas descritas en este documento se pueden usar en un lecho relleno para transesterificación continua de grasas libres de disolvente. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 4.818.695; 5.569.594.

Se puede usar cualquier método de inmovilización o forma de soporte, p. ej., ordenaciones, perlas, soportes capilares y similares, como se describió anteriormente. En un aspecto, la inmovilización de hidrolasa puede ocurrir en un soporte inerte tal como dietilaminoetil-celulosa, vidrio poroso, quitina o células. Las células que expresan las hidrolasas descritas en esta memoria se pueden inmovilizar por entrecruzamiento, p. ej., con glutaraldehído a una superficie del sustrato. Pueden prepararse hidrolasas inmovilizadas descritas en este documento que contengan hidrolasa unida a un soporte hidrófobo particulado, seco y poroso, con un tensioactivo tal como un éster de ácido

graso de polioxietileno sorbitano o un éster de ácido graso de poliglicerol. El soporte puede ser un polímero alifático olefínico, tal como un polietileno o un polipropileno, un homo- o copolímero de estireno o sus mezclas, o un soporte inorgánico pre-tratado. Estos soportes se pueden seleccionar de polímeros alifáticos olefínicos, polímeros de oxidación, mezclas de estos polímeros o soportes inorgánicos pre-tratados con el fin de hacer que estos soportes sean hidrófobos. Este pretratamiento puede comprender silanización con un compuesto de silicio orgánico. El material inorgánico puede ser una sílice, alúmina, vidrio o cerámica. Los soportes pueden estar hechos de poliestireno, copolímeros de estireno, polietileno, o de copolímeros derivados de (met)acrilatos. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 5.773.266.

Las enzimas de hidrolasa, sus fragmentos y ácidos nucleicos que codifican las enzimas y fragmentos se pueden fijar a un soporte sólido. Esto a menudo es económico y eficiente en el uso de las hidrolasas en procesos industriales. Por ejemplo, un grupo o cóctel de enzimas hidrolasa (o sus fragmentos activos), que se puede utilizar en una reacción química específica, se puede fijar a un soporte sólido y sumergirse en un recipiente de proceso. Puede tener lugar la reacción enzimática. Luego el soporte sólido se puede extraer del recipiente, junto con las enzimas allí fijadas, para uso repetido. Se describe en este documento que un ácido aislado descrito en esta memoria se fija a un soporte sólido. Como se describe en este documento, el soporte sólido se selecciona del grupo de un gel, una resina, un polímero, una cerámica, un vidrio, un microelectrodo y cualquier combinación de éstos.

Por ejemplo, los soportes sólidos descritos en este documento incluyen genes. Algunos ejemplos de geles incluyen SEPHAROSE™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ), gelatina, glutaraldehído, glutaraldehído tratado con quitosán, albúmina-glutaraldehído, quitosán-xantano, gel de toyopearl (gel de polímero), alginato, alginato-polilisina, carragenina, agarosa, glioxilo agarosa, agarosa magnética, dextrano-agarosa, hidrogel de poli(carbamóilsulfonato), hidrogel BSA-PEG, alcohol polivinílico fosforilado (PVA), monoaminoetil-N-aminoetilo (MANA), amino, o cualquiera de sus combinaciones.

Otros soportes sólidos descritos en este documento comprenden resinas o polímeros. Algunos ejemplos de resinas o polímeros incluyen celulosa, acrilamida, nylon, rayón, poliéster, resina de intercambio aniónico, AMBERLITE™ XAD-7, AMBERLITE™ XAD-8, AMBERLITE™ IRA-94, AMBERLITE™ IRC-50 (Rohm and Haas, Filadelfia, PA), polivinilo, poliacrílico, polimetacrilato o cualquiera de sus combinaciones.

Otro tipo de soporte sólido descrito en este documento comprende cerámica. Algunos ejemplos incluyen cerámica no porosa, cerámica porosa, SiO₂, Al₂O₃. Otro tipo de soporte sólido útil en la presente invención es vidrio. Algunos ejemplos incluyen vidrio no poroso, vidrio poroso, vidrio de aminopropilo o cualquiera de sus combinaciones. Otro tipo de soporte sólido que se puede utilizar es un microelectrodo. Un ejemplo es una magnetita recubierta con polietilenimina. Las partículas gráficas se pueden usar como soporte sólido.

Otro tipo de soporte sólido descrito en este documento comprende productos de tierra diatomácea y silicatos. Algunos ejemplos incluyen diatomitas CELITE®, KENITE®, DIACTIV®, PRIMISIL®, DIAFIL® y MICRO-CEL®, y silicatos de calcio y magnesio sintéticos CALFLO®, SILASORB™ y CELKATE® (World Minerals Inc., Santa Barbara, CA).

Otro ejemplo de un soporte sólido es o comprende una célula, tal como un glóbulo rojo.

Kits

Se describen kits que comprenden las composiciones, p. ej., ácidos nucleicos, casetes de expresión, vectores, células, semillas transgénicas o plantas o partes de plantas, polipéptidos (p. ej., hidrolasas) y/o anticuerpos descritos en este documento. Los kits también contienen material de instrucción que describe las metodologías y usos industriales.

Aplicaciones industriales y médicas

Las hidrolasas (p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) descritas en este documento pueden tener muchos usos industriales y aplicaciones médicas, y algunos usos y composiciones ilustrativos se describen a continuación. Los procedimientos descritos en este documento comprenden convertir un fosfolípido no hidratable en una forma hidratable, desgomado de aceite, procesamiento de alimentos, procesamiento de aceites (p. ej., elaborando un aceite de baja saturación) de plantas, pescado, algas y similares, por nombrar unas pocas aplicaciones.

Procesamiento de alimentos y piensos

Se describen procesos para elaborar quesos usando hidrolasas (p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) descritas en la presente memoria. Se describen quesos que comprenden hidrolasas. En un aspecto, las enzimas descritas en este documento (p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas o sus combinaciones) se utilizan para procesar quesos a fin de mejorar el sabor, aumentar el rendimiento y/o para "estabilizar" los quesos, p. ej., reduciendo la tendencia a "desprender aceite" o, en un aspecto, las enzimas descritas en el presente documento se utilizan para producir queso de leche de queso. Estos procesos pueden incorporar cualquier método o protocolo, p. ej., como se describe, p. ej., en las patentes de Estados Unidos núm. 6.551.635 y

6.399.121, WO 03/070013, WO 00/054601. Por ejemplo, en un aspecto, las hidrolasas (p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) que se describen en este documento se usan para estabilizar una emulsión grasa en la leche o en composiciones que comprenden leche, p. ej., crema, y se usan para estabilizar composiciones de leche, p. ej., para fabricar cremas o licores de crema. Se describen procesos para mejorar el sabor de un queso, usando por lo menos una enzima descrita en este documento, donde el proceso comprende incubar una proteína, una grasa y una proteasa y una lipasa (p. ej., como se describe en este documento) en un medio acuoso bajo condiciones que producen un mejor sabor al queso (p. ej., reducción de sabor amargo), p. ej., como se describe en el documento WO 99/66805. En un aspecto, las lipasas descritas en el presente documento se usan para mejorar el sabor en un queso (p. ej., un requesón) mezclando con agua, una proteasa y una fosfolipasa a una temperatura elevada, p. ej., entre aproximadamente 75°C y 95°C, como se describe, p. ej., en la patente de Estados Unidos núm. 4.752.483. En un aspecto, las lipasas descritas en esta memoria se usan para acelerar el añejamiento del queso, añadiendo una enzima descrita en la presente memoria a un queso (p. ej., una leche del queso) antes de añadir un coagulante a la leche, o añadiendo una enzima (p. ej., una lipasa) como se describe en esta memoria a un requesón con sal antes de prensar, p. ej., como se describe, p. ej., en la patente de Estados Unidos núm. 4.707.364. En un aspecto, una lipasa descrita en este documento se utiliza para degradar un triacilglicérido en grasa de leche para liberar ácidos grasos, lo que resulta en un mejor sabor. Una enzima descrita en esta memoria se puede usar también en cualquiera de los procesos descritos en este documento, véase, p. ej., Brindisi (2001) J. of Food Sci. 66:1100- 1107.

Síntesis estructurada y procesamiento de aceites

En determinadas realizaciones, se dan a conocer en este documento métodos para la síntesis estructurada de aceites, lípidos y similares, usando las hidrolasas (p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) descritas en esta memoria. Los métodos descritos aquí comprenden una síntesis biocatalítica de lípidos estructurados, es decir, lípidos que contienen un conjunto definido de ácidos grasos distribuidos en un modo definido en un esqueleto, p. ej., un esqueleto de glicerol. Los productos generados usando las hidrolasas y practicando los métodos descritos en este documento incluyen aceites de poca saturación, p. ej., aceites de vegetales (p. ej., soja, canola), animales, plantas, pescado, algas, en donde los aceites han sido procesados o tratados con un polipéptido de la invención; y alimentos, piensos, suplementos, productos farmacéuticos y similares que comprenden aceites de poca saturación elaborados practicando los métodos y/o composiciones (p. ej., enzimas) de la presente invención. Los productos generados usando las hidrolasas y practicando los métodos descritos en este documento también incluyen alternativas de manteca de cacao, lípidos que contienen ácidos grasos poli-insaturados (PUFA), lípidos que contienen ácidos grasos esenciales, lípidos que contienen ácidos grasos monoinsaturados, lípidos que contienen fosfo-colina y fosfo-serina, lípidos que contienen fitosteroles, 1,3-diacylglicéridos (DAG), 2-monoacylglicéridos (MAG) y triacylglicéridos (TAG).

Los métodos que se dan a conocer en esta invención posibilitan la síntesis de lípidos o ácidos grasos con regioselectividades y estereoselectividades definidas. Se describen en este documento aceites, lípidos y similares, y aceites que se pueden utilizar en alimentos y piensos y en materiales para cocinar (p. ej., aceites para cocinar, aceites para freír, salsas, marinadas, condimentos, aceites en aerosol, margarinas, mayonesa y aderezos para verter y servir con cuchara, alternativas de manteca de cacao y similares) que se han procesado o tratado con los polipéptidos o péptidos (p. ej., hidrolasas, tales como lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) descritos en este documento. En determinadas realizaciones, se describen en este documento productos farmacéuticos, nutracéuticos y cosméticos que comprenden polipéptidos (p. ej., hidrolasas, tales como lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas; o péptidos o anticuerpos) descritos en este documento.

En determinadas realizaciones, se dan a conocer métodos para procesar (modificar) aceites, lípidos y similares, usando hidrolasas. Los métodos se pueden usar para procesar aceites de plantas, animales, microorganismos. Los métodos que se dan a conocer en este documento se pueden utilizar en la síntesis estructurada de aceites similares a aquellos que se encuentran en plantas, animales y microorganismos. Se pueden procesar lípidos y aceites para que tengan una característica deseada. Los lípidos y aceites que se pueden procesar con los métodos descritos en esta memoria (usando las hidrolasas) incluyen alternativas de manteca de cacao, lípidos que contienen ácidos grasos poli-insaturados (PUFA), lípidos que contienen ácidos grasos esenciales, lípidos que contienen ácidos grasos monoinsaturados, lípidos que contienen fosfo-colina y fosfo-serina, lípidos que contienen fitosteroles, 1,3-diacylglicéridos (DAG), 2-monoacylglicéridos (MAG) y triacylglicéridos (TAG). En un aspecto los aceites y grasas procesados y sintéticos (p. ej., alternativas de manteca de cacao y aceites vegetales) se pueden emplear en una diversidad de aplicaciones, p. ej., en la producción de alimentos (p. ej., de repostería, pastelería) y en la formulación de productos farmacéuticos, nutracéuticos y cosméticos. Se dan a conocer en este documento métodos para procesar grasas y aceites, p. ej., semillas oleaginosas, de plantas que incluyen, p. ej., canola, ricino, coco, coriandro, maíz, semilla de algodón, avellana, cáñamo, lino, hierba de la pradera, oliva, aceite de palma, palmiste, cacahuete, colza, salvado de arroz, cártamo, sasanqua, soja, girasol, resina, tsubaki, variedades de aceites "naturales" que tienen composiciones de ácidos grasos alteradas mediante Organismos Genéticamente Modificados (GMO) o cruza tradicionales tales como aceites de alto contenido oleico, bajo contenido linolénico o de baja saturación (canola de alto contenido oleico, soja de bajo contenido linolénico o girasol de alto contenido esteárico) o mezclas de cualquiera de los anteriores, usando una hidrolasa.

En determinadas realizaciones, se dan a conocer en este documento métodos para procesar aceites de animales, p. ej., pescado (pez vela, hígado de bacalao, pargo alazán, sardina, arenque, sábalo y similares), mamíferos (cerdo,

vacunos y similares) y aves (pollo y similares), usando hidrolasas. En determinadas realizaciones, se dan a conocer métodos para la síntesis estructurada de aceites similares a aquellos que se hallan en animales, p. ej., pescados, aves y mamíferos, y microorganismos, usando hidrolasas. En un aspecto, estos aceites sintéticos o procesados se usan como aditivos de pienso, alimento, como ingredientes en formulaciones farmacéuticas, nutracéuticos o cosméticos. Por ejemplo, en un aspecto, las hidrolasas se usan para hidrolizar ácidos grasos fuera de los aceites de pescado, de modo que los ácidos grasos pueden recuperarse y utilizarse como aditivo de pienso. En un aspecto, las hidrolasas se pueden utilizar para procesar aceite de desecho de restaurantes y convertirlo en grasas animales.

En otras realizaciones, se dan a conocer en el presente documento métodos para procesar grasas y aceites, p. ej., de aceites de algas que incluyen, p. ej., aceite de *Neochloris oleoabundans*, aceite de *Sceriedesmus dimorphus*, aceite de *Euglena gracilis*, aceite de *Phaeodactylum tricornutum*, aceite de *Pleurochrysis carterae*, aceite de *Prymnesium parvum*, aceite de *Tetraselmis chui*, aceite de *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, aceite de *Nannochloropsis salina*, aceite de *Botryococcus braunii*, aceite de *Dunaliella tertiolecta*, aceite de especies de *Nannochloris*, aceite de especies de *Spirulina*, aceite de *Chlorophycease* (alga verde) y aceite de *Bacilliarophy* o mezclas de cualquiera de dichas grasas o aceites.

En un aspecto, las hidrolasas son biocatalizadores versátiles en síntesis orgánica, p. ej., en la síntesis estructurada de aceites, lípidos y similares. Las enzimas (incluidas hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) pueden aceptar una amplia gama de sustratos, incluidos alcoholes secundarios y terciarios, p. ej., de un producto natural tal como alfa-terpineol, linalool y similar. En algunos aspectos, las hidrolasas tienen buena a excelente enantioespecificidad (p. ej., estereoespecificidad).

Se describe un proceso de conversión de un aceite (p. ej., aceites vegetales, mantecas de cacao y similares) que comprende por lo menos una enzima (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descrita en el presente documento. En un aspecto, un proceso de conversión de aceite comprende una hidrólisis controlada y acilación, p. ej., acilación de glicerol, que puede resultar en alta pureza de una amplia gama de productos. En un aspecto, las hidrolasas (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa) descritas en esta memoria se usan para producir aceites de diacilglicerol y aceites nutricionales estructurados. En determinadas realizaciones, se dan a conocer en este documento procesos para la esterificación de propilenglicol usando una enzima, p. ej., una lipasa regio- y/o quimio- selectiva para esterificación mono-sustituída en la posición Sn-1. Se dan a conocer en este documento procesos para la síntesis estructurada de aceites con perfiles de ácido graso saturados o insaturados dirigidos que usan una enzima, p. ej., una lipasa regio- y/o quimio-selectiva para la eliminación de un ácido graso saturado, o para la adición dirigida de un ácido graso a un esqueleto de glicerol.

En un aspecto, los métodos descritos en este documento comprenden además procesos para la eliminación selectiva de ácidos grasos (p. ej., ácidos grasos no deseados) de aceites, p. ej., separando ácidos grasos saturados y/o insaturados de aceites, usando una hidrolasa (p. ej., una lipasa, saturasa, palmitasa y/o estearatasa). Los procesos que se dan a conocer en este documento pueden separar ácidos grasos saturados y/o insaturados de cualquier aceite, p. ej., un aceite de soja. La enzima puede ser quimioselectiva y/o enantioselectiva. En un aspecto, estos procesos generan grasas y aceites de alta estabilidad, p. ej., aceites para freír “saludables”. Estos procesos ilustrativos que se dan a conocer en el presente documento se pueden utilizar para generar aceites con menos azufre, p. ej., usando un proceso que comprende eliminar el azufre del aceite en bruto. Las enzimas pueden también emplearse en procesos de interesterificación para éstos y otros propósitos.

En un aspecto, una enzima se usa para generar un aceite de grasa “no-trans”.

En un aspecto, un aceite “no-trans” se genera a partir de un aceite parcialmente hidrogenado para producir un aceite solamente cis. La enzima puede ser quimioselectiva y/o enantioselectiva.

En otras realizaciones, se describen en este documento procedimientos para modificar mantecas de cacao usando una enzima. Aproximadamente 80% de las mantecas de cacao comprenden triacilglicéridos POP, SOS y POS (P es ácido graso palmítico, O es ácido graso oleico, S es ácido graso esteárico).

La estructura de ácido graso saturado-insaturado-saturado de las mantecas de cacao imparte sus perfiles de fusión característicos, p. ej., en chocolates. En un aspecto, los procesos estructurados y sintéticos directos que se dan a conocer en este documento se usan en mantecas de cacao para reducir variaciones en la manteca de cacao o producir mantecas de cacao sintéticas (“alternativas a mantecas de cacao”). En un aspecto, una hidrolasa quimioselectiva y/o enantioselectiva (p. ej., una regioselectiva) (p. ej., lipasa o esterasa) se utiliza para fabricar una alternativa a la manteca de cacao, p. ej., un sustituto de manteca de cacao, un reemplazante de manteca de cacao y/o un equivalente de manteca de cacao. Se dan a conocer en esta memoria alternativas a manteca de cacao, incluidos sustitutos de manteca de cacao, reemplazantes de manteca de cacao y equivalentes de manteca de cacao, y sus intermedios de fabricación que comprenden una enzima. Un proceso descrito en esta invención (que usa una enzima) para elaborar alternativas a la manteca de cacao puede comprender mezclar un aceite vegetal, p. ej., un aceite de palma, con manteca de Karité o equivalente, illipe o equivalente, esterinas de sal o equivalentes, y tratar los aceites mezclados con polipéptidos. En un aspecto, el proceso que se describe en este documento comprende el uso de interesterificación. El proceso que se da a conocer en este documento puede generar formas de composición o cristalinas que imitan la manteca de cacao natural.

En determinadas realizaciones, se dan a conocer en este documento procesos (que usan una enzima) para producir un diacilglicerol (DAG), p. ej., 1,3 diacilglicerol, que usa un aceite vegetal, p. ej., un aceite de bajo costo. La enzima puede ser quimioselectiva y/o enantioselectiva. El proceso que se da a conocer en este documento puede resultar en una composición que comprende una composición que comprende DAG que tiene desempeño de buena estabilidad, larga vida útil y alta temperatura.

Las enzimas (hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) y métodos que se dan a conocer en este documento también se pueden usar en el tratamiento enzimático de aceites comestibles, como se describe, p. ej., en la patente de Estados Unidos núm. 6.025.171. En este método ilustrativo, las enzimas se inmovilizan preparando una emulsión que contiene una fase hidrófoba continua, tal como un aceite de triacilglicérido, y una fase acuosa dispersada que contiene una enzima anfífila, tal como una lipasa, y un material vehículo que se disuelve parcialmente y no se disuelve parcialmente en la fase acuosa, y eliminar agua de la fase acuosa hasta que la fase se convierte en partículas vehículo recubiertas con una enzima sólida. La parte no disuelta del material vehículo puede ser un material que sea insoluble en agua y aceite, o un material soluble en agua en forma no disuelta, ya que la fase acuosa ya está saturada con el material soluble en agua. La fase acuosa puede estar formada con un líquido de fermentación de lipasa en bruto que contiene residuos de fermentación y biomasa que pueden servir como materiales vehículo. La lipasa inmovilizada es útil para reordenamiento de éster y desacidificación en aceites. Después de una reacción la enzima inmovilizada puede regenerarse para una reacción subsiguiente añadiendo agua para obtener la disolución parcial del vehículo, y con la enzima resultante y la fase acuosa que contiene el vehículo dispersado en una fase hidrófoba evaporar agua para nuevamente formar partículas de vehículo recubierto con enzima.

Las enzimas (p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) y los métodos que se dan a conocer en este documento también se pueden emplear para preparar aceites transesterificados, como se describe, p. ej., en la patente de Estados Unidos núm. 5.288.619. Se dan a conocer en esta memoria métodos para transesterificación enzimática para preparar un aceite de margarina que tiene un contenido de ácido graso de cadena intermedia baja y ácido trans. El método incluye las etapas de proporcionar una mezcla de reacción de transesterificación que contiene un material fuente de ácido esteárico y un aceite vegetal líquido comestible, transesterificar el material fuente de ácido esteárico y el aceite vegetal usando una lipasa específica de las posiciones 1-, 3, y luego finalmente hidrogenar la mezcla de ácido graso para proveer un material fuente de ácido graso esteárico reciclado para una reacción recíclica con el aceite vegetal. Se da a conocer un método contracorriente para preparar un aceite transesterificado. El método incluye las etapas de proveer una zona de reacción de transesterificación que contiene una lipasa específica de las posiciones 1 y 3, introduciendo un aceite vegetal en la zona de transesterificación, introduciendo un material fuente de ácido esteárico, conduciendo un gas supercrítico o fluido contracorriente de gas licuado subcrítico, llevando a cabo una reacción de transesterificación de la corriente de triacilglicérido con el ácido esteárico o la corriente de monoéster de ácido esteárico en la zona de reacción, retirando una corriente de aceite de margarina de triacilglicérido transesterificada, retirando una fase de fluido contracorriente, hidrogenando el ácido esteárico transesterificado o monoéster de ácido esteárico para proveer un material fuente de ácido esteárico reciclado hidrogenado e introducir el material fuente de ácido esteárico reciclado hidrogenado en la zona de reacción.

En un aspecto, para permitir que la enzima actúe, ambas fases, la fase oleosa y la fase acuosa que contienen la enzima, deben mezclarse íntimamente. Puede no ser suficientemente con solamente mezclarlas. La buena dispersión de la enzima en el aceite se auxilia si se disuelve en una pequeña cantidad de agua, p. ej., 0,5-5% en peso (en relación al aceite), y se emulsiona en el aceite en esta forma, para formar gotitas de menos de 10 micrómetros de diámetro (peso promedio). Las gotitas pueden tener un tamaño menor que 1 micrómetro. La agitación turbulenta puede realizarse con velocidades radiales por encima de 100 cm/seg. El aceite también puede circularse en el reactor usando una bomba rotatoria externa. La fase acuosa que contiene la enzima puede dispersarse finamente mediante acción de ultrasonido. Se puede usar un aparato de dispersión.

En un aspecto, una reacción enzimática que se da a conocer en este documento tiene lugar en la superficie limítrofe entre la fase oleosa y la fase acuosa. Es la meta de todas estas medidas para mezclado crear la mayor superficie posible para la fase acuosa que contiene la enzima. La adición de tensioactivos aumenta la microdispersión de la fase acuosa. En algunos casos, por lo tanto, los tensioactivos con valores HLB encima de 9, tales como sulfato de Na-dodecilo, se añaden a la disolución enzimática, como se describe, p. ej., en el documento EP-A 0 513 709. Un método eficaz similar para mejorar la emulsificación es la adición de lisolecitina. Las cantidades añadidas pueden yacer en el intervalo de 0,001% a 1%, con referencia al aceite. La temperatura durante el tratamiento de la enzima no es crítica. Se pueden usar temperaturas entre 20°C y 80°C, pero ésta última solamente puede aplicarse por un periodo de tiempo breve. En este aspecto, se emplea una lipasa que tiene una buena temperatura y/o tolerancia de bajo pH. Las temperaturas de aplicación entre 30°C y 50°C son óptimas. El periodo de tratamiento depende de la temperatura y puede mantenerse por menos tiempo con una temperatura en aumento. Los tiempos de 0,1 a 10 horas, o 1 a 5 horas son en general suficientes. La reacción tiene lugar en un reactor, que puede estar dividido en etapas. Por lo tanto, es posible una operación continua, junto con la operación de lotes. La reacción se puede llevar a cabo en etapas de distintas temperaturas. Por ejemplo, la incubación puede tener lugar durante 3 horas a 40°C, luego durante 1 hora a 60°C. Si la reacción procede en etapas, esto también abre la posibilidad de ajustar diferentes valores de pH en las etapas individuales. Por ejemplo, en la primera etapa, el pH de la disolución puede ajustarse hasta 7, por ejemplo, en una segunda etapa hasta 2,5, añadiendo ácido cítrico u otros ácidos adecuados. En por lo

menos una etapa, no obstante, el pH de la disolución enzimática debe estar por debajo de 4, o por debajo de 3. Si el pH se ajustó subsiguientemente debajo de este nivel, se puede encontrar un efecto de deterioro. En consecuencia, el ácido cítrico puede añadirse a la disolución enzimática antes de que este último se mezcle en el aceite.

5 Las enzimas (hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas) y los métodos que se dan a conocer en este documento también se pueden utilizar para preparar aceites, como se describe, p. ej., en la solicitud de patente de Estados Unidos núm. 11/567.318. Se dan a conocer en la presente memoria procesos continuos para tratamiento enzimático de lípidos.

10 El método se refiere a un proceso y un aparato para interesterificación enzimática continua de composiciones que contienen lípidos, usando una pluralidad de reactores de lecho fijo, en donde el flujo de la composición que contiene lípidos a través del aparato puede permanecer sustancialmente constante, incluso a medida que disminuye la actividad enzimática de un lecho fijo con el transcurso del tiempo, e incluso cuando un lecho fijo se saca de la línea, tal como para reparación, reemplazo o reposición.

15 En una realización, se da a conocer en este documento un método para hidrolizar un aceite o una grasa, haciendo reaccionar el aceite o la grasa con una enzima palmitasa. En una realización, la hidrólisis se realiza en presencia de un emulsionante que tiene HLB mayor que 12. En una realización, la enzima palmitasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 85%, 90%, 95%, 97%, 99%, 99,5% o 100% identidad de secuencia con la SEC ID NÚM: 1 y que tiene i) un cambio nucleotídico (o su equivalente) que codifica el residuo de aminoácidos en la posición 95 (o su equivalente) como se expone en la 9, ii) cambios nucleotídicos (o su equivalente) que codifican los residuos de aminoácidos en las posiciones 85 y 172 (o su equivalente) como se expone en la Tabla 15, iii) un cambio nucleotídico (o su equivalente) que codifica el residuo de aminoácidos en la posición 83 (o su equivalente) como se expone en la Tabla 16, y iv) las siguientes mutaciones silenciosas 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT y 188ACG. En una realización, la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de SEC ID NÚM:1 y tiene i) un cambio nucleotídico (o su equivalente) que codifica el residuo de aminoácidos en la posición 95 (o su equivalente) como se expone en la Tabla 9, ii) cambios nucleotídicos (o su equivalente) que codifican los residuos de aminoácidos en las posiciones 85 y 172 (o su equivalente) como se expone en la Tabla 15, iii) un cambio nucleotídico (o su equivalente) que codifica el residuo de aminoácidos en la posición 83 (o su equivalente) como se expone en la Tabla 16, y iv) las siguientes mutaciones silenciosas 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT y 188ACG. En una realización, la enzima palmitasa es el hit termotolerante 29 como se describe en la Tabla 9, y tiene i) un cambio de nucleótido (o su equivalente) que codifica el residuo de aminoácidos en la posición 95 (o su equivalente) como se expone en la Tabla 9, ii) cambios de nucleótidos (o su equivalente) que codifican los residuos de aminoácidos en las posiciones 85 y 172 (o su equivalente) como se expone en Tabla 15, iii) un cambio de nucleótido (o su equivalente) que codifica el residuo de aminoácidos en la posición 83 (o su equivalente) como se expone en Tabla 16, y iv) las siguientes mutaciones silenciosas 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT y 188ACG. En una realización, la enzima palmitasa utilizada en los métodos que se dan a conocer en esta invención es la enzima 29 SM con las siguientes mutaciones silenciosas 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT y 188ACG como se describe en el Ejemplo 12.

40 En determinadas realizaciones, el emulsionante tiene HLB mayor que 12, 14, 16 o 18. En determinadas realizaciones, el emulsionante se selecciona entre oleato sódico, oleato potásico, linoleato sódico, linoleato potásico, linolenato sódico, linolenato potásico, laureato sódico, laureato potásico, estearato sódico, estearato potásico, palmitato sódico, palmitato potásico, palmoleato sódico, palmoleato potásico o una de sus combinaciones. En determinadas realizaciones, la mezcla de reacción comprende aproximadamente 1 a 20% de agua en base al peso total de los reaccionantes. En una realización, la mezcla de reacción comprende aproximadamente 1, 3, 5, 7, 10, 15, 17 o 20% de agua basado en el peso total de los reaccionantes.

45 En determinadas realizaciones, el aceite o la grasa se mezclan con el emulsionante antes de la adición de la enzima palmitasa. En determinadas realizaciones, la mezcla de aceite/grasa y el emulsionante se homogeneizan antes y/o después de la adición de la enzima palmitasa para asegurar una emulsión uniforme.

50 En determinadas realizaciones, la reacción se lleva a cabo a aproximadamente 20 a 70 °C. En determinadas realizaciones, la reacción se lleva a cabo a aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60 o 70 °C. En determinadas realizaciones, la enzima palmitasa reduce el contenido de palmitato del aceite/grasa hasta aproximadamente 5% o menos. En determinadas realizaciones, la enzima palmitasa reduce el contenido de palmitato del aceite/grasa hasta aproximadamente 5, 4, 3, 2, 1% o menos. En determinadas realizaciones, la reducción deseada en el contenido de palmitato tiene lugar en aproximadamente o menos de aproximadamente 48 h, 24 h, 20 h, 16 h, 12 h, 10 h, 5 h o 3h. En determinadas realizaciones, el método comprende además un pre-tratamiento del aceite/grasa para eliminar goma y fase acuosa a fin de reducir los ácidos grasos libres. Se puede usar cualquier método de pre-tratamiento considerado adecuado por el experto en la técnica. En determinadas realizaciones, el método también comprende la adición de una base (adición cáustica) para formar jabones.

60 En determinadas realizaciones, el aceite utilizado en la reacción es aceite refinado o aceite en bruto. En una realización, la reacción comprende además la adición de un fosfolípido. Se puede usar cualquier fosfolípido que el experto en la técnica considere adecuado en las reacciones. En una realización, el fosfolípido es lecitina. En una

realización, el aceite utilizado en las reacciones que se dan a conocer en el presente documento es aceite refinado y la reacción comprende la adición de un fosfolípido.

Nutracéuticos

5 En un aspecto, las composiciones y los métodos que se dan a conocer en este documento se pueden utilizar para elaborar nutraceuticos, procesando o sintetizando lípidos y aceites usando enzimas, p. ej., hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas. En un aspecto, los lípidos o aceites procesados o sintetizados incluyen ácidos grasos poli-insaturados (PUFA), diacilglicéridos, p. ej., 1,3-diacilglicéridos (DAG), monoacilglicéridos, p. ej., 2-monoacilglicéridos (MAG) y triacilglicéridos (TAG). En un aspecto, los nutraceuticos se elaboran procesando diacilglicéridos, p. ej., 1,3-diacilglicéridos (DAG), monoacilglicéridos, p. ej., 2-monoacilglicéridos (MAG) y/o triacilglicéridos (TAG) de fuentes vegetales (p. ej., semilla de algodón) o fuentes animales (p. ej., aceite de pescado). Se describen nutraceuticos (p. ej., composiciones dietarias) que comprenden los polipéptidos (p. ej., enzimas, péptidos, anticuerpos) descritos en esta memoria.

15 En un aspecto, las composiciones y los métodos que se dan a conocer en este documento se pueden utilizar para fortificar composiciones dietarias, especialmente productos a base de leche de vaca, p. ej., fórmulas infantiles a base de leche de vaca, con hidrolasas activadas por sales biliares. Las composiciones elaboradas por los métodos y las composiciones se pueden emplear para alimentar a bebés recién nacidos y prematuros, incluida la administración de una hidrolasa activada por sales biliares descrita en este documento para aumentar la digestión de grasa y en consecuencia el índice de crecimiento. En determinadas realizaciones, se describen en este documento composiciones y métodos para tratar a sujetos con producción de enzimas pancreáticas inadecuada por administración de hidrolasa activada con sales biliares en conjunto con ingestión de grasas; véase también el análisis a continuación.

20 Se describen composiciones dietarias que comprenden una hidrolasa, p. ej., una hidrolasa activada por sales biliares. Se describen composiciones dietarias que comprenden una base nutricional que comprende una grasa y una cantidad eficaz de una hidrolasa activada por sales biliares. Se describen fórmulas para bebés a base de leche de vaca que comprenden una hidrolasa, p. ej., una hidrolasa activada por sales biliares. En un aspecto, la hidrolasa descrita en este documento es activa en la digestión de ácidos grasos de cadena larga, p. ej., C₁₂ a C₂₂, que componen un muy alto porcentaje de la mayoría de las leches, p. ej., 99% de leche materna humana. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 5.000.975.

30 Se describen composiciones dietarias que comprenden una grasa de aceite vegetal y una hidrolasa descrita en la presente memoria. En otras realizaciones, se dan a conocer en este documento métodos para procesar productos a base de leche y/o composiciones que comprenden aceite vegetal para elaborar composiciones dietarias. En un aspecto, las composiciones procesadas comprenden un aceite de ácido láurico, un aceite de ácido oleico, un aceite de ácido palmítico y/o un aceite de ácido linoleico. En un aspecto, se puede utilizar un aceite de salvado de arroz, aceite oleico de girasol y/o aceite de canola como aceite de ácido oleico. En un aspecto, las grasas y aceites, p. ej., semillas de aceite de plantas que incluyen, p. ej., canola, ricino, coco, coriandro, maíz, semilla de algodón, avellana, cáñamo, lino, hierba de la pradera, oliva, aceite de palma, palmiste, cacahuate, colza, salvado de arroz, cártamo, sasanqua, soja, girasol, resina, tsubaki, variedades de aceites "naturales" que tienen composiciones de ácido graso alteradas mediante Organismos Genéticamente Modificados (GMO) o cruza tradicionales tales como aceites de alto contenido oleico, bajo contenido linoléico o de baja saturación (canola con alto contenido oleico, soja con bajo contenido linoléico o girasol con alto contenido esteárico), mezclas de cualquiera de los anteriormente mencionados para uso en los nutraceuticos y composiciones dietarias se procesan o elaboran usando una hidrolasa descrita en el presente documento. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 4.944.944.

45 En un aspecto, las enzimas descritas en este documento se proveen en una forma que es estable a almacenamiento en la fórmula y/o el estómago, pero activa cuando la formulación alcanza la porción del tubo digestivo en donde la fórmula normalmente se digeriría. Las formulaciones (p. ej., microcápsulas) para liberación en el intestino se conocen en la técnica, p. ej., polímeros biodegradables tales como poliláctico y poliglucólido, como se describe, p. ej., en las patentes de Estados Unidos núm. 4.767.628; 4.897.268; 4.925.673; 5.902.617.

Productos de repostería, manteca de cacao y alimentos

50 En un aspecto, las composiciones y métodos descritos en este documento se pueden usar para elaborar y procesar mantequillas duras, tales como manteca de cacao. En otro aspecto, se describen en este documento productos de repostería, mantecas de cacao y alimentos, que comprenden los polipéptidos (p. ej., enzimas, péptidos, anticuerpos) descritos en este documento.

55 Las composiciones y métodos descritos en este documento se pueden utilizar para elaborar alternativas a manteca de cacao mediante técnicas sintéticas "estructuradas" que usan las enzimas, p. ej., hidrolasas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas descritas en la presente invención. Por ejemplo, en un aspecto, los métodos que se dan a conocer en esta memoria procesan o sintetizan triacilglicéridos, diacilglicéridos y/o monoacilglicéridos para uso como, p. ej., alternativas a manteca de cacao. En un aspecto, los métodos que se dan a conocer en esta memoria generan una mantequilla dura con una "región plástica" definida para mantener dureza suficiente debajo de

o a temperatura ambiente. En un aspecto, el lípido procesado o sintetizado está diseñado para tener una “región plástica” muy estrecha, p. ej., en un aspecto, donde se funde rápidamente a aproximadamente la temperatura corporal. La manteca de cacao natural comienza a ablandarse a aproximadamente 30°C a 32°C, y se funde completamente a aproximadamente 36°C. La manteca de cacao natural contiene 70% en peso o más de tres 2-oleilglicerol saturados en 1,3, que son 1,3-dipalmitoil-2-oleoil glicerol (POP), 1-palmitoil-2-oleoil-3-stearoilglicerol (POSt) y 1,3-distearoil-2-oleoilglicerol (StOSt). Estos tres glicerol exhiben una conducta de fusión similar entre sí y son responsables de las propiedades de fusión de la manteca de cacao, exhibiendo una región plástica muy estrecha. Se describen mantecas de cacao sintéticas o mantecas de cacao procesadas (sintetizadas o procesadas usando una hidrolasa descrita en este documento, donde las tres composiciones posibles se denominan alternativas a la manteca de cacao) con porcentajes variables de 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerol (POP), 1-palmitoil-2-oleoilglicerol (POSt) y 1,3-distearoil-2-oleoilglicerol (StOSt), dependiendo de las propiedades deseadas de la manteca de cacao sintética, y mantecas de cacao sintéticas con más o menos de 70% en peso de los tres 2-oleoilglicerol disaturados 1,3. Las mantecas de cacao sintéticas descritas en este documento pueden reemplazar parcial o totalmente mantecas de cacao naturales o no procesadas y pueden mantener o mejorar las propiedades esenciales de la manteca dura.

Se describen mantecas de cacao sintéticas o procesadas (sintetizadas o procesadas usando una hidrolasa descrita en este documento) con las propiedades deseadas para uso en productos de repostería, panadería y farmacéuticos. Se describen productos de repostería, panadería y farmacia, y similares, que comprenden una hidrolasa descrita en el presente documento. En un aspecto, los métodos que se dan a conocer en esta memoria elaboran o procesan un lípido (una grasa) de un artículo de repostería (p. ej., un chocolate) o se usan en repostería. En un aspecto, se elabora o procesa un lípido de modo tal que el chocolate exhibe menos impresión de huellas dactilares que el chocolate elaborado a partir de manteca de cacao natural, mientras que conserva las características de derretirse en la boca. En un aspecto, se elabora o procesa un lípido de forma tal que un producto de repostería (p. ej., chocolate) se puede elaborar a una temperatura ambiente comparativamente alta, o se puede elaborar usando agua refrigerada a una temperatura comparativamente alta. En un aspecto, el lípido se elabora o procesa de modo tal que un artículo de repostería (p. ej., chocolate) se puede almacenar bajo condiciones relativamente más cálidas, p. ej., condiciones tropicales o semi-tropicales o en edificios con calefacción central. En un aspecto, los lípidos se elaboran o procesan de forma tal que un artículo de repostería (p. ej., chocolate) tendrá un contenido de lípido (grasa) de composición y calidad consistentes. Se pueden emplear enzimas para proveer una composición sustituta para la manteca de cacao, que puede mejorar significativamente su estabilidad térmica y reemplazarla en una amplia gama de aplicaciones.

Producción de margarina y manteca vegetal

Se describen grasas sintéticas o procesadas, p. ej., margarina y manteca vegetal, sintetizadas o procesadas usando una hidrolasa descrita en este documento.

Se describen grasas sintéticas o procesadas, p. ej., margarina y manteca vegetal, que comprenden los polipéptidos (p. ej., enzimas, péptidos, anticuerpos) descritos en este documento.

Se describen grasas procesadas que comprenden un aceite vegetal, tal como aceite de canola, ricino, coco, coriandro, maíz, semilla de algodón, avellana, cáñamo, lino, hierba de la pradera, oliva, palma, palmiste, cacahuete, colza, salvado de arroz, cártamo, sasanqua, sésamo, soja, girasol, resina, tsubaki, variedades de aceites “naturales” que tienen composiciones de ácido graso alteradas mediante Organismos Genéticamente Modificados (GMO) o por “cruza” tradicional, tal como aceites de alto contenido oleico, bajo contenido linolénico o aceites de baja saturación (canola de alto contenido oleico, soja de bajo contenido linolénico o girasol de alto contenido esteárico) sintetizados o procesados usando una hidrolasa descrita en este documento. Las grasas sintéticas o procesadas, p. ej., margarina y manteca vegetal, se diseñan para tener una “plasticidad” deseada. Muchos de los productos de grasa plásticos, tales como margarina y manteca vegetal, se producen a partir de materiales duros y aceites líquidos como materia prima. Por ejemplo, aceites líquidos tales como aceite de canola, ricino, coco, coriandro, maíz, semilla de algodón, avellana, cáñamo, lino, hierba de la pradera, oliva, palma, palmiste, cacahuete, colza, salvado de arroz, cártamo, sasanqua, sésamo, soja, girasol, resina, tsubaki, variedades de aceites “naturales” que tienen composiciones de ácido graso alteradas mediante Organismos Genéticamente Modificados (GMO) o por “cruza” tradicional, tal como aceites de alto contenido oleico, bajo contenido linolénico o aceites de baja saturación (canola de alto contenido oleico, soja de bajo contenido linolénico o girasol de alto contenido esteárico), se mezclan con aceites hidrogenados (materiales duros), y la mezcla se ajusta hasta una consistencia apropiada (plasticidad). Los productos de grasa plásticos tales como la margarina y la manteca vegetal así producidos tienden a causar la formación de cristales relativamente gruesos debido a que las grasas y aceites utilizados como materia prima están compuestos de ácidos grasos que tienen prácticamente la misma longitud de la cadena de carbono. En otros términos, tienen una composición altamente unificada de ácidos grasos. Por este motivo, la plasticidad de estos productos puede mantenerse en un grado apropiado solamente con un intervalo de temperatura estrecho, de manera que los aceites líquidos contenidos allí tengan una tendencia a exudarse. Se dan a conocer en la presente memoria métodos para elaborar o procesar grasas diseñadas de forma tal que tienen una composición variada (y definida) de ácidos grasos. El aceite resultante, p. ej., margarina o manteca vegetal, puede tener un intervalo más amplio de plasticidad.

En un aspecto, los métodos y composiciones que se dan a conocer en la presente memoria se usan para elaborar y procesar aceites vegetales tales como aceite de canola, ricino, coco, coriandro, maíz, algodón, avellana, cáñamo, lino, hierba de la pradera, oliva, palma, palmiste, cacahuete, colza, salvado de arroz, cártamo, sasanqua, sésamo, soja, girasol, resina, tsubaki, variedades de aceites "naturales" que tienen composiciones de ácido graso alteradas mediante Organismos Genéticamente Modificados (GMO) o por "cruza" tradicional, tal como aceites de alto contenido oleico, bajo contenido linolénico o aceites de baja saturación (canola de alto contenido oleico, soja de bajo contenido linolénico o girasol de alto contenido esteárico) que usan hidrolasas, incluyendo inter-esterificación y transesterificación enzimática, véanse, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 5.288.619 y la solicitud de patente de Estados Unidos de serie núm. 11/567.318. Los métodos y composiciones que se dan a conocer en este documento se pueden usar en lugar de interesterificación aleatoria como se describe, p. ej., en la patente de Estados Unidos núm. 3.949.105. En un aspecto, los métodos y composiciones que se dan a conocer en la presente memoria se utilizan en transesterificación enzimática para preparar un aceite, p. ej., un aceite de margarina, que tiene contenido de ácido graso de cadena intermedia baja y ácido trans.

En un aspecto, la estructura sintética de un aceite, p. ej., aceites de tipo palma o láuricos, se modifica, p. ej., a una estructura aleatoria. Por lo tanto, los métodos que se dan a conocer en esta memoria se pueden emplear para modificar las propiedades de productos de grasa plásticos. En un aspecto, la modificación de aceites por los métodos que se describen en esta memoria se puede diseñar para prevenir o reducir gradualmente la hidrogenación del aceite con el tiempo, particularmente cuando los productos están siendo almacenados.

En un aspecto, los métodos y composiciones que se dan a conocer en este documento en una mezcla de reacción de transesterificación que comprende un material fuente de ácido esteárico y un aceite vegetal líquido comestible, transesterificando el material fuente de ácido esteárico y el aceite vegetal usando una lipasa específica de las posiciones 1 y 3 como se describe en la invención, y luego hidrogenando la mezcla de ácido graso para proveer un material fuente de ácido esteárico reciclado para reacción recíclica con el aceite vegetal. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 5.288.619.

En un aspecto, una reacción de interesterificación se realiza con una lipasa. En un aspecto, la lipasa tiene selectividad para las posiciones 1 y 3 de triacilglicérido para demorar o inhibir un incremento en la cantidad de triacilglicéridos trisaturados en el aceite. En esta reacción descrita en la presente memoria, las deficiencias de la interesterificación aleatoria convencional y la dificultad de la interesterificación con una lipasa no específica pueden superarse debido a que la interesterificación es realizada por una enzima que tiene especificidad para las posiciones 1 y 3 de triacilglicéridos. En un aspecto, la exudación de aceites líquidos contenidos en los productos se demora o previene con un incremento de temperatura en la reacción para inhibir un aumento en el punto de fusión causado por un incremento en la cantidad de triacilglicéridos trisaturados. Esto aborda el problema de hidrogenación de los productos durante el almacenamiento a largo plazo.

Composiciones farmacéuticas y tratamiento de deficiencias de hidrolasa

Se describen métodos y composiciones (enzimas descritas en este documento, p. ej., esterases, acilasas, lipasas, fosfolipasas o proteasas) que se pueden usar en el tratamiento de una deficiencia de hidrolasa en un animal, p. ej., un mamífero, tal como un ser humano. Por ejemplo, en un aspecto, los métodos y composiciones que se describen en este documento se usan para tratar a pacientes que padecen una deficiencia de una lipasa pancreática.

En un aspecto, la lipasa se administra por vía oral. Puede administrarse una enzima descrita en esta memoria, en lugar de o conjuntamente con una preparación de enzima de páncreas de cerdo.

Se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos (p. ej., enzimas, péptidos, anticuerpos) descritos en la presente memoria. Estas composiciones farmacéuticas pueden tener la forma de comprimidos, píldoras, geles, cápsulas, hidrogeles, pulverizaciones, polvos, aerosoles, implantes, liposomas, cremas, ungüentos, líquidos, una microesfera, una partícula de núcleo multiparticulado, una emulsión, una suspensión, nanoestructuras y similares. Las composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos (p. ej., enzimas, péptidos, anticuerpos) descritos en este documento se pueden administrar de cualquier forma, p. ej., oral, intradérmica, intraperitoneal, por inyección intravenosa, tópica y similar. En un aspecto, las composiciones farmacéuticas descritas en este documento se formulan para administración tópica, sublingual, oral, intravenosa, subcutánea, intramuscular, transdérmica, intraarterial, intraarticular o intradérmica.

En un aspecto, las composiciones descritas en el presente documento que se usan para estos tratamientos son activas bajo condiciones ácidas. En un aspecto, las composiciones descritas en el presente documento se administran por vía oral en formulaciones (p. ej., comprimidos, píldoras, geles, cápsulas, hidrogeles, pulverizaciones, polvos, aerosoles) que pasan a través de las regiones ácidas del estómago y descargan la enzima solamente en el entorno relativamente alcalino del yeyuno. En un aspecto, una hidrolasa descrita en este documento se formula con un vehículo tal como lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, derivados de celulosa o gelatina o cualquier otro excipiente. También se puede añadir un lubricante tal como estearato de magnesio, estearato de calcio o cera de polietilenglicol. Una disolución de azúcar concentrada, que puede contener aditivos tales como talco, dióxido de titanio, gelatina o goma arábiga, puede añadirse como recubrimiento. Se pueden emplear cápsulas de gelatina

blanda o dura para encapsular una hidrolasa como una preparación líquida o como una preparación sólida. Véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 5.691.181; 5.858.755.

Detergentes

Se describen métodos y composiciones (enzimas, p. ej., lipasas, saturasas, palmitasas y/o estearatasas descritas en este documento) que se pueden usar para elaborar y usar detergentes. Una hidrolasa descrita en este documento puede añadirse, p. ej., para mezclarse con cualquier composición detergente conocida, sólida o líquida, cambiando o no la composición de la composición detergente. Por ejemplo, una hidrolasa descrita en este documento puede añadirse a cualquier jabón, p. ej., sulfato alifáticos tales como alquilsulfatos o alquenilsulfatos de cadena lineal o ramificada, sulfatos de amida, alquil o alquenil étersulfatos que tienen un grupo alquilo o alquenilo de cadena lineal o ramificada al que se le añaden uno o más de óxido de alquilo, óxido de etileno, óxido de propileno y óxido de butileno, sulfonatos alifáticos tales como alquilsulfonatos, amidasulfonatos, dialquilsulfosuccinatos, sulfonatos de alfa-olefinas, de olefinas de tipo vinilideno y olefinas internas, sulfonatos aromáticos tales como alquilbencenosulfonatos de cadena lineal o ramificada, alquil o alquenil éter carbonatos o amidas que tienen un grupo alquilo o alquenilo de cadena lineal o ramificada al que se le añaden uno o más de óxido de etileno, óxido de propileno y óxido de butileno, o amidas, sales o ésteres de ácidos alfa-sulfo-grasos, tensioactivos de tipo aminoácidos, tensioactivos de fosfato tales como fosfatos ácidos de alquilo o alquenilo, y alquilo o alquenilfosfatos, tensioactivos anfóteros de tipo sulfónicos, tensioactivos anfóteros de tipo betaina, alquil o alqueniléteres o alcoholes que tienen un grupo alquilo o alquenilo de cadena lineal o ramificada al que se le añaden uno o más de óxido de etileno, óxido de propileno y óxido de butileno, polioxi- etilenalquifeniléteres que tienen un grupo alquilo de cadena lineal o ramificada al que se le añaden uno o más de óxido de etileno, óxido de propileno y óxido de butileno, alcanolamidas de ácidos grasos superiores o sus aductos de óxido de alquilenilo, ésteres de ácido graso de sacarosa, glicerol monoésteres de ácido graso, óxidos de alquil o alquenilamina, tensioactivos de tipo sal de tetraalquilamonio o una de sus combinaciones. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 5.827.718.

Se describen composiciones detergentes que comprenden uno o más polipéptidos (hidrolasas) descritos en el presente documento. Se pueden usar las formas activas de superficie y/o no activas de superficie. En un aspecto, la cantidad de formas activas de superficie y/o no activas de superficie de la hidrolasa total, puede estar comprendida entre aproximadamente 0,0001% y aproximadamente 1,0%, o entre aproximadamente 0,0002% y aproximadamente 0,5% en peso de la composición detergente. En un aspecto, la composición detergente, la hidrolasa activa de superficie oscila entre aproximadamente 5% y aproximadamente 67% y la cantidad de hidrolasa no activa de superficie oscila entre aproximadamente 33% y aproximadamente 95% de la actividad de hidrolasa total en la mezcla enzimática. En un aspecto, el pH óptimo de la mezcla enzimática total oscila entre aproximadamente 5 y aproximadamente 10,5.

En un aspecto, las composiciones detergentes descritas en este documento incluyen las hidrolasas alcalinas descritas en el presente documento, que funcionan a valores de pH alcalinos, ya que el pH de una disolución de lavado puede estar en un intervalo de pH alcalino bajo condiciones de lavado comunes. Véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 5.454.971.

Los polipéptidos descritos en este documento (enzimas descritas en este documento) se pueden usar en cualquier composición detergente conocida en la técnica, véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 5.069.810; 6.322.595; 6.313.081. Por ejemplo, en un aspecto, se describe una composición detergente para lavar la ropa. Puede comprender 0,8 ppm a 80 ppm de una lipasa descrita en la presente memoria.

Se puede usar cualquier método para elaborar y usar composiciones detergentes con las enzimas descritas en este documento, véanse, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 6.413.928; 6.399.561; 6.365.561; 6.380.147.

Las composiciones detergentes pueden consistir en una composición acuosa de una y dos partes, una composición líquida no acuosa, un sólido fundido, una forma granular, una forma particulada, un comprimido, una forma en gel, un polvo, un gel, un hidrogel, un liposoma, un aerosol, una pasta y/o una forma de suspensión. Las hidrolasas descritas en este documento también se pueden utilizar como producto aditivo de detergente en forma líquida o sólida. Dichos productos aditivos tienen como fin suplementar o mejorar el rendimiento de las composiciones detergentes convencionales y pueden añadirse en cualquier etapa del proceso de limpieza.

Se describen métodos capaces de eliminar suciedad de alimento importante, películas de residuo de alimento y otras composiciones de alimentos menores, usando estas composiciones detergentes. Las hidrolasas que se describen en este documento pueden facilitar la remoción de manchas mediante hidrólisis catalítica de lípidos, grasas o aceites. Las hidrolasas que se describen en este documento se pueden usar en detergentes lavavajilla y en detergentes de lavandería textil.

El contenido de enzima activa real depende del método de fabricación de una composición detergente y no es crítico, suponiendo que la composición detergente tiene la actividad enzimática deseada. En un aspecto, la cantidad de hidrolasas presentes en la composición final oscila entre aproximadamente 0,001 mg y 0,5 mg por gramo de la composición detergente. La enzima particular elegida para uso en el proceso y en los productos descritos en este documento tras las condiciones de utilidad final, incluida la forma de producto física, el pH de uso, la temperatura de

uso y los tipos de suciedades que se degradarán o alterarán. La enzima puede seleccionarse para proporcionar actividad y estabilidad óptimas para cualquier conjunto determinado de condiciones de utilidad. En un aspecto, las hidrolasas que se describen en este documento son activas en los intervalos de pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 12 y en el intervalo de temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 95°C. Los detergentes descritos en este documento pueden comprender tensioactivos catiónicos, semi-polares no iónicos o zwitteriónicos; o mezclas de éstos.

Las enzimas descritas pueden formularse en detergentes en polvo y líquidos que tengan un pH entre 4,0 y 12,0 a niveles de aproximadamente 0,01 y aproximadamente 5% (alternativamente 0,1% y 0,5%) en peso. Estas composiciones detergentes pueden también incluir otras enzimas tales como proteasas, celulasas, lipasas o endoglucosidasas, endo-beta-1,4-glucanasas, beta-glucanasas, endo-beta-1,3(4)-glucanasas, cutinasas, peroxidasas, laccasas, amilasas, glucoamilasas, pectinasas, reductasas, oxidasas, fenoloxidasas, ligninasas, pullulanasa, arabinasas, hemicelulasas, mannanasas, xiloglucanasas, xilanasas, pectina acetil esterasas, ramnogalacturonan acetil esterasas, poligalacturonasas, ramnogalacturonasas, galactanasas, pectina liasas, pectina metilesterasas, celobiohidrolasas y/o transglutaminasas. Estas composiciones detergentes pueden también incluir mejorados y estabilizantes.

La adición de las hidrolasas descritas en este documento a composiciones de limpieza convencionales no crea ninguna limitación especial. En otros términos, cualquier temperatura y pH adecuado para el detergente es también adecuado para las composiciones descritas en este documento siempre y cuando la enzima está activa o tolerante al pH y/o la temperatura que se tenga como fin. A su vez, las hidrolasas descritas en este documento se pueden usar en una composición de limpieza sin detergentes, nuevamente o bien solas o en combinación con mejoradores o estabilizantes.

Se describen composiciones de limpieza que incluyen composiciones detergentes para limpiar superficies duras, composiciones detergentes para limpiar telas, composiciones lavavajillas, composiciones para limpieza bucal, composiciones para limpieza de prótesis dentales y disoluciones de limpieza para lentes de contacto.

Se describen métodos para lavar un objeto, que comprenden poner el contacto el objeto con un polipéptido descrito en este documento bajo condiciones suficientes para lavado. Una hidrolasa descrita en este documento puede incluirse como aditivo de detergente. La composición detergente descrita en este documento puede, por ejemplo, formularse como una composición detergente para lavandería manual o en lavarropas que comprende un polipéptido descrito en este documento.

Un aditivo de lavandería adecuado para pre-tratamiento de telas manchadas puede comprender un polipéptido descrito en este documento. Una composición suavizante de tela puede comprender una hidrolasa descrita en este documento.

Alternativamente, una hidrolasa descrita en este documento puede formularse como una composición detergente para uso en operaciones de limpieza de superficies duras hogareñas en general. En aspectos alternativos, los aditivos de detergente y las composiciones detergentes que se describen en este documento pueden comprender una o más de otras enzimas tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, otra proteasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mannanasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasas, una oxidasas, p. ej., una lactasa y/o una peroxidasa (véase también la descripción expuesta arriba). Las propiedades de la enzima o enzimas que se describen en este documento se seleccionan para ser compatibles con el detergente seleccionado (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.) y la enzima(s) está presente en cantidades eficaces. En un aspecto, las enzimas descritas en este documento se usan para eliminar materiales con olor desagradable de las telas. Diversas composiciones detergentes y métodos para elaborarlas se describen, p. ej., en las patentes de Estados Unidos núm. 6.333.301; 6.329.333; 6.326.341; 6.297.038; 6.309.871; 6.204.232; 6.197.070; 5.856.164.

Cuando se formulan como composiciones adecuadas para uso en el método de lavado en un lavarropas, las hidrolasas descritas en este documento pueden comprender tanto un tensioactivo como un compuesto mejorador. Pueden además comprender uno o más componentes detergentes, p. ej., compuestos poliméricos orgánicos, agentes blanqueadores, enzimas adicionales, supresores de agua jabonosa, dispersantes de jabón de cal, agentes de suspensión de suciedad y anti-redeposición e inhibidores de corrosión.

Las composiciones para lavar la ropa descritas en este documento pueden también comprender agentes suavizantes, como componentes detergentes adicionales. Las composiciones que contienen las hidrolasas descritas en este documento pueden proporcionar limpieza de la tela, remoción de manchas, mantenimiento de blancura, suavizado, aspecto de color, inhibición de transferencia de tinte y desinfección cuando se formulan como composiciones detergentes para lavar la ropa.

La densidad de las composiciones detergentes para lavar la ropa descritas en este documento oscila entre aproximadamente 200 y 1500 g/litro o aproximadamente 400 y 1200 g/litro, o aproximadamente 500 y 950 g/litro, o 600 y 800 g/litro de la composición; esto se puede medir a aproximadamente 20°C.

La forma “compacta” de las composiciones detergentes para lavar la ropa descritas en este documento se refleja de forma óptica por densidad y, en términos de composición, por la cantidad de sal de carga inorgánica. Las sales de carga inorgánicas son ingredientes convencionales de las composiciones detergentes en forma de polvo. En las composiciones detergentes convencionales, las sales de carga están presentes en cantidades sustanciales, típicamente 17% a 35% en peso de la composición total. En un aspecto de las composiciones compactas, la sal de carga está presente en cantidades que no exceden 15% de la composición total, o que no exceden 10%, o que no exceden 5% en peso de la composición. Las sales de carga inorgánicas se pueden seleccionar entre sales alcalinas y de metales alcalino-térreos de sulfatos y cloruros, p. ej., sulfato de sodio.

Las composiciones detergentes líquidas descritas en el presente documento también pueden ser en “forma concentrada”. En un aspecto, las composiciones detergentes líquidas pueden contener una cantidad inferior de agua, en comparación con los detergentes líquidos convencionales. En aspectos alternativos, el contenido de agua del detergente líquido concentrado es inferior a 40%, o inferior a 30%, o inferior a 20% en peso de la composición detergente. Los compuestos detergentes descritos en este documento pueden comprender formulaciones descritas en el documento WO97/01629.

Las hidrolasas descritas en este documento pueden ser útiles para formular diversas composiciones de limpieza. Una serie de compuestos conocidos son tensioactivos adecuados, incluidos detergentes no iónicos, aniónicos, catiónicos o zwitteriónicos, p. ej., como se describe en las patentes de Estados Unidos núm. 4.404.128; 4.261.868; 5.204.015. A su vez, las enzimas descritas en este documento se pueden usar, por ejemplo, en aplicaciones de jabón líquido o en barra, formulaciones para cuidado de vajilla, disoluciones o productos de limpieza de lentes de contacto, o hidrólisis de péptidos, tratamiento de desechos, aplicaciones textiles, como enzimas de escisión de fusión en la producción de proteínas y similares. Las hidrolasas descritas en este documento pueden proporcionar un mejor desempeño en una composición detergente, en comparación con otra proteasa detergente, es decir, el grupo de enzimas puede aumentar la limpieza de ciertas manchas sensibles a enzimas tales como de césped o sangre, según lo determinado por una evaluación usual después de un ciclo de lavado estándar. Las hidrolasas descritas en este documento pueden formularse en detergentes en polvo y líquidos conocidos que tienen un pH entre 6,5 y 12,0 a niveles de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5% (por ejemplo, aproximadamente 0,1% a 0,5%) en peso. Estas composiciones de limpieza detergentes pueden también incluir otras enzimas tales como otras esterases, fosfolipasas, proteasas, amilasas, celulasas, lipasas o endoglucosidasas conocidas, como también mejoradores y estabilizantes.

Tratamiento de alimentos y procesamiento de alimentos

Las hidrolasas descritas en este documento se pueden usar para separación de componentes de materiales de células vegetales. Por ejemplo, las hidrolasas descritas en este documento se pueden utilizar en la separación en componentes de material rico en proteínas (p. ej., células vegetales), p. ej., sacarosa de remolacha o almidón o azúcares de patata, pulpa o fracciones de hollejo. En un aspecto, las hidrolasas descritas en el presente documento se pueden utilizar para separar granos ricos en proteínas o granos ricos en aceite de proteínas y aceites valiosos y fracciones de hollejo. El proceso de separación se puede llevar a cabo con el uso de métodos conocidos en la técnica.

Las hidrolasas descritas en este documento se pueden usar en la preparación de jugos de frutas o verduras, jarabes, extractos y similares para aumentar el rendimiento. Las hidrolasas descritas en este documento se pueden usar en el tratamiento enzimático (p. ej., hidrólisis de proteínas) de diversos materiales derivados de pared celular vegetal o materiales de desecho, p. ej., de la producción de vino o jugo, o residuos agrícolas tales como hollejos vegetales, hollejos de frijoles, pulpa de remolacha, pulpa de oliva, pulpa de patata y similares. Las hidrolasas descritas en este documento se pueden emplear para modificar la consistencia y el aspecto de las frutas o verduras procesadas. Las hidrolasas descritas en este documento se pueden utilizar para tratar material vegetal a fin de facilitar el procesamiento del material vegetal, incluidos alimentos, facilitar la purificación o extracción de componentes vegetales. Las hidrolasas descritas en este documento se pueden usar para mejorar el valor alimentario, reducir la capacidad de unión a agua, mejorar la degradabilidad en plantas de aguas residuales y/o mejorar la conversión de material de plantas para ensilaje, y similares.

Pienso animal y aditivos de alimentos o pienso

En determinadas realizaciones, se dan a conocer en este documento métodos para tratar pienso para animales y alimentos, o aditivos para pienso y alimentos, usando hidrolasas, incluidos animales como mamíferos (p. ej., seres humanos), aves, peces y similares. Se describen en este documento piensos animales, alimentos, suplementos de pienso y alimento, y aditivos que comprenden las hidrolasas descritas en este documento.

En determinadas realizaciones, se describen en este documento hidrolasas para uso en la modificación de alimento o pienso animal, p. ej., para procesar el alimento o el pienso o bien *in vitro* (modificando los componentes del pienso o alimento) o *in vivo*. En otro aspecto, la hidrolasa descrita en este documento se puede suplementar expresando las enzimas directamente en los cultivos de pienso transgénicos (como, p. ej., plantas, semillas transgénicas y similares), tales como maíz, frijoles de soja, colza, lupines y similares. En un aspecto, las plantas transgénicas descritas en este documento, partes de plantas y células de plantas comprenden una secuencia de ácido nucleico

que codifica un polipéptido descrito en este documento. En un aspecto, el ácido nucleico se expresa de modo tal que la hidrolasa descrita en este documento se produce en cantidades recuperables. La hidrolasa se puede recuperar de cualquier planta o parte de planta. Alternativamente, la planta o parte de planta que contiene el polipéptido recombinante se puede usar como tal para mejorar la calidad del alimento o pienso, p. ej., mejorar el valor nutricional, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

Interesterificación

En un aspecto, los métodos y composiciones se pueden usar para modificar las propiedades de las mezclas de triacilglicéridos y, en un aspecto, su consistencia. En un aspecto, se puede utilizar una enzima en presencia de un catalizador tal como metal de sodio o metóxido de sodio para promover la migración de acilo entre las moléculas de glicérido de modo tal que el producto consista en mezclas de glicéridos en las que los residuos acilo de ácido graso están distribuidos aleatoriamente entre las moléculas de glicérido.

En un aspecto, las enzimas se pueden utilizar para producir productos de interesterificación bajo condiciones de reacción en las que la hidrólisis de grasa se modifica para que la interesterificación catalizada por lipasa se convierta en la reacción dominante. Estas condiciones pueden incluir, por ejemplo, restringir la cantidad de agua en el sistema.

En un aspecto, las enzimas se pueden emplear para catalizar reacciones de interesterificación usando mezclas de triacilglicéridos y ácidos grasos libres, como se describe, p. ej., en el documento EP 0 093 602 B2. En estos casos, el ácido graso libre puede intercambiarse con los grupos acilo de los triacilglicéridos para producir nuevos triacilglicéridos enriquecidos en el ácido graso añadido. En un aspecto, se puede utilizar lipasas específicas de 1,3 para confinar la reacción a las posiciones 1 y 3 de los glicéridos, lo que permite obtener una mezcla de triacilglicéridos no obtenible por interesterificación química o reacción con una lipasa no específica. En un aspecto, las lipasas no específicas se usan para lograr resultados similares a la interesterificación química.

La posibilidad de producir nuevas mezclas de triacilglicérido usando lipasas específicas de la posición es útil para la industria de aceites y grasas, ya que algunas de estas mezclas tienen propiedades valiosas. Un ejemplo es la interesterificación catalizada por lipasa específica de 1,3 de 1,3-dipalmitoil-2-monoleína (POP), que es el triacilglicérido principal de la fracción media del aceite de palma, con ácido esteárico o tristearina para dar productos enriquecidos en las valiosas 1-palmitoil-3-stearoil-2-monoleína (POST) y 1,3-distearoil-2-monoleína (StOSt). POST y StOSt son los componentes importantes de la manteca de cacao. Por lo tanto, un aspecto descrito proporciona una reacción de interesterificación para producir equivalentes de manteca de cacao de materiales de partida económicos.

En un aspecto, se describen métodos de producción de un reemplazante de grasa dura, usando las lipasas específicas de 1,3 descritas en este documento. En un aspecto, un reemplazante de grasa dura comprende una mezcla de la fracción media de palma y StOSt, POST o StOSt/POST de por lo menos 85% de pureza.

La invención se describirá en más detalle con referencia a los siguientes ejemplos; no obstante, se ha de entender que la invención no está limitada a dichos ejemplos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Ensayos ilustrativos de lipasa-saturasa

El siguiente ejemplo describe ensayos ilustrativos para actividad de una hidrolasa, p. ej., una lipasa, una saturasa, una palmitasa y/o una estearatasa. Dichos ensayos incluyen el uso de compuestos indicadores de pH para detectar la escisión de ácidos grasos de triacilglicéridos, métodos espectrofotométricos, HPLC, GC, MS, TLC y otros. Jaeger (1994) FEMS Microbiol. Rev. 15:29-63; Ader (1997) Methods Enzymol. 286:351-386; Vorderwiihlbecke (1992) Enzyme Microb. Technol. 14:631-639; Renard (1987) Lipids 22: 539- 541.

Estudio de actividad de lipasa/esterasa

Se recogen colonias con palillos estériles y se usan para inocular individualmente cada uno de los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos. Los pocillos contenían 250 µg/ml de medio LB con 100 µg /ml de ampicilina, 80 µg/ml de metilicina y 10% v/v de glicerol (LB Amp/Meth, glicerol). Las células se desarrollaron durante la noche a 37°C sin agitación. Cada pocillo contenía entonces un cultivo stock de células de *E. coli*, cada una de las cuales contenía pBLUESCRIPT™ con un único inserto de DNA.

Las placas de 96 pocillos se usaron para inocular múltiples veces una sola placa (la "placa condensada") que contenía en cada pocillo 200 µl de LB Amp/Meth, glicerol. Esta etapa se llevó a cabo usando la Herramienta de Replicación de Alta Densidad (High Density Replicating Tool o HDRT) de BIOMEK™ (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA) con 1% blanqueador, agua, isopropanol, ciclo de esterilización con secado al aire entre cada inoculación. Cada pocillo de la placa condensada contuvo por lo tanto 10 a 12 clones pBLUESCRIPT™ distintos de cada una de las placas de genotecas fuente. La placa condensada se desarrolló durante 16 horas a 37° C. y luego se usó para inocular dos placas derivadas de microtitulación de 96 pocillos (Polyfiltronics, Inc., Rockland MA) que

contenían en cada pocillo 250 µl de LB Amp/Meth (sin glicerol). La placa condensada original se dispuso en almacenamiento a -80°C. Las dos placas derivadas condensadas se incubaron a 37°C durante 18 horas.

La 'disolución stock de sustrato 600 µM de esterasa de cadena corta se preparó de la siguiente manera:

5 Se disolvieron 25 mg de cada uno de los siguientes compuestos en el volumen apropiado de DMSO para producir una disolución 25,2 mM. Los compuestos utilizados fueron 4-metilumbeliferilpropionato, 4-metilumbeliferilbutirato y 4-metilumbeliferilheptanoato. Se añadieron 250 microlitros de cada disolución de DMSO a aproximadamente 9 ml de 50 mM, pH 7,5 tampón HEPES que contenía 0,6% de Triton X-100 y 0,6 mg por ml de dodecil maltósido (Anatrace, Maumee, OH). El volumen se llevó a 10,5 ml con el tampón HEPES antes mencionado para producir una suspensión ligeramente turbia.

10 La 'disolución stock de sustrato 600 µM' de cadena larga se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 25 mg de cada uno de los siguientes compuestos en DMSO hasta 25,2 mM como anteriormente. Los compuestos utilizados fueron 4-metilumbeliferiloleato, 4-metilumbeliferilpalmitato, 4-metilumbeliferiloleato y 4-metilumbeliferilestearato. Se requirió un breve calentamiento en un baño de 70° C para lograr la disolución. Se añadieron 250 microlitros de cada disolución de DMSO al tampón HEPES y se diluyó hasta 10,5 ml como previamente. Los siete derivados de umbeliferilo se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

15 Cincuenta µl de disolución stock de sustrato 600 µM de esterasa de cadena larga o esterasa de cadena corta se añadieron a cada uno de los pocillos de una placa condensada blanca usando BIOMEK™ para producir una concentración final de sustrato de aproximadamente 100 µM. Los valores de fluorescencia se registraron (excitación=326 nm, emisión=450 nm) en un fluorómetro lector de placas inmediatamente después de la adición del sustrato. La placa se incubó a 70°C durante 60 minutos en el caso de los sustratos de cadena larga, y 30 minutos a temperatura ambiente en el caso de los sustratos de cadena corta. Los valores de fluorescencia se registraron nuevamente. Los valores de fluorescencia iniciales y finales se compararon para determinar la presencia o ausencia de un clon activo.

25 Para aislar el clon individual que llevaba la actividad, las placas Source GenBank se descongelaron y los pocillos individuales se utilizaron para inocular individualmente una nueva placa que contenía LB Amp/Meth. Como anteriormente, la placa se incubó a 37°C para desarrollar las células, se añadieron 50 µl de disolución stock de sustrato 600 µM usando BIOMEK™ y se determinó la fluorescencia. Una vez identificado el pocillo activo de la placa fuente, se rayaron las células de este pocillo activo en agar con LB/Amp/Meth y se desarrollaron durante la noche a 37° C para obtener colonias individuales. Se recogieron ocho colonias individuales con un palillo estéril y se usaron para inocular individualmente los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Los pocillos contenían 250 µl de LB Amp/Meth. Las células se desarrollaron durante una noche a 37°C sin agitación. Se extrajo una alícuota de 200 µl de cada pocillo y se ensayó con los sustratos de cadena larga o corta apropiados como previamente. Se identificó el clon más activo y los restantes 50 µl de cultivo se usaron para rayar una placa de agar con LB/Amp/Meth. Se recogieron ocho colonias individuales, se desarrollaron y se ensayaron como anteriormente. El clon más activo se usó para inocular 3 ml de cultivos de LB/Amp/Meth, que se desarrollaron durante la noche. El DNA plásmido se aisló de los cultivos y se utilizó para secuenciación.

Ejemplo 2: Protocolos ilustrativos para determinación por LCMS del perfil de ácido graso liberado resultante de la hidrólisis enzimática de aceite vegetal

40 El siguiente ejemplo describe métodos (protocolos) ilustrativos para llevar a cabo la hidrólisis enzimática de aceite vegetal, tal como aceite de soja (utilizado en este ejemplo), (incluida la preparación enzimática) usando, por ejemplo, enzimas. Este ejemplo también describe métodos (protocolos) ilustrativos para detectar y cuantificar los ácidos grasos liberados del aceite. El método se describe usando la SEC ID NÚM:2 de la lipasa, pero es aplicable a otras enzimas, p. ej., las enzimas ilustrativas que tienen secuencias expuestas en la SEC ID NÚM:2 y que tienen una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más, o todas las modificaciones de residuos de aminoácidos descritas en la Tabla 3, Tabla 4, Tabla 9, Tabla 10, Tabla 11, Tabla 16 o Tabla 23.

Expresión de proteínas en placas de 96 pocillos profundos:

1. Se desarrollan clones de lipasa de *E. coli* durante una noche a 30°C en 1 ml de medio TB que contiene carbenicilina (100 µg/ml) en placas de 96 pocillos profundos. Se registra la ubicación e identidad de los clones.
- 50 2. Se inoculan nuevas placas de 96 pocillos profundos que contienen medio TB (1 ml; 100 µg/ml carbenicilina) con los cultivos líquidos (10 µl/pocillo).
3. Se incuba el cultivo durante una noche a 30°C mientras se agita a 200 rpm.
4. Se induce la expresión de proteína por transferencia de 500 µl de cada cultivo durante la noche en una placa de 96 pocillos nueva que contiene medio TB (500 µl/pocillo; 100 µg/ml carbenicilina) y tetraciclina anhidra (200 ng/ml).
5. Se incuba a 30°C durante 2 horas con agitación a 200 rpm.

6. Se cosechan las células centrifugando cada placa durante 10 minutos a 3000 x g. Se elimina el sobrenadante. Los sedimentos celulares pueden utilizarse inmediatamente para ensayos de aceite o conservarse a -20°C para uso posterior.

Reacción de hidrólisis enzimática:

- 5 1. Se añaden 100 µl de B-PER™ (Pierce Chemical, Rockford, IL) a cada sedimento celular. Si los sedimentos se conservan a -20°C, se deja descongelar durante 10 min a temperatura ambiente antes de la adición de B-PER™.
2. Se añaden 400 µl de aceite de soja a cada pocillo de una placa de 96 pocillos profundos.
3. Se añaden varias perlas (vidrio 710-1180 µm) por pocillo. Se sellan las placas con CAPMATS™ (Whatman, Florham Park, NJ).
- 10 4. Las células se lisan y se genera una emulsión aceite/enzima/tampón usando un molidor mezclador (Retsch Inc., Newtown, PA). Se coloca un par de placas selladas en el molidor mezclador y se agita durante 30 segundos a una frecuencia de 30 ciclos/segundo.
5. Se reemplazan los sellos CAPMATS™ por un sello permeable al gas.
6. Se incuban las placas durante 2 horas a 37°C mientras se agita a 200 rpm.

15 Extracción de ácido graso:

1. Se añade 1 ml de disolvente de extracción (CHCl₃:MeOH:4N HCl (2:1:0,075)) a cada pocillo de la placa de 96 pocillos profundos.
2. Se mezcla con pipeta varias veces hasta que luce homogéneo.
3. Se cubren las placas con un sello de papel de aluminio.
- 20 4. Se centrifuga durante 5 minutos a 3000 x g. Se cortan los sellos usando una navaja.
5. Se inserta la punta de la pipeta a través de la fase superior y se transfieren 5 µl de fase inferior a una nueva placa de 96 pocillos profundos que contiene 995 µl/pocillo de MeOH (es decir, una dilución 1/200 de la fase inferior). Se debe tomar la precaución de no contaminar con la fase superior. Se almacenan mezclas de extracción por separado a 4°C.
- 25 6. Se transfieren 150 µl de dilución 1/200 de todas las muestras a una placa de poliestireno de 96 pocillos.
7. Para prevenir la evaporación, las placas se sellan con calor. Se debe asegurar que el sello no se ponga en contacto con MeOH, ya que esto prevendría la correcta adhesión.
8. Se analizan las muestras por LC/MS.

Análisis LC/MS:

- 30 1. Las muestras dispuestas en un formato de placas de 96 pocillos se inyectan vía un automuestreador HTCPAL™ (LEAP Technologies, Carrboro, NC) en una mezcla isocrática de H₂O/MeCN (10/90, v/v) y ácido fórmico al 0,1%, suministrado por bombas LC-10 AD VP™ (Shimadzu, Kyoto, Japón) a 1,2 ml/min.
2. Se logra la separación con una columna SYNERGI MAX-RP™ (Phenomenex, Sutter Creek CA) de 150 x 2,00 mm y detección. La cuantificación se completa con un espectrómetro de masas de triple cuadrante API 4000™ (Applied Biosystems, Foster, CA) usando ionización por electropulverización (ESI) y monitoreo de múltiples iones para las masas 277, 279, 281, 255, 283 en el modo de iones negativos.
- 35 3. Se obtiene el control de la instrumentación y la generación de datos con el software ANALYST 1.3™ (Applied Biosystems, Foster, CA).
4. Se calibra la LC/MS para cada ácido graso en el intervalo de 0,5 a 50 µg usando muestras estándar (Sigma).
- 40 Este intervalo ajusta de modo óptimo una curva estándar de regresión cuadrática que se usa para calcular la cantidad de cada ácido graso liberada en las muestras enzimáticas.

Ejemplo 3: Protocolos ilustrativos para detección HTP de genotecas de evolución de lipasa para aumento de selectividad de hidrólisis de ésteres de palmitato o estearato frente a ésteres de oleato

El siguiente ejemplo describe métodos (protocolos) para detección de alto rendimiento (HTP) de “genotecas de evolución” de lipasa para aumento de selectividad de hidrólisis de ésteres de palmitato o estearato frente a ésteres de oleato. Este método (protocolo/detección HTP) ilustrativo describe la detección de genotecas de evolución de lipasa derivadas de la SEC ID NÚM:2, pero es aplicable a otras enzimas, p. ej., las enzimas ilustrativas que tienen las secuencias expuestas en la SEC ID NÚM:2 y que tienen una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce o más, o todas las modificaciones de residuos de aminoácidos descritas en la Tabla 3 o en la Tabla 4; y este método (protocolo) ilustrativo es aplicable a otros tipos de genotecas.

Estos estudios de detección HTP ilustrativos se efectúan utilizando dos sustratos fluorogénicos: ésteres de palmitato de metilumbeliferilo palmitato o esterato frente a éster metilumbeliferil oleato.

Flujo de estudio de detección HTP:

1. Se disponen ordenaciones de clones de genotecas en placas de microtitulación y se ensayan en un estudio de detección de HTP primario.
2. Los clones identificados por tener selectividad mejorada se designan como hits primarios.
3. Los hits primarios se vuelven a ordenar en placas de microtitulación y se ensayan en un segundo estudio de detección HTP.
4. Los clones confirmados por tener selectividad mejorada se designan como hits secundarios..
5. Los hits secundarios se secuencian para identificar mutaciones de secuencia presentes y se ensayan en aceite (véase protocolo aparte).

Protocolo de ensayo HTP

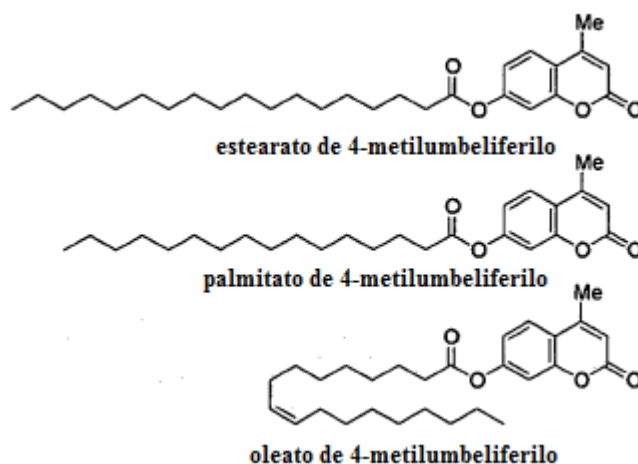
1. Se etiquetan con códigos de barra placas de ensayo de 384 pocillos; se etiquetan con códigos de barra placas de ensayo de 384 pocillos y se rellenan con 30 µl/pocillo de medio LB (100 ng/ml carbenicilina).
2. Se seleccionan cuidadosamente clones en las placas de desarrollo y se desarrollan durante una noche a 30°C en una incubadora humidificada.
3. Se induce expresión de lipasa por adición de 30 µl/pocillo de medio LB (100 µg/ml carbenicilina) que contiene 4 µg/ml tetraciclina anhidra y se incuba durante 2 horas a 30°C,
4. Se lisan las células añadiendo 20 µl/pocillo B-PER™ (Pierce Chemical, Rockford, IL); se mantiene a temperatura ambiente hasta disponer en el robot.
5. Se efectúa el ensayo de actividad de lipasa en el robot (ver a continuación).
6. Los clones identificados por tener selectividad mejorada para ésteres de palmitato o esterato MeUMB frente a éster de oleato MeUMB se designan como hits.
7. Se seleccionan cuidadosamente clones hit en placas de 96 pocillos profundos que contienen medio LB (1 ml/pocillo; 100 ng/ml carbenicilina) y se desarrollan durante la noche a 30°C.
8. Para hits primarios, se re-ordenan en placas de 384 pocillos y se repiten las etapas 1-8 en el estudio de detección secundario; se designan clones hit como hits secundarios.
9. Para hits secundarios, después del paso 8 se envía para secuenciación.

Protocolo de ejemplo de estudio de detección HTP automático

1. Damasco: se mezcla y transfiere una alícuota (10 µl) de células lisadas de “Placa de desarrollo” (véanse las Etapas 1-4 anteriores) a cada una de dos placas de ensayo separadas (1 y 2).
2. MULTIDROP™ (Thermo Electron Corporation, Milford, MA): se añaden 70 µl de sustrato 1 (UMB-16:0) a la placa de ensayo 1; se añaden 70 µl de sustrato 2 (UMB-18:1) a la placa de ensayo 2
3. Se incuban las placas de ensayo durante 20 minutos a 37°C.
4. Se leen en un fluorímetro: Excitación 360 nm y Emisión 465nm

Los clones hit secundarios que se determina tienen secuencias únicas se disponen en ordenaciones y se desarrollan en placas de 96 pocillos, y se ensayan en aceite de soja (ver a continuación).

Estructuras de sustratos fluorogénicos utilizadas en estudios de detección HTP



Ejemplo 4: Evolución ilustrativa para hidrólisis mejorada de ésteres de palmitato o estearato usando tecnología GSSMSM

El siguiente ejemplo describe y resume los resultados de la “evolución enzimática” ilustrativa y los protocolos de estudio que identifican enzimas ilustrativas, p. ej., enzimas que tienen una secuencia expuesta en la SEC ID NÚM:2 pero que también tienen una modificación de residuos expuesta en la Tabla 3 o en la Tabla 4; o enzimas codificadas por un ácido nucleico que tiene una secuencia expuesta en la SEC ID NÚM:1, pero que también tienen una modificación de residuos expuesta en la Tabla 3 o en la Tabla 4. En un aspecto, el ensayo de detección ilustrativo para identificar estas enzimas ilustrativas utilizó aceite de soja como sustrato, y los ácidos grasos liberados (hidrolizados) del aceite de soja se caracterizaron, p. ej., como ácido linolénico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico o ácido esteárico.

El aceite de soja tiene la siguiente distribución de ácido graso: Linolénico = 8%; Linoleico = 53%; Oleico = 23%; Palmítico = 12%; Estearico - 4%. Por lo tanto, si el porcentaje de ácido palmítico liberado (hidrolizado) del aceite de soja por una enzima ilustrativa es mayor que 12%, entonces esa enzima tiene una preferencia para hidrolizar (liberar) ácido palmítico.

Estudio de detección de palmitasa: construcción de una “genoteca de palmitasa”

Se preparó una genoteca de palmitasa de variantes de la SEC ID NÚM:2 mediante tecnología GSSMSM (número de patente 6.171.820). Se introdujeron mutaciones puntuales usando oligonucleótidos degenerados, una posición de aminoácido por vez, de modo que cada codón original se sustituye con cada uno de los 20 aminoácidos naturalmente codificados. Las variantes mutadas se transformaron en el hospedante de *Escherichia coli* TOP 10 (Invitrogen, EE. UU.) para expresión y detección. La genoteca se construyó en un vector de expresión pASK-5, que se modificó a partir del vector pASK-IBA (IBA GmbH, Alemania). Para construir pASK-5, el enlazador de codificación original se reemplazó por nuevos sitios de clonación, específicamente, la secuencia de XbaI a HindIII de pASK-IBA se reemplazó con la siguiente secuencia:

RBS ArgSerHisHisHisHisHisHis
 TCTAGATAACGAGGGCAAACCATGGGAGGATCCAGATCTCATCACCATCACCATCACTAAGCTT (SEC. ID NÚM. 21)
 XbaI NcoI BamHI BclII HindIII

La expresión de las variantes GSSMSM se indujo con anhidrotetraciclina después de lograr densidades óptimas de las células hospedantes.

Las enzimas que tienen secuencias de aminoácidos generadas por tecnología GSSMSM se estudiaron con el protocolo de estudio de detección de alto rendimiento (HTP), p. ej., el protocolo descrito en el Ejemplo 3, que determinó que el ácido graso se hidrolizaba preferencialmente a partir de un aceite de grasa – soja en este ensayo. El objetivo del proyecto de evolución fue mejorar la selectividad del palmitato de la secuencia parental, SEC ID NÚM.:2, en aceite. El ensayo comprendió poner en contacto la enzima modificada con la nueva secuencia con el aceite de soja, que comprende diversos ácidos grasos, incluidos ácido linolénico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico y ácido esteárico (véase % distribución precedentemente mencionado) y medir la cantidad de cada ácido graso hidrolizado por cada enzima modificada. Se identificó una “genoteca” de secuencias que permitió que la enzima hidrolizara preferencialmente un ácido palmítico (o un ácido esteárico, véase a continuación), a partir del aceite de soja (la llamada “Genoteca de palmitato”):

Se efectuaron estudios de detección primarios y secundarios usando un estudio HTP, p. ej., el método descrito en el Ejemplo 3;

La secuenciación de hits secundarios identificó mutaciones de aminoácidos que resultaron en la selectividad mejorada para la hidrólisis de palmitato frente a oleato en el estudio HTP en comparación con, por ejemplo, la secuencia parental, SEC ID NÚM:2;

Para cada variante de codón para una mutación de aminoácido, se seleccionó cuidadosamente un clon y se ordenó en placas de 96 pocillos para ensayo en aceite.

A partir de los ensayos de aceite, se obtuvo la selectividad de las enzimas mutantes para palmitato o estearato, u otros ácidos grasos (Tabla 3);

El hit principal produjo palmitato como 59% de ácidos grasos (FA) liberados frente a 43% para la SEC ID NÚM:2 en el mismo ensayo; esto corresponde a un incremento en el factor de selectividad de 3,6 a 4,9;

Varios clones también demostraron incrementos en la selectividad del estearato.

La Tabla 1 que sigue resume las mutaciones GSSMSM (véase a continuación) seleccionadas para inclusión en la “genoteca de palmitato” para combinarse por tecnología GeneReassemblySM (véase Ejemplo 5). En un ensayo ilustrativo, se identificaron catorce (14) mutaciones de aminoácidos individuales por producir los mayores incrementos en hidrólisis de palmitato en ensayos de aceite (véanse también las Tablas 1, 3 y 4 a continuación). Los residuos están marcados de acuerdo al orden en que ocurrieron en la SEC ID NÚM:2 original (véase Figura 7), entre residuos que producen incrementos significativos en hidrólisis de palmitato o estearato en ensayos de aceite. Se exponen “AA originales” en la SEC ID NÚM:2 y mutaciones beneficiosas (“Aminoácidos nuevos”), es decir, secuencias ilustrativas. En un aspecto, las mutaciones individuales a arginina (R) en posiciones de los residuos 163 y 164 pueden incluirse alternadamente, de forma tal que esta genoteca ilustrativa incluirá clones con las secuencias 163 V-164D (SEC ID NÚM:2), 163R-164D y 163V-164R, pero no con la secuencia 163R-164R.

Tabla 1

Residuo	Aminoácido original	Aminoácidos nuevos
61	D	A, E
72	R	E, K
116	E	A, Q, R, T, V
133	S	A
151	I	G, A
163	V	R
164	D	R

La Figura 6a ilustra los efectos de las mutaciones ilustrativas GSSMSM de palmitasa en hidrólisis de palmitato y estearato en relación con la SEC ID NÚM:2 original. Para cada una de las catorce (14) mutaciones de aminoácidos individuales seleccionadas para inclusión en la genoteca GeneReassemblySM de palmitasa, se grafica el cambio en porcentaje de palmitato y estearato liberado, en relación con la SEC ID NÚM:2 original. Muchas de estas mutaciones produjeron incrementos significativos en la hidrólisis de palmitato, acompañada por pequeños a significativos incrementos en la hidrólisis de estearato. No obstante, varias mutaciones causan ligeras reducciones en la hidrólisis de estearato. Los asteriscos indican mutaciones identificadas por conferir aumento de selectividad de tipo saturasa.

Estudio de detección de estearato: construcción de una “genoteca de estearato (estearatasa)”

Se construyó una genoteca de estearatasa de las variantes de la SEC ID NÚM:2 con tecnología GSSMSM (número de patente 6.171.820). Se introdujeron mutaciones puntuales usando oligonucleótidos degenerados, una posición de aminoácido por vez, de modo que cada codón original pudiera sustituirse con cada uno de los 20 aminoácidos naturalmente codificados. Las variantes mutadas se transformaron en el hospedante de *Escherichia coli* TOPIO (Invitrogen, EE. UU.) para expresión y selección. La genoteca se construyó en el vector de expresión pASK-5 (como se describió anteriormente). La expresión de las variantes GSSMSM se indujo con anhidrotetraciclina después de lograr densidades óptimas de célula hospedante.

Las enzimas que tienen secuencias de aminoácidos generadas por tecnología GSSMSM se detectaron con un protocolo de estudio de detección de alto rendimiento (HTP), p. ej., el protocolo descrito en el Ejemplo 3, que determinó qué ácidos grasos se hidrolizaron preferencialmente a partir de un aceite de grasa – soja en este ensayo. El ensayo comprendió poner en contacto la enzima modificada nueva/de la secuencia con aceite de soja, que comprendió diversos ácidos grasos, incluidos ácido graso linolénico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico y

ácido esteárico (véase % distribución mencionado precedentemente) y medir la cantidad de cada ácido graso hidrolizado por cada enzima modificada. Se identificó una “genoteca” de secuencias que permitió que una enzima hidrolizara preferencialmente un ácido esteárico (o un ácido palmítico, véase más arriba), del aceite de soja (la llamada “Genoteca de estearato”):

- 5 Se efectuaron detecciones primarias y secundarias usando un estudio de detección HTP, p. ej., el método descrito en el Ejemplo 3;

La secuenciación de hits secundarios identificó mutaciones de aminoácidos que resultaron en selectividad mejorada para hidrólisis de estearato frente a oleato en el estudio de detección HTP en comparación con, por ejemplo, la secuencia parental, SEC ID NÚM:2.

- 10 Para cada variante de codón que codifica una mutación de aminoácido, se seleccionó cuidadosamente un clon y se ordenó en placas de 96 pocillos para ensayo en aceite.

Los ensayos en aceite de hits secundarios secuenciados produjeron la selectividad de las enzimas mutantes para palmitato o estearato, u otros ácidos grasos (Tabla 3).

- 15 El hit principal produjo estearato como 22% de FA liberados frente a 9% para la SEC ID NÚM:2 en el mismo ensayo; esto corresponde a un incremento en el factor de selectividad de 2,3 a 5,5;

Varios clones también mostraron incrementos en la selectividad del palmitato

- 20 La siguiente Tabla 2 compila mutaciones GSSMSM (véase arriba) seleccionadas para inclusión en la “genoteca de estearatasa” para combinar por tecnología GeneReassemblySM. En un ensayo ilustrativo, se identificaron veintidós (22) mutaciones de aminoácidos que producen los mayores incrementos en la hidrólisis de estearato en ensayos de aceite (véanse también las Tablas 2, 3 y 4 a continuación). Los residuos están marcados de acuerdo con el orden en que ocurren en la SEC ID NÚM:2 “parental”, entre residuos que producen los incrementos más significativos en hidrólisis de palmitato o estearato en ensayos de aceite. Se exponen el “aminoácido original” en la SEC ID NÚM:2 y mutaciones beneficiosas (“aminoácidos nuevos”), es decir, secuencias ilustrativas. En un aspecto, la mutación individual a alanina (A) en la posición del residuo 223 se incluye en una mutación fija como para que cada clon en esta genoteca ilustrativa contenga esta mutación.
- 25

Tabla 2

Residuo	Aminoácido original	Aminoácidos nuevos
20	I	L
62	V	S
77	G	P
83	V	C
88	D	H
113	Y	G
116	E	G, T
140	H	K
146	K	S
167	I	S
180	L	E
194	E	M
211	A	Q
212	S	Y
215	G	C, V, W
218	A	H, S
223	V	A
225	A	Q, M

La Figura 6b (véase también arriba) ilustra los efectos de doce (12) de las veintidós (22) mutaciones líderes de estearatasa GSSMSM en hidrólisis de palmitato y estearato en relación con la SEC ID NÚM:2 parental. Para cada una de las doce (12) mutaciones de aminoácidos individuales expuestas en la Figura 6b y seleccionadas para inclusión en la genoteca de estearatasa GeneReassemblySM, se grafica el porcentaje de cambio en el palmitato y estearato liberados, en relación con la SEC ID NÚM:2 parental. La mayoría de estas mutaciones produjo incrementos significativos en hidrólisis de estearato, pero reducciones ligeras a significativas en la hidrólisis de palmitato. Los asteriscos indican mutaciones identificadas por conferir mayor selectividad de tipo saturada, es decir, incrementos en selectividad para hidrólisis de palmitato y estearato frente a hidrólisis de ácidos grasos insaturados en el aceite, p. ej., oleato, linoleato y linolenato.

Resumen

La detección de la genoteca "GSSMSM" (ver arriba donde se describe en detalle la tecnología GSSMSM) basada en la SEC ID NÚM:2 parental produjo clones mutantes de aminoácidos individuales con mejoras importantes en la selectividad de palmitato y estearato, y en la selectividad de saturado, es decir, la selectividad para hidrólisis de palmitato y estearato (p. ej., hidrólisis selectiva de palmitato y/o estearato de aceite de soja).

Se descubrieron clones con mejoras importantes en la selectividad de estearato (hidrólisis selectiva de ácido esteárico frente a otros ácidos grasos).

Se descubrieron mutantes GSSMSM con aumento de selectividad de palmitato (hidrólisis selectiva de ácido palmítico frente a otros ácidos grasos) en relación con la enzima de la SEC ID NÚM:2.

La Tabla 3 y la Tabla 4 a continuación describen (compilan en mayor detalle) las secuencias de enzimas hidrolasa ilustrativas, p. ej., las enzimas ilustrativas que tienen una secuencia expuesta en la SEC ID NÚM:2 y que tienen por lo menos uno (uno, varios o todos) los cambios de residuos de aminoácidos descritos en las tablas. La Tabla 3 y la Tabla 4 también compilan los datos de actividad de las enzimas ilustrativas seleccionadas, donde los datos incluyen enzimas ilustrativas particulares correlacionadas con su actividad de hidrolasa positiva, que comprenden catálisis de hidrólisis (liberación de) un ácido graso de palmitato o estearato de aceite de soja, como se identifica con un protocolo de estudio de alto rendimiento (HTP), como se describió anteriormente.

En la Tabla 3 y la Tabla 4, la expresión "Aminoácido original" indica el residuo de aminoácido dirigido (indicado bajo "Residuo de aminoácido") en la enzima de la SEC ID NÚM:2 "parental" ("dirigida" para cambio); y la expresión "Aminoácidos nuevos" indica el residuo de aminoácido recién diseñado (que reemplazó al correspondiente residuo "dirigido" en la "secuencia antigua") en la enzima ilustrativa (nueva) que se da a conocer aquí. El listado de residuos de "aminoácidos nuevos" bajo la columna "estearato" frente a "palmitato" indica cuál de los dos estudios de detección de ácido graso de alto rendimiento (HTP) (es decir, liberación de ácido palmítico en un estudio y liberación de ácido esteárico en el otro estudio, véase Ejemplo 3) se usó para detectar (identificar) una enzima particular con la variación del residuo indicado (secuencia de nueva enzima, residuo de "aminoácido nuevo").

Por ejemplo, en la primera fila de la Tabla 3, en el residuo de aminoácido 7, la tirosina (o "Y") de la enzima "parental" SEC ID NÚM:2 se reemplaza por un residuo de aminoácido arginina (o "R"), y esta nueva enzima (Y7R) tiene actividad que difiere de aquella de la enzima parental (véase la Tabla 3); por ejemplo, "Datos del aceite" resume la preferencia de sustrato (ácido graso) de la nueva enzima (p. ej., la enzima Y7R) listando los ácidos grasos liberados (hidrolizados) generados cuando la enzima se expuso a (se contactó con) aceite de soja (ensayos descritos anteriormente), notando que el aceite de soja de sustrato tiene varios grupos constituyentes de ácido graso hidrolizable posibles, incluidos ácido linoléico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico.

Por ejemplo, en la primera fila, para la enzima Y7R, 8,3% de los ácidos grasos liberados (del aceite de soja sometido a reacción) fueron ácido linoléico, 22,1% de los ácidos liberados fueron ácido linoleico; 19,7% de los ácidos grasos liberados fueron ácido oleico; 41,5% de los ácidos grasos fueron ácido palmítico; 8,4% de los ácidos grasos liberados fueron ácido esteárico (estas cuatro cifras equivalen al 100%).

La columna P + S suma tanto los puntos de datos de P como de S para resumir cuánto de los ácidos grasos totales liberados fueron ácido palmítico y ácido esteárico (41,5% más 8,4% = 49,9% de los ácidos grasos hidrolizados fueron ácido palmítico y ácido esteárico, o "P + S").

Tabla 3

Residuo de aminoácido	Aminoácido original	Hits del estudio HTP		P+S
		Palmitato Aminoácido nuevo	Estearato Aminoácido nuevo	
7	Y	R		49,9%
8	G	E, A218R		

Residuo de aminoácido	Aminoácido original	Hits del estudio HTP		P+S
		Palmitato Aminoácido nuevo	Estearato Aminoácido nuevo	
12	R		F K L M	47,8% 54,2% 45,4% 43,3%
16	D	M		43,2%
18	P		G	41,8%
20	I		L V	50,3% 44,6%
22	T		M, G215V	52,1%
27	G	Q S		57,2% 43,6%
29	A		G	51,5%
32	G		E D, L180E	escala 44,6%
34	L		E V	45,8% escala
36	D		A G	51,0% 50,9%
40	V		P	32,2%
42	V		I L	47,2% 47,8%
43	L	V		51,5%
45	G	A		44,4%
48	A	T	G V V	45,4% 70,1% 55,7% 33,60%
54	S	H		55,6%
61	D	A E S		60,5% 55,0% 49,8%

Residuo de aminoácido	Aminoácido original	Hits del estudio HTP		P+S
		Palmitato Aminoácido nuevo	Estearato Aminoácido nuevo	
62	V	E A G M N Q S T	E D L W	53,0% 56,6% 56,5% 51,9% 49,7% 52,4% 55,5% 50,7% 52,5% 50,2%
66	A		N R	54,2% 52,1%
72	R	E K P S T Y		58,3% 61,0% 27,2% 55,3% 55,9% 50,1%
74	F	I L P R		53,8% 54,8% 52,3% 50,5%
77	G	P		38,1%
78	I		D E P	47,1% 37,1% 40,9%
80	G	P		51,9%
82	L		P	37,3%
83	V	C M		47,7% 59,3%
84	D	V		40,2%
87	V		A C D E G P S T H N	49,2% 46,1% 43,9% 46,6% 53,3% 45,2% 42,8% 52,9% 50,3%

		Hits del estudio HTP		
Residuo de aminoácido	Aminoácido original	Palmitato Aminoácido nuevo	Estearato Aminoácido nuevo	P+S
88	D		E F H L P P Q	44,6% 50,3% 45,9% 49,1% 59,6% 48,9% 47,1%
89	R	S		54,5%
92	A		D E R S T V	47,3% 59,3% 42,6% 48,7% 52,1% 57,5%
93	V		M	48,2%
96	A	C I S	C I S	51,4% escala 46,8%
98	G	A L		45,0% escala
101	K		A	49,8%
103	I		L	36,8%
107	W		P A C G H R S L P, E217Q V V, E217Q	46,20% 39,5% 39,4% 47,5% 42,0% 68,0% 36,8% 64,8% 46,2% 37,8% 44,80%

Residuo de aminoácido	Aminoácido original	Hits del estudio HTP		P+S
		Palmitato Aminoácido nuevo	Estearato Aminoácido nuevo	
108	S	T, A218T	Finalizador A C G K L P Q R V E, E217Q	19,0% 43,0% 26,0% 47,5% 57,8% 44,0% 56,9% 58,6% 54,7% 53,4% 46,50%
109	L		M	49,0%
110	G		L	54,4%
113	Y	F	E G	35,8% 39,8% 36,5%
116	E	A F G H L L P Q Q R, H140R R S S T V R, H140R		66,6% 54,7% 53,8% 57,9% 58,5% 55,1% 58,0% 59,6% 60,5% 60,6% 61,8% 58,6% 59,7% 67,6% 67,8%
117	L	R, I161L		54,1%
120	K	I L F M S	L S	46,7% 60,8% 52,6% 49,9% 53,3%
132	G		D, S212A	56,2%

		Hits del estudio HTP		
Residuo de aminoácido	Aminoácido original	Palmitato Aminoácido nuevo	Estearato Aminoácido nuevo	P+S
133	S		A A G P R T V, L139H	53,2% 55,8% 45,6% 56,0% 51,7% 54,9% 53,2%
134	P		G R	7,2%
135	F		K	51,8%
139	L		H, S133V	53,2%
140	H	R, E116R	K	45,5%
141	A		R T	40,2% 43,3%
142	N		M R S T	46,1% 53,8% 43,2% 64,3%
144	A		T, N142K	33,9%
146	K		S G L A	50,2% 49,4% 51,6% 52,2%
147	I	F F L		56,5% 50,5% 52,2%
150	A		L L	59,7% 53,3%
151	I	A G H P S T		48,6% 53,0% 60,0% 33,7% 52,2% 49,2%
152	N		E G H M R	28,0% 53,0% 46,7% 35,7% 21,1%
155	T	C		51,1%

Residuo de aminoácido	Aminoácido original	Hits del estudio HTP		P+S
		Palmitato Aminoácido nuevo	Estearato Aminoácido nuevo	
157	D	S G T		50,4% 48,7% 54,7%
158	N	A		51,2%
159	L	M		51,5%
160	P	T		52,8%
161	I		L, L117R L	54,1% 51,6%
162	P		K R	escala
163	V		E R T	55,7% 63,9% 49,7%
164	D		A E H K L R S T V W	42,1% escala 39,8% 49,4% escala 61,3% 47,9% 53,0% 42,3% escala
166	Q		G N R	49,9% 41,3% escala
167	I	R S	R S	53,3% 47,3%
170	P		Q A A, S212H	45,6% 52,5% 34,7%
171	V		K	34,1%
172	R	P Q S		51,7% 54,9% 40,2%
178	S		K	
180	L		E H Q F, G32D	54,0% 44,6% escala 44,6%
183	V		I	escala

Residuo de aminoácido	Aminoácido original	Hits del estudio HTP		P+S
		Palmitato Aminoácido nuevo	Estearato Aminoácido nuevo	
193	P			49,4%
194	E		A M Q D, P193S	escala 47,9% escala 49,4%
197	D	K		39,4%
198	E	finalizador		56,1%
200	L		V	55,3%
204	V		L R	45,9% 45,7%
210	A	V		50,2%
211	A		E H K L Q F N P R W Y S I	35,3% 48,1% 39,4% 45,0% 50,3% 32,6% 46,1% 49,2% 55,2% 47,8% 48,9% 50,8% 52,7% 52,7% 49,8% 46,2%
212	S	C R A E G H L P Q R T V W Y	A, G132D H, P170A	49,3% 50,3% 53,2% 36,8% 36,6% 44,3% 46,5% 53,2% 12,2% 41,8% 50,2% 53,7% 38,7% 48,4% 47,1% 34,7%

		Hits del estudio HTP		
Residuo de aminoácido	Aminoácido original	Palmitato Aminoácido nuevo	Estearato Aminoácido nuevo	P+S
213	K	I G T T finalizador		47,9% 57,7% 56,7% 55,5%
214	T	V V P N R Y Y	C G V	51,6% 53,0% 52,2% 54,5% 51,9% 56,9% 55,1% 62,7% 62,7%
215	G	A H S M V P C W finalizador	A I L V, T22M	56,6% 54,1% 29,9% 50,2% 52,1% 47,9% 55,6% 47,3% 60,4% 52,8% 53,9% 52,1%
216	A	T R Y V C S L	T V S	50,9% 41,9% 34,8% 56,9% 59,7% 55,0% 55,6%
217	E	Q R S A G P		36,6% 59,4% 53,5% 46,2% 44,8% 46,2%

Residuo de aminoácido	Aminoácido original	Hits del estudio HTP		P+S
		Palmitato Aminoácido nuevo	Estearato Aminoácido nuevo	
218	A	M H Q R W S T K R, G8E R, 228K	H Q	42,5% 49,1% 47,7% 53,4% 51,9% 51,1% 50,0% 52,4%
223	V		A M R T	48,8% 31,6% 23,4% escala
224	A		F G G I Q Y	49,5% 58,2% 48,4% 41,7% 46,4% 43,7%
225	A		G L M Q T	49,3% 54,3% 49,0% 45,8% 43,2%
226	R		H T	48,3% 41,2%
227	L		R	41,4%

Tabla 3 (continuación)

Ácidos grasos liberados del aceite por la enzima						
Resido de aminoácido	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmítico	Estearico	P+S
7	8,3%	22,1%	19,7%	41,5%	8,4%	49,9%
8						
12	11,5% 5,2% 14,7% 10,3%	13,0% 22,1% 13,9% 12,8%	27,7% 18,5% 26,0% 33,6%	38,5% 47,2% 34,4% 34,0%	9,3% 7,1% 11,0% 9,4%	47,8% 54,2% 45,4% 43,3%
16	7,2%	25,1%	24,6%	36,1%	7,1%	43,2%
18	12,5%	20,0%	25,7%	36,2%	5,6%	41,8%

Ácidos grasos liberados del aceite por la enzima						
Resido de aminoácido	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmítico	Esteárico	P+S
20	8,2%	21,2%	20,3%	38,5%	11,7%	50,3%
	12,2%	23,2%	20,0%	40,1%	4,5%	44,6%
22	8,0%	19,5%	20,4%	47,1%	5,0%	52,1%
27	7,5%	17,6%	17,6%	47,4%	9,8%	57,2%
	9,1%	23,2%	24,0%	35,8%	7,8%	43,6%
29	9,0%	19,9%	19,6%	40,9%	10,7%	51,5%
32	19,8%	29,1%	34,0%	escala	17,1%	escala
	14,6%	12,1%	28,7%	36,6%	7,9%	44,6%
34	5,6%	31,0% ,	17,5%	40,9%	4,9%	45,8%
	21,1%	35,3%	37,1%	escala	6,5%	escala
36	7,1%	22,1%	19,9%	43,8%	7,1%	51,0%
	8,7%	22,9%	17,6%	48,2%	2,7%	50,9%
40	0,0%	51,4%	16,4%	22,4%	9,7%	32,2%
42	14,8%	12,1%	25,8%	34,6%	12,6%	47,2%
43	7,7%	13,9%	30,7%	34,8%	13,0%	47,8%
	8,9%	19,9%	19,7%	44,4%	7,1%	51,5%
45	10,3%	23,8%	21,5%	38,5%	5,9%	44,4%
	5,9%	22,3%	19,1%	49,7%	3,0%	52,7%
48	15,0%	18,0%	21,7%	38,1%	7,2%	45,4%
	4,3%	11,5%	14,2%	61,0%	9,1%	70,1%
	7,6%	17,3%	19,4%	43,8%	12,0%	55,7%
	23,6%	13,4%	29,3%	22,5%	11,1%	33,60%
54	8,1%	19,3%	17,0%	48,4%	7,3%	55,6%
61	5,6%	19,8%	14,1%	53,9%	6,6%	60,5%
	6,4%	20,1%	18,5%	47,3%	7,7%	55,0%
	7,7%	19,9%	22,6%	41,5%	8,3%	49,8%
62	7,6%	18,8%	20,7%	44,6%	8,3%	53,0%
	9,2%	17,6%	16,6%	45,6%	11,0%	56,6%
	6,7%	20,3%	16,5%	47,6%	8,8%	56,5%
	7,7%	20,9%	19,5%	44,9%	6,9%	51,9%
	7,9%	21,7%	20,7%	40,7%	9,0%	49,7%
	8,5%	20,8%	18,4%	42,6%	9,8%	52,4%
	5,4%	26,0%	13,1%	37,0%	18,5%	55,5%
	10,0%	21,9%	17,5%	40,2%	10,5%	50,7%
	6,1%	23,2%	18,2%	47,1%	5,4%	52,5%
	9,9%	21,3%	18,6%	46,7%	3,6%	50,2%
66	7,5%	16,8%	21,5%	48,0%	6,2%	54,2%
	11,4%	18,0%	18,5%	47,2%	4,8%	52,1%

Ácidos grasos liberados del aceite por la enzima						
Resido de aminoácido	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmítico	Esteárico	P+S
72	7,9%	16,5%	17,3%	54,2%	4,1%	58,3%
	4,4%	20,7%	13,9%	52,2%	8,7%	61,0%
	6,8%	44,6%	21,4%	20,2%	7,0%	27,2%
	8,6%	17,3%	18,8%	45,7%	9,6%	55,3%
	7,5%	17,4%	19,3%	45,1%	10,7%	55,9%
	6,7%	23,1%	20,1%	40,2%	9,9%	50,1%
74	7,4%	19,6%	19,3%	45,4%	8,4%	53,8%
	8,0%	19,3%	18,0%	44,8%	10,0%	54,8%
	8,7%	20,5%	18,6%	42,2%	10,1%	52,3%
	7,1%	21,7%	20,7%	41,1%	9,4%	50,5%
77	10,3%	41,0%	10,6%	17,8%	20,4%	38,1%
78	9,8%	22,5%	20,6%	43,8%	3,4%	47,1%
	26,2%	23,0%	13,8%	15,4%	21,7%	37,1%
	14,4%	13,2%	31,4%	32,3%	8,6%	40,9%
80	7,4%	21,0%	19,7%	42,9%	9,0%	51,9%
82	13,0%	28,3%	21,4%	33,3%	4,0%	37,3%
83	7,5%	20,0%	24,7%	31,1%	16,6%	47,7%
	6,8%	18,6%	15,3%	51,5%	7,8%	59,3%
84	0,0%	32,4%	27,4%	21,0%	19,2%	40,2%
87	12,7%	11,9%	26,2%	39,7%	9,5%	49,2%
	14,5%	11,8%	27,6%	33,1%	13,0%	46,1%
	9,3%	12,3%	34,5%	32,7%	11,2%	43,9%
	12,2%	10,5%	30,8%	33,6%	13,0%	46,6%
	10,6%	9,9%	26,2%	40,6%	12,7%	53,3%
	14,4%	12,4%	27,9%	36,0%	9,2%	45,2%
	6,7%	25,8%	24,7%	39,5%	3,3%	42,8%
	4,4%	23,2%	19,4%	48,5%	4,5%	52,9%
	11,7%	11,3%	26,7%	31,5%	18,8%	50,3%
88	14,1%	13,4%	27,9%	34,7%	9,9%	44,6%
	13,4%	15,2%	21,0%	36,7%	13,6%	50,3%
	13,3%	12,5%	28,3%	32,5%	13,4%	45,9%
	13,0%	9,2%	28,7%	40,3%	8,8%	49,1%
	2,9%	22,5%	15,0%	59,0%	0,7%	59,6%
	4,2%	35,5%	11,4%	35,6%	13,3%	48,9%
	14,7%	9,7%	28,5%	34,9%	12,2%	47,1%
89	0,0%	35,4%	10,1%	39,0%	15,5%	54,5%

Ácidos grasos liberados del aceite por la enzima						
Resido de aminoácido	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmítico	Esteárico	P+S
92	13,1%	16,1%	23,5%	36,4%	10,9%	47,3%
	12,0%	10,4%	18,2%	48,0%	11,4%	59,3%
	13,5%	11,3%	32,6%	34,8%	7,7%	42,6%
	8,3%	25,1%	17,9%	46,1%	2,6%	48,7%
	13,7%	9,8%	24,4%	39,6%	12,5%	52,1%
	4,9%	20,0%	17,5%	51,7%	5,8%	57,5%
93	11,7%	9,3%	30,8%	40,8%	7,4%	48,2%
96	10,3%	12,4%	25,9%	37,8%	13,6%	51,4%
	17,5%	35,4%	35,5%	escala	11,6%	escala
	12,5%	12,0%	28,7%	33,3%	13,6%	46,8%
98	13,4%	19,9%	21,7%	39,7%	5,3%	45,0%
	18,5%	30,8%	36,8%	escala	13,9%	escala
101	9,8%	12,5%	27,9%	39,7%	10,1%	49,8%
103	9,1%	36,6%	17,5%	26,0%	10,8%	36,8%
107	11,9%	10,1%	31,8%	30,5%	15,7%	46,20%
	0,0%	20,4%	40,1%	12,1%	27,4%	39,5%
	0,0%	29,6%	30,9%	6,8%	32,6%	39,4%
	0,0%	29,6%	22,9%	9,5%	38,0%	47,5%
	2,2%	12,0%	43,9%	22,0%	19,9%	42,0%
	30,4%	12,5%	46,2%	10,9%	57,1%	68,0%
	12,0%	20,5%	30,7%	5,2%	31,6%	36,8%
	5,0%	16,0%	14,2%	62,2%	2,6%	64,8%
	11,9%	10,1%	31,8%	30,5%	15,7%	46,2%
	0,0%	15,6%	46,5%	10,2%	27,6%	37,8%
	13,2%	21,6%	20,4%	31,3%	13,5%	44,80%
108	9,0%	49,0%	23,0%	12,3%	6,7%	19,0%
	0,0%	51,0%	6,1%	33,1%	9,9%	43,0%
	11,0%	18,4%	44,6%	4,1%	21,9%	26,0%
	0,0%	29,6%	22,9%	9,5%	38,0%	47,5%
	0,0%	32,0%	10,2%	53,5%	4,3%	57,8%
	0,0%	45,6%	10,4%	38,2%	5,8%	44,0%
	0,0%	28,4%	14,7%	51,2%	5,7%	56,9%
	5,4%	18,9%	17,2%	52,8%	5,8%	58,6%
	0,0%	10,6%	34,7%	5,9%	48,8%	54,7%
	0,0%	21,9%	24,7%	32,7%	20,8%	53,4%
	12,1%	13,9%	27,6%	33,8%	12,7%	46,50%
109	10,9%	8,8%	31,3%	37,7%	11,3%	49,0%
110	0,4%	21,4%	23,9%	54,4%	0,0%	54,4%
113	5,0%	44,1%	15,1%	21,0%	14,8%	35,8%
	13,6%	14,6%	32,0%	15,2%	24,6%	39,8%
	13,9%	25,9%	23,7%	36,5%	0,0%	36,5%

Ácidos grasos liberados del aceite por la enzima						
Resido de aminoácido	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmítico	Esteárico	P+S
116	4,8%	17,4%	11,2%	55,5%	11,1%	66,6%
	7,8%	17,7%	19,8%	47,0%	7,7%	54,7%
	3,3%	26,7%	16,1%	33,1%	20,7%	53,8%
	7,3%	18,3%	16,5%	47,8%	10,1%	57,9%
	4,3%	22,9%	14,2%	54,3%	4,2%	58,5%
	4,6%	26,8%	13,5%	41,6%	13,5%	55,1%
	0,0%	32,4%	9,6%	38,3%	19,8%	58,0%
	8,1%	16,1%	16,2%	50,4%	9,3%	59,6%
	7,3%	20,5%	11,7%	49,2%	11,2%	60,5%
	6,9%	19,6%	12,9%	52,1%	8,5%	60,6%
	5,4%	17,4%	15,4%	50,8%	11,0%	61,8%
	8,7%	18,7%	13,9%	49,1%	9,5%	58,6%
	6,7%	22,8%	10,8%	46,3%	13,4%	59,7%
	6,4%	17,2%	8,8%	50,3%	17,2%	67,6%
	5,6%	17,6%	9,0%	59,0%	8,8%	67,8%
117	6,2%	21,4%	18,3%	46,0%	8,0%	54,1%
	8,9%	21,8%	17,7%	40,6%	11,0%	51,6%
120	15,3%	17,9%	20,1%	44,4%	2,3%	46,7%
	7,5%	15,4%	16,3%	51,3%	9,5%	60,8%
	17,3%	4,4%	25,7%	44,0%	8,6%	52,6%
	4,1%	25,5%	20,5%	36,9%	13,0%	49,9%
	15,7%	10,1%	20,9%	36,8%	16,5%	53,3%
132	0,0%	32,8%	10,9%	56,2%	0,0%	56,2%
133	6,6%	20,7%	19,5%	49,9%	3,3%	53,2%
	9,3%	18,3%	16,5%	45,1%	10,8%	55,8%
	3,3%	30,4%	20,7%	45,6%	0,0%	45,6%
	0,0%	34,3%	9,6%	56,0%	0,0%	56,0%
	13,2%	12,9%	22,2%	42,7%	9,0%	51,7%
	10,1%	11,6%	23,3%	46,5%	8,4%	54,9%
	0,0%	35,9%	10,9%	46,9%	6,3%	53,2%
134	0,0%	56,2%	36,6%	7,2%	0,0%	7,2%
135	0,0%	41,1%	7,2%	51,8%	0,0%	51,8%
139	0,0%	35,9%	10,9%	46,9%	6,3%	53,2%
140	9,7%	23,4%	21,4%	32,7%	12,8%	45,5%
141	11,2%	12,1%	36,5%	28,2%	12,1%	40,2%
	14,7%	13,9%	28,1%	38,3%	5,0%	43,3%
142	16,3%	18,8%	18,8%	10,3%	35,7%	46,1%
	0,0%	34,5%	11,7%	43,4%	10,5%	53,8%
	8,6%	15,8%	32,5%	22,8%	20,4%	43,2%
	2,4%	9,6%	23,7%	47,7%	16,7%	64,3%
144	0,0%	14,9%	51,2%	13,4%	20,4%	33,9%

Ácidos grasos liberados del aceite por la enzima						
Resido de aminoácido	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmítico	Esteárico	P+S
146	13,6%	10,3%	26,0%	31,4%	18,7%	50,2%
	12,6%	12,4%	25,5%	36,5%	12,9%	49,4%
	6,6%	22,4%	19,5%	48,2%	3,4%	51,6%
	9,0%	19,7%	19,0%	41,7%	10,5%	52,2%
147	8,0%	17,9%	17,6%	48,8%	7,7%	56,5%
	7,2%	24,5%	17,9%	33,0%	17,4%	50,5%
	9,5%	20,6%	17,7%	42,2%	9,9%	52,2%
150	7,7%	15,1%	17,5%	50,4%	9,2%	59,7%
	7,5%	20,6%	18,6%	41,3%	12,0%	53,3%
151	7,8%	26,1%	17,5%	46,4%	2,2%	48,6%
	5,0%	29,6%	12,4%	48,9%	4,1%	53,0%
	0,0%	25,5%	14,5%	55,5%	4,5%	60,0%
	0,0%	14,2%	52,1%	20,0%	13,7%	33,7%
	0,0%	17,3%	30,5%	43,3%	8,9%	52,2%
	8,0%	22,7%	20,2%	44,0%	5,1%	49,2%
152	0,0%	56,3%	15,7%	23,6%	4,4%	28,0%
	8,0%	12,7%	26,3%	22,5%	30,5%	53,0%
	0,0%	27,1%	26,2%	26,2%	20,5%	46,7%
	0,0%	20,1%	44,2%	24,8%	10,8%	35,7%
	9,5%	31,2%	38,3%	2,2%	18,9%	21,1%
155	18,4%	4,9%	25,6%	41,5%	9,6%	51,1%
157	7,9%	19,5%	22,2%	41,2%	9,2%	50,4%
	9,6%	21,7%	20,1%	39,1%	9,6%	48,7%
	7,2%	25,2%	13,0%	34,9%	19,8%	54,7%
158	14,0%	1,2%	33,5%	42,8%	8,5%	51,2%
159	6,3%	28,4%	13,8%	36,7%	14,8%	51,5%
160	5,6%	20,8%	20,8%	46,6%	6,2%	52,8%
161	6,2%	21,4%	18,3%	46,0%	8,0%	54,1%
	8,9%	21,8%	17,7%	40,6%	11,0%	51,6%
162	10,2%	45,6%	38,4%	escala	5,7%	escala
	22,1%	39,2%	32,7%	escala	6,0%	escala
163	5,9%	22,9%	15,5%	47,4%	8,3%	55,7%
	8,6%	17,1%	10,4%	61,4%	2,5%	63,9%
	6,4%	23,5%	20,4%	45,7%	4,0%	49,7%

Ácidos grasos liberados del aceite por la enzima						
Resido de aminoácido	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmítico	Esteárico	P+S
164	8,4%	26,9%	22,6%	39,2%	2,9%	42,1%
	13,0%	38,4%	37,5%	escala	11,2%	escala
	9,6%	29,5%	21,1%	35,1%	4,7%	39,8%
	17,8%	12,3%	20,5%	38,7%	10,7%	49,4%
	23,3%	23,1%	39,1%	escala	14,5%	escala
	6,5%	15,2%	17,1%	58,0%	3,3%	61,3%
	9,1%	23,1%	19,8%	40,1%	7,8%	47,9%
	9,2%	20,1%	17,7%	41,2%	11,8%	53,0%
	15,6%	17,7%	24,4%	29,9%	12,4%	42,3%
	15,9%	37,0%	35,5%	escala	11,7%	escala
166	5,5%	21,8%	22,8%	44,5%	5,4%	49,9%
	14,6%	22,3%	21,8%	33,2%	8,1%	41,3%
	22,3%	33,3%	36,8%	escala	7,6%	escala
167	7,2%	19,4%	20,1%	44,8%	8,4%	53,3%
	10,0%	21,9%	20,7%	36,3%	11,0%	47,3%
170	12,5%	12,4%	29,4%	37,8%	7,8%	45,6%
	8,5%	18,2%	20,8%	43,0%	9,5%	52,5%
	3,5%	22,0%	39,8%	8,9%	25,9%	34,7%
171	8,0%	22,4%	35,5%	33,4%	0,7%	34,1%
172	8,0%	18,8%	21,4%	43,6%	8,1%	51,7%
	7,4%	19,1%	18,6%	45,1%	9,8%	54,9%
	22,5%	0,0%	37,3%	40,2%	0,0%	40,2%
178	14,5%	12,9%	22,0%	32,3%	18,3%	50,6%
180	8,6%	19,0%	18,5%	42,1%	11,8%	54,0%
	11,8%	14,2%	29,3%	32,1%	12,5%	44,6%
	11,5%	40,0%	36,3%	escala	12,2%	escala
	14,6%	12,1%	28,7%	36,6%	7,9%	44,6%
183	10,6%	35,4%	40,7%	escala	13,3%	escala
193	3,0%	32,4%	15,2%	49,4%	0,0%	49,4%
194	10,9%	38,7%	42,0%	escala	8,4%	escala
	9,6%	21,8%	20,7%	34,6%	13,2%	47,9%
	12,6%	31,0%	37,8%	escala	18,6%	escala
	3,0%	32,4%	15,2%	49,4%	0,0%	49,4%
197	9,8%	0,0%	50,9%	39,4%	0,0%	39,4%
198	7,7%	19,7%	16,6%	46,8%	9,3%	56,1%
200	8,5%	16,8%	19,3%	48,7%	6,7%	55,3%
204	13,7%	12,8%	27,6%	32,2%	13,7%	45,9%
	9,9%	14,0%	30,5%	23,2%	22,5%	45,7%
210	7,2%	22,0%	20,7%	39,0%	11,2%	50,2%

Ácidos grasos liberados del aceite por la enzima						
Resido de aminoácido	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmítico	Estearico	P+S
211	9,0%	16,2%	39,4%	24,0%	11,2%	35,3%
	10,2%	17,0%	24,7%	35,7%	12,4%	48,1%
	13,8%	10,4%	36,5%	24,1%	15,3%	39,4%
	6,5%	12,2%	36,3%	30,5%	14,5%	45,0%
	6,9%	26,6%	16,1%	32,7%	17,7%	50,3%
	3,4%	36,2%	27,7%	32,6%	0,0%	32,6%
	6,9%	26,5%	20,5%	28,9%	17,3%	46,1%
	0,0%	35,1%	15,6%	39,6%	9,7%	49,2%
	0,0%	25,3%	19,5%	46,8%	8,4%	55,2%
	6,6%	19,7%	25,9%	37,2%	10,6%	47,8%
	7,7%	22,8%	20,7%	36,6%	12,3%	48,9%
	16,3%	4,6%	28,2%	49,1%	1,7%	50,8%
	8,0%	22,1%	17,2%	41,2%	11,5%	52,7%
	8,0%	22,1%	17,2%	41,2%	11,5%	52,7%
	18,2%	3,2%	28,7%	42,4%	7,5%	49,8%
	11,9%	10,1%	31,8%	30,5%	15,7%	46,2%
212	7,5%	25,6%	17,6%	36,5%	12,8%	49,3%
	19,1%	0,9%	29,7%	46,8%	3,5%	50,3%
	8,8%	28,4%	9,6%	33,7%	19,5%	53,2%
	19,4%	24,8%	18,9%	33,5%	3,3%	36,8%
	19,1%	26,9%	17,5%	31,6%	4,9%	36,6%
	5,5%	42,3%	7,9%	30,8%	13,5%	44,3%
	4,6%	23,9%	25,1%	35,5%	11,0%	46,5%
	8,8%	28,4%	9,6%	33,7%	19,5%	53,2%
	0,0%	65,4%	22,4%	10,5%	1,7%	12,2%
	3,3%	14,2%	40,6%	30,7%	11,1%	41,8%
	11,2%	13,6%	25,0%	40,3%	9,9%	50,2%
	10,6%	16,6%	19,1%	42,7%	11,0%	53,7%
	21,1%	22,7%	17,4%	17,5%	21,2%	38,7%
	7,6%	24,0%	20,0%	38,9%	9,5%	48,4%
	10,3%	20,4%	22,2%	33,7%	13,4%	47,1%
	3,5%	22,0%	39,8%	8,9%	25,9%	34,7%
213	7,6%	28,2%	16,3%	30,4%	17,5%	47,9%
	5,3%	18,8%	18,1%	41,3%	16,4%	57,7%
	7,5%	21,0%	14,8%	48,5%	8,2%	56,7%
	8,3%	17,8%	18,5%	44,6%	10,9%	55,5%
214	9,1%	20,2%	19,1%	47,0%	4,5%	51,6%
	8,3%	19,8%	18,9%	44,6%	8,4%	53,0%
	7,7%	20,5%	19,6%	45,3%	7,0%	52,2%
	7,1%	21,5%	16,9%	42,4%	12,1%	54,5%
	7,0%	25,9%	15,1%	39,9%	12,0%	51,9%
	6,9%	18,0%	18,3%	48,5%	8,4%	56,9%
	7,4%	19,2%	18,2%	45,6%	9,5%	55,1%
	5,3%	21,1%	10,9%	47,3%	15,4%	62,7%
	5,3%	21,1%	10,9%	47,3%	15,4%	62,7%

Ácidos grasos liberados del aceite por la enzima						
Resido de aminoácido	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmítico	Esteárico	P+S
215	7,8%	19,8%	15,8%	46,4%	10,2%	56,6%
	7,9%	20,2%	17,7%	40,6%	13,6%	54,1%
	20,0%	24,8%	25,4%	25,7%	4,1%	29,9%
	4,4%	26,2%	19,2%	45,1%	5,1%	50,2%
	8,1%	19,6%	20,1%	42,7%	9,4%	52,1%
	2,3%	30,1%	19,7%	31,8%	16,1%	47,9%
	5,9%	23,7%	14,8%	39,3%	16,3%	55,6%
	9,6%	26,0%	17,0%	36,5%	10,9%	47,3%
	4,7%	20,8%	14,1%	42,2%	18,2%	60,4%
	4,2%	31,0%	12,0%	40,7%	12,1%	52,8%
	6,7%	21,3%	18,1%	41,7%	12,3%	53,9%
	8,0%	19,5%	20,4%	47,1%	5,0%	52,1%
216	8,3%	21,9%	18,9%	40,9%	10,0%	50,9%
	0,0%	28,0%	30,1%	22,8%	19,1%	41,9%
	34,6%	0,0%	30,6%	33,7%	1,1%	34,8%
	7,3%	17,8%	17,9%	47,0%	10,0%	56,9%
	6,6%	16,6%	17,2%	50,0%	9,7%	59,7%
	7,7%	18,1%	19,2%	44,5%	10,5%	55,0%
	7,5%	20,3%	16,5%	45,0%	10,6%	55,6%
217	0,0%	42,3%	21,0%	24,3%	12,3%	36,6%
	6,8%	16,7%	17,1%	50,1%	9,3%	59,4%
	7,4%	20,5%	18,7%	44,1%	9,4%	53,5%
	11,9%	10,1%	31,8%	30,5%	15,7%	46,2%
	13,2%	21,6%	20,4%	31,3%	13,5%	44,8%
	12,1%	13,9%	27,6%	33,8%	12,7%	46,2%
218	0,7%	39,0%	17,8%	30,3%	12,1%	42,5%
	4,7%	26,8%	19,4%	30,5%	18,7%	49,1%
	7,1%	22,8%	22,4%	38,3%	9,4%	47,7%
	7,2%	19,9%	19,6%	44,1%	9,2%	53,4%
	8,5%	19,7%	19,9%	42,2%	9,7%	51,9%
	7,2%	25,9%	15,8%	37,6%	13,5%	51,1%
	8,0%	21,1%	20,9%	41,9%	8,2%	50,0%
	8,7%	19,9%	19,0%	42,9%	9,4%	52,4%
223	4,5%	29,5%	17,2%	15,8%	33,0%	48,8%
	0,0%	38,4%	30,1%	31,6%	0,0%	31,6%
	20,2%	22,8%	33,6%	17,3%	6,0%	23,4%
	19,0%	37,0%	34,9%	escala	9,1%	escala
224	8,0%	20,5%	22,1%	41,0%	8,4%	49,5%
	6,6%	18,2%	17,1%	51,4%	6,8%	58,2%
	7,9%	22,1%	21,6%	37,0%	11,4%	48,4%
	14,4%	19,0%	24,9%	33,1%	8,5%	41,7%
	3,1%	26,3%	24,2%	40,8%	5,6%	46,4%
	10,3%	20,1%	25,8%	38,1%	5,7%	43,7%

Ácidos grasos liberados del aceite por la enzima						
Resido de aminoácido	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmítico	Estearico	P+S
225	9,7%	22,2%	18,8%	41,8%	7,5%	49,3%
	4,3%	23,5%	17,8%	47,9%	6,4%	54,3%
	12,0%	21,9%	17,1%	39,1%	9,9%	49,0%
	12,9%	23,8%	17,5%	34,1%	11,7%	45,8%
	15,9%	22,6%	18,3%	38,0%	5,2%	43,2%
226	4,9%	24,9%	21,9%	45,8%	2,5%	48,3%
	6,5%	29,5%	22,8%	32,4%	8,8%	41,2%
227	13,6%	23,1%	21,9%	38,3%	3,2%	41,4%

La Tabla 4 es un compendio, o una compilación detallada, de los datos que se muestran en la Tabla 3 (arriba). Por ejemplo, el término "posición" indica la posición del residuo de aminoácidos en la SEC ID NÚM:2; la expresión "Aminoácido original", como en la Tabla 3, indica el residuo "parental" inalterado, mientras que la expresión "Aminoácido nuevo", como en la Tabla 3, indica el residuo de aminoácido inalterado (nuevo) en esa posición. Los términos "WT_P" y "WT_S" indican la preferencia de sustrato (liberación de ácido graso) de la enzima "parental", p. ej., SEC ID NÚM:2 para un sustrato particular (ácido graso) indicando la cantidad de ácido graso liberado (hidrolizado) del aceite de soja (como en la Tabla 3), en donde "P" es ácido palmítico y "S" es ácido esteárico.

Las columnas de "palmitato" y "estearato" indican la cantidad de ácido palmítico y ácido esteárico liberada (por hidrólisis enzimática) del aceite de soja, que comprende ácido linolénico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, como se analizó anteriormente. "P + S" indica las cantidades combinadas de ácidos grasos hidrolizados que fueron ácido palmítico y ácido esteárico, o "P + S". Las expresiones "delta_P" y "delta_S" indican el cambio en preferencia de una enzima ilustrativa (p. ej., D61A de la primera fila) para hidrolizar ácido palmítico y ácido esteárico, respectivamente, en comparación con la correspondiente actividad de la SEC ID NÚM:2. La expresión "delta P+S" indica el cambio total o sumado en preferencia de una enzima ilustrativa (p. ej., D61A de la primera fila) para hidrolizar ácido palmítico y ácido esteárico en comparación con la correspondiente actividad de la SEC ID NÚM:2.

La sección "mutaciones de palmitato" resume enzimas ilustrativas que tienen una preferencia de actividad (hidrólisis de ácido graso) para liberación de ácido palmítico frente a otros ácidos grasos. La sección "mutaciones de estearato" resume la enzima ilustrativa que tiene una preferencia de actividad para liberar ácido esteárico frente a otros ácidos grasos (de aceite de soja, ensayo previamente descrito).

Tabla 4

Mutaciones de palmitato ilustrativas

Posición	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	WT_P	WT_S	Palmitato	Estearato
61	D	A	45%	6%	54%	7%
61	D	E	45%	6%	47%	8%
72	R	E	45%	6%	54%	4%
72	R	K	45%	6%	52%	9%
116	E	A	45%	6%	56%	11%
116	E	Q	45%	6%	50%	9%
116	E	R	45%	6%	52%	9%
116	E	T	45%	6%	50%	17%
116	E	V	45%	6%	59%	9%
133	S	A	45%	6%	45%	11%
151	I	G	45%	6%	49%	4%

Posición	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	WT_P	WT_S	Palmitato	Estearato
151	I	A	45%	6%	46%	2%
163	V	R*	45%	6%	61%	2%
164	D	R*	45%	6%	58%	3%

Mutaciones de estearato

Posición	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	WT_P	WT_S	Palmitato	Estearato
20	I	L	45%	6%	39%	12%
62	V	S	45%	6%	37%	18%
77	G	P	45%	6%	18%	20%
83	V	C	45%	6%	31%	17%
88	D	H	45%	6%	33%	13%
113	Y	G	45%	6%	15%	25%
116	E	T	45%	6%	50%	17%
116	E	G	45%	6%	33%	21%
140	H	K	45%	6%	33%	13%
146	K	S	45%	6%	31%	19%
167	I	S	45%	6%	36%	11%
180	L	E	45%	6%	42%	12%
194	E	M	45%	6%	35%	13%
211	A	Q	45%	6%	33%	18%
212	S	Y	45%	6%	34%	13%
215	G	C	45%	6%	42%	18%
215	G	V	45%	6%	39%	16%
215	G	w	45%	6%-	41%	12%
218	A	H	45%	6%	30%	19%
218	A	S	45%	6%	38%	14%
223	V	A	45%	6%	16%	33%
225	A	M	45%	6%	39%	10%
		Q	45%	6%	34%	12%

Mutaciones de palmitato

Posición	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	P + S	Delta_P	Delta_S	Delta_P+S
61	D	A	60%	9%	1%	9%
61	D	E	55%	2%	2%	4%
72	R	E	58%	9%	-2%	7%
72	R	K	61%	7%	3%	10%
116	E	A	67%	11%	5%	16%
116	E	Q	60%	5%	3%	9%

116	E	R	61%	7%	3%	10%
116	E	T	68%	5%	11%	17%
116	E	V	68%	14%	3%	17%
133	S	A	56%	0%	5%	5%
151	I	G	53%	4%	-2%	2%
151	I	A	49%	1%	-4%	-2%
163	v	R*	64%	16%	-4%	13%
164	D	R*	61%	13%	-3%	10%

Mutaciones de estearato

Posición	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	P + S	Delta_P	Delta_S	Delta_P+S
20	I	L	51%	-6%	6%	0%
62	V	S	55%	-8%	12%	4%
77	G	P	38%	-27%	14%	-13%
83	V	c	48%	-14%	11%	-3%
88	D	H	46%	-12%	7%	-5%
113	Y	G	40%	-30%	19%	-11%
116	E	T	68%	5%	11%	17%
116	E	G	54%	-12%	15%	3%
140	H	K	46%	-12%	7%	-5%
146	K	S	50%	-14%	13%	-1%
167	I	S	47%	-9%	5%	-4%
180	L	E	54%	-3%	6%	3%
194	E	M	48%	-10%	7%	-3%
211	A	Q	50%	-12%	12%	-1%
212	S	Y	47%	-11%	7%	-4%
215	G	C	60%	-3%	12%	9%
215	G	V	56%	-6%	10%	5%
215	G	w	53%	-4%	6%	2%
218	A	H	49%	-15%	13%	-2%
218	A	S	51%	-7%	8%	0%
223	V	A	49%	-29%	27%	-2%
225	A	M	49%	-6%	4%	-2%
		Q	46%	-11%	6%	-5%

Ejemplo 5: Evolución ilustrativa de hidrólisis mejorada de palmitato usando tecnología GeneReassemblySM

Catorce (14) mutaciones de aminoácidos individuales identificadas a partir del estudio GSSMSM que cubre siete (7) posiciones de aminoácidos se combinaron por tecnología GeneReassemblySM (número de patente de Estados Unidos 6.605.449). Las secuencias de ácido nucleico de longitud total generadas a partir de la fase GeneReassembly se clonaron en un vector de expresión pASK-5 (véase la descripción anterior) para expresión en hospedante de *Escherichia coli* HMS175 (Novagen, EE. UU.). La expresión de las variantes de GeneReassembly se indujo con anhidrotetraciclina después de lograr las densidades óptimas de las células hospedantes.

Las 14 mutaciones que produjeron los mayores incrementos en la hidrólisis de palmitato, identificadas en la Tabla 2, se seleccionaron para inclusión en la genoteca de Palmitasa GeneReassembly generada por los métodos descritos previamente. Los clones iniciales se detectaron en palmitato de umbeliferilo para actividad, produciendo aproximadamente 145 clones únicos de secuencias, que se ensayaron para actividad en aceite de soja, como se describió anteriormente.

La Figura 8 muestra datos de selección primario y secundario para ensayos de aceite de soja en clones seleccionados de la genoteca de palmitasa. Los clones que produjeron palmitato en un porcentaje superior a 70% de los FA hidrolizados en el ensayo primario (bajo condiciones de índice inicial estándar del método de ensayo) se seleccionaron para ser re-ensayados en aceite de soja. Para cada ensayo en aceite de soja, los FA extraídos se diluyeron 50 veces y 100 veces para análisis por LCMS o GC. Si se hallaron mutaciones adicionales no dirigidas, esto también se indica. Se presentan las relaciones de hidrólisis de FA detectadas y las cantidades de cada FA detectadas. En la figura, "alto" y "bajo" indican valores que estuvieron fuera del intervalo de la curva de calibración. Las filas se clasifican en orden de porcentaje de palmitato liberado en el ensayo secundario, y luego el palmitato liberado total. Los numerosos clones demostraron selectividad del palmitato significativamente aumentada (hasta 100%), en comparación con la SEC ID NÚM:2 parental (61,2%)

Los 25 hits principales de palmitasa seleccionados en base al ensayo secundario anteriormente descrito se subclonaron en sistemas de *Pseudomonas* (Dow Global Technologies Inc., solicitud de publicación de patente de Estados Unidos núm. 20050130160 y Dow Global Technologies Inc., solicitud de publicación de patente de Estados Unidos núm. 20050186666). La secuencia de ácido nucleico que codifica la enzima o el polipéptido se insertó o bien en el vector pMYC (Dow Global Technologies Inc., solicitud de publicación de patente de Estados Unidos núm. 20050130160) o en el vector pDOW1169 (Dow Global Technologies Inc., solicitud de publicación de patente de Estados Unidos núm. 20080058262) y luego se introdujo en el hospedante de *Pseudomonas fluorescens* por electroporación. Las células transformadas se seleccionaron o bien por desarrollo en medio mínimo para los constructos de pDOW1169 o en medio rico más tetraciclina para los constructos de pMYC. La expresión de la enzima o el polipéptido se indujo con IPTG después de lograr las densidades óptimas de las células hospedantes.

La Tabla 5 muestran datos de los ensayos en aceite de soja, efectuados por duplicado, de los 25 hits principales expresados en los sistemas de *Pseudomonas*. Los 4 hits construidos en el vector pDOW1169 se enumeran en tipo de fuente negrilla y subrayados, todos los demás hits se construyeron en el vector pMYC. La enzima se añadió a 5 g del aceite bruto, resultando en 20% de contenido de agua final. La mezcla se homogeneizó luego con una sonda de 7 mm y se incubó durante 40 horas a 25°C con agitación con varilla. Se extrajeron alícuotas y se analizó el FA convirtiendo el FA a FAME y cuantificando FAME por GC como se describe en el Ejemplo 8. Las 25 enzimas se cargaron a 5 g de aceite de soja en base a unidades de actividad de UMB-palmitato equivalentes. En estas reacciones, el palmitato en el aceite se redujo significativamente de 11% en aceite no tratado a 5% o menos en enzima tratada con aceites, indicando una preferencia aumentada para hidrólisis de palmitato en comparación con la enzima SEC ID NÚM:2 parental.

Tabla 5

Enzima	Palmitato	Estearato	Oleato	Linoleato	Linolenato	Posición de aminoácido y aminoácido presente									
						53	61	72	116	126	133	151	160	163	164
1	6,0%	4,3%	24,9%	59,7%	5,1%		A	E	A		A			R	
1	6,4%	4,3%	24,8%	59,3%	5,2%		A	E	A		A			R	
2	6,6%	4,3%	24,8%	59,2%	5,1%		A	E	V		A			R	
2	6,9%	4,3%	24,7%	59,0%	5,1%		A	E	V		A			R	
3	9,0%	4,3%	24,1%	57,3%	5,2%		E	E	V		A				R
3	8,4%	4,3%	24,3%	57,8%	5,2%		E	E	V		A				R
4	3,9%	4,3%	25,1%	61,6%	5,1%	A	A	K	A					R	
4	5,8%	4,4%	25,0%	59,7%	5,2%	A	A	K	A					R	
5	5,6%	4,3%	25,0%	60,0%	5,1%			E	V					R	
5	5,8%	4,3%	25,0%	59,8%	5,1%			E	V					R	
6	4,9%	4,3%	24,9%	60,8%	5,1%			E	V						
6	5,7%	4,3%	24,8%	60,1%	5,1%			E	V						
7	5,0%	4,3%	24,9%	60,7%	5,1%		E	E	V		A	A			
7	4,9%	4,3%	24,9%	60,8%	5,1%		E	E	V		A	A			
8	5,2%	4,0%	24,7%	61,3%	4,8%		E		V		A			R	
8	5,2%	4,0%	24,7%	61,3%	4,8%		E		V		A			R	
9	5,3%	4,1%	24,8%	60,9%	4,9%				V		A			R	
9	5,5%	4,2%	24,9%	60,6%	4,9%				V		A			R	
10	5,7%	4,0%	23,3%	56,2%	10,8%		E	E	V		A			R	
10	5,6%	4,3%	25,0%	60,1%	5,0%		E	E	V		A			R	
11	8,3%	5,7%	23,3%	57,7%	5,0%	T	E	E	A		A		P		R
11	5,9%	3,8%	24,5%	60,6%	5,2%		E	E	A		A				R
12	7,8%	5,1%	24,8%	57,3%	5,0%		E	E	V						R
12	5,7%	4,4%	25,0%	59,7%	5,1%		E	E	V						R

							Posición de aminoácido y aminoácido presente														
Enzima	Palmitato	Estearato	Oleato	Linoleato	Linolenato	53	61	72	116	126	133	151	160	163	164						
13	4,8%	3,3%	24,7%	62,2%	4,9%		E	K	V					R							
13	5,9%	4,0%	24,5%	60,8%	4,9%		E	K	V					R							
14	5,5%	3,8%	25,2%	60,6%	5,0%		E	K	V												
14	5,9%	4,5%	24,8%	59,9%	4,9%		E	K	V												
15	5,8%	3,6%	25,0%	60,7%	5,0%		E	E	T					R							
15	5,6%	4,3%	24,9%	60,4%	4,9%		E	E	T					R							
16	6,1%	4,0%	24,1%	60,9%	4,9%		E	E	V		A										
16	6,2%	4,0%	24,1%	60,9%	4,8%		E	E	V		A										
17	5,7%	4,4%	24,9%	59,9%	5,1%		E	K						R							
17	5,0%	4,3%	25,0%,	60,8%	4,9%		E	K						R							
18	8,3%	4,2%	23,5%	55,7%	8,2%		E	E	V					R							
18	7,9%	4,2%	23,7%,	56,0%	8,2%		E	E	V					R							
19	6,8%	4,2%	24,0%	56,9%	8,1%			K	V		A			R							
19	6,8%	4,2%	24,0%	56,9%	8,1%			K	V		A			R							
20	6,1%	4,2%	24,0%	57,5%	8,2%		E	R		A				R							
20	5,4%	4,1%	23,9%	58,5%	8,0%		E	R		A				R							
21	6,7%	4,0%	23,3%	58,0%	8,0%		A	E	A		A										
21	6,5%	3,9%	23,2%	58,5%	7,9%		A	E	A		A										
22	5,4%	4,0%	23,9%	58,6%	8,0%		E	E	A		A			R							
22	5,3%	4,1%	24,0%	58,7%	8,0%		E	E	A		A			R							
23	6,6%	3,9%	23,2%	58,4%	7,9%		E		V		A										
23	6,4%	3,9%	23,1%	58,8%	7,8%		E		V		A										
24	6,0%	4,3%	24,3%	57,3%	8,1%		A	E	V												
24	5,7%	4,3%	24,3%	57,6%	8,1%		A	E	V												
25	ND	ND	ND	ND	ND		A	E	V					R							

Enzima	Palmitato	Estearato	Oleato	Linoleato	Linolenato	Posición de aminoácido y aminoácido presente									
						53	61	72	116	126	133	151	160	163	164
25	6,0%	4,0%	24,0%	58,1%	8,0%		A	E	V					R	
26	4,8%	4,2%	24,2%	58,9%	7,9%		E	K						R	
ND (No determinado)															

5

La Tabla 6 expone datos de termoestabilidad de los 25 hits principales de palmitasa seleccionados en base al ensayo secundario anteriormente descrito. Estos datos se obtuvieron usando los hits expresados en el hospedante de *E. coli* HMS174. Los clones se ordenaron en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente (TA), 45, 50 o 55°C para luego ensayarse a TA en MeUMB-palmitato. El porcentaje de actividad residual se determina dividiendo la actividad después de la incubación a cada temperatura por la actividad después de la incubación a TA. También se exponen para cada palmitasa las mutaciones presentes, y los ejemplos de selectividad y actividad de palmitato en aceite de soja. La SEC ID NÚM:2 retuvo aprox. 15% de actividad después de la incubación durante 10 min. a 50°C, pero no tuvo actividad después de la incubación a 55°C.

Tabla 6

Enzima	% Estabilidad			Posición de aminoácido y aminoácido presente							
	55C	50C	45C	61	72	116	133	151	163	164	Otro
27		23,0%	62,7%	E	K	V					
28		22,8%	62,1%	E	K	V			R		
29			55,9%	E	K				R		
30	24,1%	68,8%	75,6%	E	E	V	A				
31	22,0%	68,1%	82,5%	E	E	V	A		R		
32		27,1%	58,4%	E	E	V			R		
33		26,1%	56,6%	E	E	V		A	R		
34		24,7%	54,0%	E	E	V	A			R	
35	8,1%	64,1%	67,6%	E	E	T			R		
36	10,3%	53,8%	75,7%	E	E	A	A		R		
37	9,2%	54,8%	61,5%	E	E	A			R		
38		45,4%	68,4%	E	E	A	A	A			
39		22,9%	61,9%	E	E	A	A			R	
40		35,3%	77,1%	E		V	A		R		
41		30,6%	70,2%	E		V	A				
42	20,3%	71,8%	79,3%	E		A	A	G	R		
43			64,2%	E		A	A				
44			63,2%	A	K	V					
45			56,0%	A	K	V	A	A	R		
46			80,7%	A	K	A			R		
47	22,2%	71,8%	88,1%	A	E	V	A		R		
48		60,6%	83,2%	A	E	V		A	R		
49		50,7%	68,0%	A	E	V					
50		50,2%	77,2%	A	E	V			R		
51		21,1%	53,6%	A	E	V		A		R	
52			56,5%	A	E	Q	A	A	R		
53		73,6%	118,3%	A	E	A	A				
54		69,2%	110,7%	A	E	A	A		R		
55			82,2%	A		V					
56			51,4%	A		A	A				
57			82,8%		K	V	A	G			
58			60,1%		K	V			R		

Enzima	% Estabilidad			Posición de aminoácido y aminoácido presente							
	55C	50C	45C	61	72	116	133	151	163	164	Otro
59			58,3%		K	V	A				P162S
60			57,9%		K	V	A		R		V62F
61			56,3%		K	V	A		R		
62			51,9%		K	Q	A		R		
63			74,8%		K	A					
64			58,8%		K	A	A				
65		49,6%	72,0%		E	V			R		
66		46,3%	66,0%		E	V					
67			55,1%		E	V	A		R		
68			51,7%		E	V	A	A			
69		23,6%	54,6%		E	A					
70			76,2%		E	A				R	
71			59,2%			V	A				
72			51,8%			V	A		R		

Ejemplo 6: Protocolo de laboratorio para evaluación de enzimas candidatas palmitasa, estearatasa o saturasa

Se expresaron enzimas y polipéptidos ilustrativos en el sistema de *Pseudomonas* (Dow Global Technologies Inc., publicación de patente de Estados Unidos núm. 20050130160). El ácido nucleico que codifica la enzima o el polipéptido se insertó en el vector pMYC (Dow Global Technologies Inc., publicación de patente de Estados Unidos núm. 20050130160) y se introdujo luego en el hospedante auxotrófico *Pseudomonas fluorescens* por electroporación. Las células transformadas se seleccionaron para crecimiento en medio mínimo. La expresión de la enzima o el polipéptido se indujo con IPTG después de lograr las densidades óptimas de las células hospedantes.

El siguiente procedimiento se usó para evaluar la capacidad de una enzima u otro polipéptido de hidrolizar una muestra de aceite. Se añade la enzima palmitasa a 1 kg de aceite en bruto, produciendo un contenido de agua final de 20%. La mezcla luego se homogeneiza con una mezcladora superior y se incuba a temperatura ambiente con mezclado constante usando una mezcladora de paletas. Se extraen alícuotas (0,5 ml) a 0 h, 21 h, 43 h, 65 h y 72 h y se tratan para conversión FAME y análisis GC como se describe en el Ejemplo 8.

El procedimiento antes mencionado se usó con la SEC ID NÚM:2, la muestra de aceite fue aceite de soja bruto. Después de 72 h, las muestras de aceite no tratado y de aceite tratado con enzima produjeron los resultados que se exponen en la Tabla 7.

Tabla 7

Composición de ácido graso	Aceite no tratado (%)	Aceite tratado con enzima (%)
C16:0	11,1	3,7
C18:0	4,1	4,2
C18:1	22,1	24,3
C18:2	54,5	59,5
C18:3	8,2	8,3

Los resultados demuestran una reducción significativa de la cantidad de ácido palmítico (C16:0), en donde dicha reducción se considera conveniente.

Ejemplo 7: Evaluación de lipasas, saturasas o palmitasas con homología de secuencia al polipéptido ilustrativo de SEC ID NÚM:2

Se subclonaron varias secuencias de lipasa homólogas en el vector pMAL-c2x (New England Biolabs, EE. UU.) por el método xi-cloning (Genlantis, EE. UU.). Los constructos que contenían las SEC ID NÚM:2, SEC ID NÚM:6, SEC ID NÚM: 14 o SEC ID NÚM: 16 se transformaron en el hospedante de *Escherichia coli* ArcticExpress RP

(Stratagene, EE. UU.) para expresión. La expresión de las lipasas está bajo el control de un promotor que se induce con IPTG después de lograr densidades óptimas de las células hospedantes. Las enzimas recombinantes se ensayaron en aceite de soja para selectividad de FA (Tabla 8). Las lipasas que comprendían las SEC ID NÚM:2, SEC ID NÚM:6, SEC ID NÚM: 14 o SEC ID NÚM:16 se expresaron y escindieron de la etiqueta de fusión MBP usando condiciones estándar. Se inoculó una sola colonia en el medio LB que contenía 20 µg/ml gentamicina y se agitó a 200 rpm durante una noche a 30°C. Este cultivo de toda la noche se inoculó en medio LB nuevo que contenía 20 µg/ml gentamicina para una lectura OD600 de 0,05. Este cultivo se agitó a 200 rpm y 30°C hasta que se obtuvo una lectura OD600 de 0,5. Los cultivos se transfirieron a 12°C agitando a 200 rpm y se dejaron equilibrar hasta la temperatura inferior antes de la inducción de expresión de lipasa por adición de 0,5 mM IPTG, seguida de desarrollo durante 24 horas más. Las células se recogieron por centrifugación, se suspendieron en tampón Tris pH 8, que contenía NaCl, CaCl₂, DNaseI y lisozima, y luego se lisaron por sonicación. Los lisados celulares se clarificaron por centrifugación. Las enzimas se escindieron de MBP por incubación de la fusión lipasa-MBP con FactorXa durante 6 horas a temperatura ambiente, seguida de otras 18 horas a 12°C. Los lisados clarificados con enzimas recombinantes inactivas y activas exhibieron todos fuertes preferencias similares para hidrólisis de palmitato frente a otro FA cuando se ensayaron en aceite de soja (Tabla 8).

Tabla 8

Enzima	Similitud con la SEC ID NÚM:2		Ácidos grasos (%) hidrolizados				
	Identidad	Similitud	Palmitato	Estearato	Oleato	Linoleato	Linolenato
Aceite de soja	NA	NA	11,0 %	4,3%	24,9%	59,7%	5,1%
SEC ID NÚM: :2	100%	100	50,9 %	5,1%	16,9%	18,1%	9,0%
SEC ID NÚM: 14	27%	42%	45,8 %	2,0	14,2%	37,9%	0,0%
SEC ID NÚM: 12	47%	62%	50,4 %	4,1%	16,1%	23,4%	6,0%
SEC ID NÚM: 6	41%	56%	37,0 %	6,2%	28,5%	20,7%	7,6%

Ejemplo 8: Método para conversión de ácidos grasos libres o triglicéridos a metilésteres de ácido graso (FAME) y cuantificación de FAME por cromatografía gaseosa

Los ácidos grasos liberados de lípidos, triglicéridos, grasas o aceites por la acción de lipasas, p. ej., saturadas, palmitasas y/o estearatasas se pueden cuantificar directamente por LCMS usando el método descrito en el Ejemplo 2. Alternativamente, estos ácidos grasos hidrolizados se pueden convertir a Metilésteres de Ácido Graso (FAME) usando metanólisis catalizada por ácido y luego cuantificarse por Cromatografía Gaseosa (GC). En este ejemplo:

El aceite después de la reacción con lipasas, p. ej., saturadas, palmitasas y/o estearatasas se trata por adición de 1 ml de disolvente de extracción (CHCl₃:MeOH:4N HCl (2:1:0,075)) por 0,5 ml de volumen de reacción.

Una alícuota de 45 µl del aceite extraído se transfiere a un vial con rosca superior de 4 ml. A cada vial se le añade una pequeña varilla agitadora, seguido de 2 ml de hexano y 400 µl 20% (v/v) MeOH en HCl.

Los viales luego se sellan y se calientan agitando durante 15 minutos. Los viales luego se extraen del calor y se dejan enfriar antes de añadir 800 µl H₂O.

La mezcla luego se agita en vórtex, y una muestra (500 µl) de la capa superior de hexano que contiene FAMES se transfiere a un vial automuestreador para la GC. A cada muestra se le añaden 500 µl de 0,5 mg/ml C15:0 FAME como estándar interno. Los FAME sintetizados usando este método se analizan luego por Cromatografía Gaseosa usando los siguientes parámetros de operación:

El equipo es un Hewlett Packard 6890 Serie GC con automuestreador

La columna utilizada es una columna capilar de sílice condensada Supelco SP-2380 de 30 m x 0,25 mm y espesor de película de 0,2 µm

El inyector y el detector se configuran a 260°C; el flujo gaseoso de helio se configura a 0,6 ml/min; el horno se configura a una temperatura inicial de 150°C.

Las muestras (1 ml) se inyectan con un split de inyección 10:1. El método GC usado tiene:

Rampa 1: 4C/min durante 10 min = 190°C

Rampa 2: 15C/min durante 4 min = 250°C

Retención: 250°C durante 2 min

El FA de triglicéridos también se puede analizar por conversión a FAME, incluso en presencia de ácidos grasos hidrolizados. Usando el método anteriormente descrito y el método que se describe a continuación en combinación con éste se puede determinar la selectividad del ácido graso de una lipasa, p. ej., saturasa, palmitasa y/o estearatasa, y el efecto de la enzima en el aceite. El método para análisis de FA unido a glicerol (u otros alcoholes) utiliza metanólisis catalizada base:

El aceite después de la reacción con lipasas, p. ej., saturasas, palmitasas y/o estearatasas se trata por adición de 1 ml de disolvente de extracción (CHCl_3 :MeOH:4N HCl (2:1:0,075)) por 0,5 ml de volumen de reacción.

Una alícuota de 45 μl de aceite extraído se transfiere a un tubo microfugo. Se añaden 500 μl de heptano seguidos de 50 μl de KOH metanólico 2N.

La mezcla se agita en vórtex vigorosamente durante 30 segundos, luego se centrifuga.

Una alícuota (50 μl) de la capa superior de heptano que contiene FAME se transfiere a un vial del automuestreador y se combina con 450 μl de hexano que contiene el estándar interno C15:0.

Análisis de FAME por GC como se señaló anteriormente.

Ejemplo 9: Evolución ilustrativa para mejora de tolerancia térmica de palmitasa usando tecnología GSSMSM

La palmitasa ilustrativa de la invención que incluyó mutaciones D61E, R72K y V163R de la SEC ID NÚM:2 (Enzima 17, Tabla 5, arriba) se eligió como el mutante de selectividad líder de las tandas anteriores de evolución (Ejemplos 4 y 5, arriba). Se efectuó otra evolución para mejorar la tolerancia térmica de la enzima selectiva líder (SEC ID NÚM:2 con mutaciones D61E, R72K y V163R) usando tecnología GSSM (véase, p. ej., la patente de Estados Unidos núm. 6.171.820).

En síntesis, la evolución GSSM se realizó introduciendo mutaciones puntuales usando oligonucleótidos degenerados, una posición de aminoácido por vez, de modo que cada codón original pudiese sustituirse con cada uno de los 20 aminoácidos naturalmente codificados. La genoteca se construyó en el vector pDOW-Kan, se analizó con gel de agarosa, se trató con DPN1 y luego se transformó en células competentes XL 1 Blue de *E. coli*. Las colonias se desarrollaron, se recogieron y se secuenciaron. Las colonias se combinaron y se preparó DNA usando el kit Qiagen mini-prep (Catálogo núm. 27106, Qiagen, Valencia, CA).

Las células competentes de *Pseudomonas fluorescens* se transformaron luego con el DNA. El hospedante de *Pseudomonas fluorescens* se obtuvo de Dow Global Technologies Inc. (solicitud de publicación de patente de Estados Unidos núm. 20050130160, solicitud de publicación de patente de Estados Unidos núm. 20050186666 y solicitud de publicación de patente de Estados Unidos núm. 20060110747). El vector pDOW-Kan se construyó añadiendo un marcador de resistencia a kanamicina a pDOW1169 (Dow Global Technologies Inc., solicitud de publicación de patente de Estados Unidos núm. 20080058262). Las células se desarrollaron en medio mínimo M9 (Dow Global Technologies Inc., solicitud de publicación de patente de Estados Unidos núm. 20050186666) enriquecido con uracilo y kanamicina. Todos los ejemplos que siguen que describen el uso del vector pDOW-kan, *Pseudomonas fluorescens* y medio M9, se refieren al mismo vector pDOW-kan, *Pseudomonas fluorescens* y medio M9 que se describieron anteriormente.

La genoteca GSSM se detectó en un formato de placa de 384 pocillos. Se realizaron estudios de selección HTP primarios y secundarios usando UMB-Palmitato (como se describió anteriormente en el Ejemplo 3). Con el fin de identificar mutaciones que mantengan la actividad mientras la enzima está a una temperatura elevada, este ensayo se efectuó incubando el sustrato fluorogénico con el lisado de células enteras a 54°C durante 30 minutos, precedido por una incubación de 30 minutos del lisado de células enteras con tampón durante 30 minutos a 54°C para asegurar que la enzima alcanzara 54°C antes de cargar el sustrato. Se midió la fluorescencia de cada mutante (véase columna 2, Tabla 9) y cualquier mutante con una lectura de fluorescencia de más de 2 desviaciones estándar encima del control se determinó como un "hit" – es decir, un mutante con tolerancia térmica suficientemente aumentada. Se identificaron 117 hits con cambios de aminoácido únicos del estudio de UMB-Palmitato (véase la Tabla 9 a continuación). Los cambios de aminoácidos en los 117 hits de mutaciones individuales ocurrieron en 50 residuos; 22% de la proteína exhibió cambios de aminoácidos. Los 117 hits se evaluaron además para desempeño en aceite bruto en ensayos de 5 g estándar (véase el Ejemplo 5) a 25°C y 45°C. Los resultados se exponen en la Tabla 10 a continuación.

Tabla 9

Enzima	UMB-Palmitato	Codón original	Codón nuevo	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	Posición del residuo de aminoácido	Mutaciones adicionales
TT1	43670	TAC	CTT	Y	L	7	
TT2	40432	GCC	CTG	A	L	15	
TT3	21247	GCC	ATG	A	M	15	
TT4	65535	GAT	TGG	D	W	16	
TT5	23779	ATG	ATT	M	I	31	
TT6	65535	GGC	GAG	G	E	32	
TT7	65535	GGC	CCT	G	P	32	
TT8	26222	CTG	ATG	L	M	34	
TT9	60900	CTG	ATT	L	I	43	
TT10	28008	TTC	TTT	F	F	46	
TT11	65535	GCC	TGT	A	C	48	
TT12	55409	GCC	ATG	A	M	48	
TT13	65535	GCC	ACT	A	T	48	
TT14	65535	GAC	AAT	D	N	49	
TT15	57979	GAC	CGT	O	R	49	
TT16	65535	GAC	TCT	D	S	49	
TT17	23108	GCC	ATG	A	M	52	
TT18	65535	TCG	TTT	S	F	68	
TT19	65535	TCG	TAT	S	Y	68	
TT20	24003	CGG	GCT	R	A	85	
TT21	37005	CGG	GAT	R	D	85	
TT22	65535	CGG	CAG	R	Q	85	
TT23	39478	CGG	TCT	R	S	85	
TT24	65535	CGG	ACG	R	T	85	
TT25	65535	CGG	TAT	R	Y	85	
TT26	52743	GAG	AAG	E	K	95	(GCG)92(GCT)
TT27	30520	GCG	GTT	A	V	92	
TT28	18239	GCG	GAG	A	E	92	
TT29	25819	GAG	GAT	E	D	95	
TT30	21805	GAG	GCT	E	A	95	
TT31	42531	GCG	AAG	A	K	96	
TT32	23046	GCG	AGG	A	R	96	
TT33	19889	GCC	TCG	A	S	97	
TT34	17199	AAG	CGT	K	R	101	
TT35	33316	GTG	TTG	V	L	104	
TT36	45591	TAT	CTT	Y	L	113	
TT37	31618	GAG	GCG	E	A	116	

Enzima	UMB-Palmitato	Codón original	Codón nuevo	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	Posición del residuo de aminoácido	Mutaciones adicionales
TT38	65535	GAG	TGT	E	C	116	
TT39	65535	GAG	GAT	E	p	116	
TT40	36485	GAG	TTT	E	F	116	
TT41	65535	GAG	ATT	E	I	116	(TTC)135(TTT)
TT42	48338	GAG	ATT	E	I	116	
TT43	38696	GAG	CTT	E	L	116	
TT44	58069	GAG	AAT	E	N	116	
TT45	65535	GAG	CAG	E	Q	116	
TT46	42681	GAG	AGT	E	S	116	
TT47	65535	GAG	ACT	E	T	116	
TT48	65535	GAG	GTT	E	V	116	
TT49	60385	GAG	TGG	E	W	116	
TT50	42924	GAG	TAT	E	Y	116	
TT51	18591	CTG	ATG	L	M	117	
TT52	65535	AAG	AGG	K	R	120	
TT53	50984	AGT	GCT	S	A	133	
TT54	65535	GCG	TCG	A	S	136	
TT55	32933	GGC	TTT	G	F	137	
TT56	65535	CTC	ATG	L	M	139	
TT57	54461	CAC	AGG	H	R	140	
TT58	20741	AAC	TGG	N	W	142	
TT59	25491	GCG	ATT	A	1	144	
TT60	19150	GCG	TTG	A	L	144	
TT61	54979	GCG	ATG	A	M	144	
TT62	33234	GCG	GTG	A	V	144	
TT63	51208	GAG	CAT	E	H	149	
TT64	21503	GCG	ATT	A	1	150	
TT65	51405	GCG	ATG	A	M	150	
TT66	65535	GCG	TGG	A	W	150	
TT67	25795	AGC	AAT	S	N	153	
TT68	18156	AGC	GGT	S	G	153	
TT69	65535	AAC	GAC	N	D	158	
TT70	65535	CCG	GGT	P	G	162	
TT71	18622	CCG	AAG	P	K	162	
TT72	55639	CCG	TCG	P	S	162	R163F
TT73	26167	CCG	TCG	P	S	162	I167L
TT74	20774	CCG	TCG	P	S	162	
TT75	65535	GTG	ATT	V	I	183	

Enzima	UMB-Palmitato	Codón original	Codón nuevo	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	Posición del residuo de aminoácido	Mutaciones adicionales
TT76	20029	CAG	GCG	Q	A	166	
TT77	21399	CAG	GAG	Q	E	166	
TT78	32863	CAG	ACG	Q	T	166	
TT79	25576	ATT	TTT	I	F	167	
TT80	16567	ATT	AAG		K	167	
TT81	26239	ATT	CTG		L	167	
TT82	19330	ATT	CGT	I	R	167	
TT83	31994	ATT	TAT	I	Y	167	
TT84	65535	CGC	CAT	R	H	172	
TT85	38603	CGC	AAG	R	K	172	
TT86	24428	CGC	CTT	R	L	172	
TT87	37581	CGC	TAT	R	Y	172	
TT88	30655	CTC	AAG	L	K	180	
TT89	65535	CTC	AGG	L	R	180	
TT90	64023	GCG	TGT	A	C	185	
TT91	41225	GCG	AAT	A	N	185	
TT92	65535	GAA	GCG	E	A	190	
TT93	65535	GAA	AAG	E	K	190	
TT94	65535	GAA	ATG	E	M	190	
TT95	65535	GAA	CAG	E	Q	190	
TT96	65535	GAA	AGG	E	R	190	
TT97	17914	CTA	ATT	L	I	200	
TT98	18910	CTA	GTA	L	V	200	E201Y
TT99	35222	CTA	GTT	L	V	200	
TT100	38817	GAG	TAT	E	Y	201	
TT101	65535	GCG	CAT	A	H	203	
TT102	65535	GCG	CCG	A	P	203	
TT103	65535	GCG	AGG	A	R	203	
TT104	47048	ATG	CTT	M	L	207	
TT105	65535	ACC	CAT	T	H	214	
TT106	65535	ACC	AAG	T	K	214	
TT107	48095	ACC	AGG	T	R	214	
TT108	35774	ACC	TCG	T	S	214	
TT109	65535	ACC	GTT	T	V	214	
TT110	53546	GGG	GCG	G	A	215	
TT111	65535	CTG	ATT	L	I	222	
TT112	24987	GCG	TCT	A	S	225	
TT113	26618	CGG	TAT	R	Y	163	

Enzima	UMB-Palmitato	Codón original	Codón nuevo	Aminoácido original	Aminoácido nuevo	Posición del residuo de aminoácido	Mutaciones adicionales
TT114	22246	CGG	ATG	R	M	163	
TT115	42199	CGG	ACG	R	T	163	
TT116	42127	CGG	TTG	R	L	163	
TT117	33933	CGG	TGT	R	C	163	

Tabla 10

Enzima	Mutación	Palmitato				Palmitato 3 HORAS				Palmitato 24 HORAS			
		45C 24H	25C 24H	25C 48H	45C 48H	55c 3H	45C 3H	25C 3H	55C 24H	45C 24H	25C 24H		
TT41	E116I, (TTC)135(TTT)	8,0%	9%	9,4%	7,2%	9,4%	9,3%	10,7%	9,3%	7,1%	9,5%		
TT43	E116L	7,3%	7,6%	6,8%	6,5%	9,0%	9,1%	9,8%	6,3%	6,8%	8,1%		
TT44	E116N	5,9%	6,5%	5,3%	4,9%	8,9%	9,9%	10,3%	7,1%	6,4%	8,1%		
TT59	A144I	9,7%	10,1%	9,7%	9,2%	10,4%	10,3%		9,8%	9,5%	10,2%		
TT61	A144M	9,0%	9,2%	8,4%	8,4%	10,6%	10,5%	10,3%	9,8%	10,1%	9,5%		
TT62	A144V	7,4%	7,5%	6,7%		9,2%	9,7%	9,9%	7,7%	8,6%	7,6%		
TT63	E149H	9,0%	10,2%	9,5%	8,8%	10,2%	9,8%	10,7%	9,4%	8,7%	9,6%		
TT64	A150I	6,9%	7,3%	6,8%	6,5%	7,4%	7,0%	8,8%	6,6%	5,9%	6,8%		
TT118	N158D, P162G	7,5%	8,2%	6,7%		9,7%	10,2%	10,4%	8,3%	6,7%	9,1%		
TT70	P162G	8,5%	9,7%	7,9%	7,3%	9,7%	10,2%	10,9%	7,6%	6,6%	9,4%		
TT71	P162K	6,6%	8,7%	6,9%	6,3%	9,0%	9,1%	10,4%	8,2%	6,1%	7,9%		
TT113	R163Y	6,4%	7,3%	6,0%	5,6%	7,6%	7,0%	9,7%	6,4%	6,1%	6,2%		
TT84	R172H	6,3%	6,3%	5,5%	5,2%	8,1%	8,0%	9,5%	6,3%	6,9%	7,5%		
TT86	R172L	6,1%	6,8%	6,1%	5,8%	8,7%	8,6%	9,6%	6,8%	6,3%	6,9%		
TT105	T214H	6,4%	7,3%	6,1%	6,1%	8,3%	7,8%	9,5%	6,7%	7,3%	7,0%		
TT112	A225S	8,6%	9,2%	8,6%	8,1%	9,9%	9,8%	10,3%	8,9%	7,9%	8,9%		
TT7	G32P	6,1%	8,7%	8,3%	5,8%	8,6%	8,5%	9,0%	8,1%	7,1%	7,0%		
TT11	A48C	8,0%	8,2%	7,5%	7,3%	8,7%	9,3%	10,1%	6,5%	6,7%	7,5%		
TT25	R85Y	6,8%	8,7%	6,8%		7,8%	7,6%	9,9%	8,0%	6,0%	7,1%		
TT26	E95K, (GCG)92(GCT)	7,5%	8,9%	6,9%	6,8%	8,1%	7,9%	9,8%	6,7%	5,7%	7,1%		
Control negativo	negativa	10,7%	10,8%	10,8%	10,5%								

		Palmitato				Palmitato 3 HORAS			Palmitato 24 HORAS		
Enzima	Mutación	45C 24H	25C 24H	25C 48H	45C 48H	55c 3H	45C 3H	25C 3H	55C 24H	45C 24H	25C 24H
Control negativo	negativa	10,7%	10,8%	10,7%	10,6%						
Control negativo	negativa	10,8%	10,8%	10,8%	10,7%						
TT35	V104L	6,0%	7,3%	5,6%	5,7%	7,9%	7,7%	9,1%	6,3%	6,3%	6,5%
TT36	Y113L	7,1%	7,3%	6,5%	6,7%	8,9%	8,8%	9,3%	7,1%	6,9%	6,6%
TT37	E116A	8,0%	8,2%	7,3%	7,6%	9,6%	9,5%	10,2%	8,5%	7,4%	8,6%
TT38	E116C	7,1%	7,5%	5,7%	6,5%						
TT39	E116D	6,4%	6,6%	5,8%	5,9%						
TT48	E116V	6,9%	7,5%	6,2%	6,6%						
TT52	K120R	5,7%	6,0%	5,1%	6,5%						
TT56	L139M	7,6%	8,1%	6,9%	7,1%	9,9%	10,1%	9,9%	9,5%	9,5%	8,5%
TT65	A150M	6,2%	6,4%	5,6%	5,9%						
TT74	P162S	7,0%	7,0%	5,8%	6,2%						
TT116	R163L	6,3%	6,4%	5,8%	6,1%						
TT80	I167K	6,5%	6,9%	5,6%	6,4%						
TT4	D16W	6,3%	6,7%	5,7%	6,4%						
TT92	E190A	6,7%	6,7%	5,9%	5,9%						
TT95	E190Q	6,7%	6,9%	5,9%	6,3%						
TT100	E201Y	6,5%	7,4%	5,8%	6,4%						
TT101	A203H	6,2%	6,5%	5,8%	6,3%						
TT104	M207L	7,8%	7,8%	6,8%	7,4%	9,5%	9,3%	10,3%	8,7%	6,9%	7,9%
TT107	T214R	6,6%	6,9%	5,5%	6,1%						
TT109	T214V	6,3%	7,8%	5,4%	5,7%						
TT6	G32E	6,6%	6,9%	5,7%	6,5%						
TT8	L34M	6,8%	7,2%	6,2%	6,6%						

		Palmitato				Palmitato 3 HORAS			Palmitato 24 HORAS		
Enzima	Mutación	45C 24H	25C 24H	25C 48H	45C 48H	55c 3H	45C 3H	25C 3H	55C 24H	45C 24H	25C 24H
TT12	A48M	10,2%	10,8%	10,1%	10,4%						
TT14	D49N	6,7%	7,6%	5,3%	6,4%	8,5%	7,8%	8,9%	7,7%	5,4%	5,8%
TT1	Y7L	6,5%	7,2%	5,0%	6,2%						
TT120	P162S, R163F	6,6%	7,5%	6,3%	6,4%	8,7%	9,1%	10,3%	6,9%	6,6%	7,5%
Control negativo	negativa	10,6%	10,7%	10,6%	10,7%						
SEC ID NÚM:2 con D61É, R72K, y V163R											
	Original	6,1%	6,1%	4,8%	6,2%						
SEC ID NÚM:2 con D61E, R72K, y V163R											
	Original	6,0%	6,2%	5,4%	6,0%						
TT45	E116Q	5,9%	5,7%	5,6%	4,9%	8,2%	8,4%	8,4%	7,4%	7,1%	7,0%
TT47	E116T	5,7%	4,7%	5,4%	4,2%	8,0%	8,6%	8,6%	6,9%	7,9%	6,2%
TT52	K120R	6,0%	5,7%	5,6%	5,0%	8,4%	9,4%	8,8%	9,7%	8,6%	6,4%
TT57	H140R	7,1%	6,8%	6,8%	6,0%	8,8%	8,7%	9,5%	7,9%	8,2%	7,2%
TT58	N142W	10,3%	3,5%	10,3%	10,2%						
TT59	A144I	10,5%	10,2%	10,3%	9,8%						
TT60	A144L	9,1%	8,4%	8,9%	8,1%						
TT66	A150W	7,1%	6,5%	6,5%		7,3%	7,7%	9,0%	6,9%	6,1%	6,7%
TT2	A15L	7,5%	6,7%	7,1%	6,5%						
TT3	A15M	7,7%	7,3%	7,4%	7,3%						
TT115	R163T	7,1%	6,5%	6,3%	5,9%						
TT78	Q166T	5,8%	4,5%	5,5%	4,0%						
TT79	I167F	6,7%	5,4%	6,2%	4,7%	8,5%	8,7%	9,4%	8,0%	7,2%	6,2%

		Palmitato				Palmitato 3 HORAS			Palmitato 24 HORAS		
Enzima	Mutación	45C 24H	25C 24H	25C 48H	45C 48H	55c 3H	45C 3H	25C 3H	55C 24H	45C 24H	25C 24H
TT83	I167Y	5,8%	5,7%	5,2%	4,9%	8,6%	9,0%	8,6%	8,0%	9,2%	6,3%
TT89	L180R	6,1%	5,2%	5,8%	4,6%						
TT75	V183I	6,1%	5,6%	5,6%	5,0%						
TT90	A185C	7,2%	6,2%	6,9%		8,8%	8,1%	9,2%	8,3%	6,5%	6,8%
TT89	L180R	6,2%	5,4%	5,4%	4,4%						
TT108	T214S	6,6%	5,6%	5,0%		8,5%	8,5%	8,5%	7,8%	9,1%	6,2%
TT110	G215A	6,2%	6,1%	5,4%	5,1%						
TT9	L43I	6,2%	5,9%	5,5%	4,9%	8,0%	7,6%	9,2%	7,0%	5,9%	5,8%
TT15	D49R	7,9%	7,1%	8,0%		9,0%	8,6%	9,7%	8,3%	7,5%	8,6%
TT16	D49S	6,8%	5,8%	6,5%	4,7%						
TT18	S68F	6,2%	5,6%	6,1%	4,9%						
TT19	S68Y	6,5%	5,5%	7,0%	4,7%						
TT22	R85Q	6,8%	6,2%	6,3%	5,3%						
TT23	R85S	6,6%	6,0%	6,3%	5,3%						
TT24	R85T	6,9%	5,9%	6,7%	5,2%						
TT31	A96K	6,7%	5,5%	6,4%	4,8%						
SEC ID NÚM:2 con D61E, R72K, y V163R											
	Original	6,4%	5,7%	6,1%	4,7%						
TT34	K101R	6,9%	5,6%	4,4%	6,3%						
TT40	E116F	7,1%	6,4%	5,7%	6,8%						
TT46	E116S	7,1%	7,0%	5,9%	7,0%						
TT49	E116W	7,5%	7,4%	6,6%	7,6%						
TT50	E116Y	6,9%	6,6%	5,4%	6,3%						
TT53	S133A	7,2%	7,2%	6,0%	7,1%						

		Palmitato				Palmitato 3 HORAS			Palmitato 24 HORAS		
Enzima	Mutación	45C 24H	25C 24H	25C 48H	45C 48H	55c 3H	45C 3H	25C 3H	55C 24H	45C 24H	25C 24H
TT54	A136S	7,1%	6,6%	5,8%	6,9%						
TT55	G137F	7,7%	6,6%	5,6%	7,2%						
TT60	A144L	10,5%	10,0%	9,3%	9,8%						
TT68	S153G	6,9%	6,4%	5,5%	6,5%						
TT3	A15M	7,3%	6,9%	5,8%	6,9%						
TT13	A48T	7,2%	6,0%	5,1%	7,0%						
TT115	R163T	8,2%	8,1%	6,8%	7,8%						
TT73	P162S, I167L	6,4%	6,3%	5,4%	6,4%						
TT117	R163C	6,7%	6,1%	5,2%	6,4%						
TT114	R163M	8,2%	7,3%	7,2%	7,2%						
TT115	R163T	5,7%	5,1%	4,4%	5,0%						
TT113	R163Y	6,9%	6,6%	5,8%	6,6%						
TT77	Q166E	6,2%	5,8%	5,0%	6,0%						
TT81	I167L	7,1%	6,9%	6,1%	6,6%						
TT82	I167R	7,8%	7,2%	6,2%	7,2%						
TT85	R172K	6,4%	5,7%	5,0%	5,9%						
TT87	R172Y	6,5%	6,4%	5,2%	6,0%						
TT88	L180K	6,2%	6,1%	5,2%	6,7%						
TT89	L180R ,	7,2%	6,0%	5,1%	6,9%						
TT93	E190ÜK	7,3%	6,7%	5,6%	7,1%						
TT94	E190M	6,9%	6,8%	5,5%	6,0%						
TT96	E190R	6,9%	6,3%	5,4%	6,5%						
TT97	L200I	5,7%	5,7%	5,0%	5,9%						
TT5	M31I	6,8%	5,8%	5,0%	6,4%						
TT102	A203P	7,5%	6,6%	5,9%	6,8%						

		Palmitato					Palmitato 3 HORAS				Palmitato 24 HORAS			
Enzima	Mutación	45C 24H	25C 24H	25C 48H	45C 48H		55c 3H	45C 3H	25C 3H		55C 24H	45C 24H	25C 24H	
TT103	A203R	6,6%	6,2%	5,4%	6,2%									
TT5	M31I	7,4%	7,1%	6,2%	7,1%									
TT6	G32E	7,2%	6,7%	6,3%	6,4%									
TT13	A48T	7,1%	6,8%	5,8%	6,9%									
TT17	A52M	6,9%	5,7%	5,0%	6,4%									
TT1	Y7L	6,5%	6,5%	5,8%	6,6%									
TT20	R85A	7,1%	5,7%	5,1%	6,3%									
TT28	A92E	7,3%	5,8%	5,0%	6,7%									
TT27	A92V	6,9%	5,5%	4,8%	6,3%									
TT30	E95A	7,9%	5,7%	4,9%	7,2%									
TT29	E95D	7,6%	5,6%	5,0%	6,9%									
TT32	A96R	6,7%	6,6%	5,8%	6,2%									
TT33	A97S	7,4%	5,4%	4,8%	6,7%									
TT114	R163M	7,2%	5,8%	5,8%	7,6%		7,5%	7,0%	8,9%		6,0%	7,2%	5,8%	
TT116	R163L	7,0%	5,9%	5,1%	7,2%		8,1%	7,4%	9,4%		7,8%	7,0%	5,9%	

Un cambio de codón en un residuo determinado que no resulta en un cambio de aminoácidos se denomina mutación silenciosa. Las mutaciones silenciosas se obtienen como hits debido al aumento de expresión en relación a la enzima parental, y se observaron en 37 sitios en el estudio GSSM (Tabla 11 a continuación)

Tabla 11

codón original	codón nuevo	aminoácido	aminoácido	Sitio del aminoácido
GCG	GCT	A	A	35
GGC	GGT	G	G	37
CTG	CTT	L	L	41
GGC	GGA	G	G	45
GCC	GCT	A	A	52
CGG	CGA	R	R	89
GCC	GCT	A	A	97
GTG	GTT	V	V	102
AGC	AGT	S	S	108
CTC	TTG	L	L	109
GCG	GCT	A	A	114
CGC	CGG	R	R	115
CTG	CTT	L	L	117
CTG	TTG	L	L	124
CGG	AGG	R	R	126
GTC	GTG	V	V	128
GTC	GTG	V	v	129
AGT	TCT	S	S	133
GGC	GGT	G	G	137
GAC	GAT	D	D	138
CTC	CTT	L	L	139
AAC	AAT	N	N	142
CGC	AGG	R	R	172
GTG	GTT	V	V	183
ACC	ACG	T	T	188
TCG	AGT	S	S	192
CCC	CCT	P	P	193
CTG	CTT	L	L	202
GCG	GCT	A	A	203
ACC	ACT	T	T	205
CAC	CAT	H	H	206
GGC	GGT	G	G	208
TCG	TCT	S	S	212
CTG	CTT	L	L	222
GTC	GTG	V	V	223
CGG	AGG	R	R	226

codón original	codón nuevo	aminoácido	aminoácido	Sitio del aminoácido
CTC	TTG	L	L	227

Ejemplo 10: Evolución ilustrativa para tolerancia térmica de palmitasa usando tecnología TMCASM

5 Las mutaciones de mejor desempeño identificadas durante la evolución GSSM (Ejemplo 9, arriba) se evaluaron en ensayos de aceite primarios y secundarios para inclusión en evolución TMCA. Se efectuaron ensayos de 5 g de aceite en bruto, como se describió en el Ejemplo 5, pero con 10% contenido de agua, con los 117 hits únicos a 25°C y 45°C. El perfil del aceite se evaluó después de 24 y 48 horas de reacción. Los hits primarios se sometieron a ensayos de aceite secundarios a 25°C, 45°C y 55°C. Se extrajeron alícuotas a 3, 24 y 48 horas para evaluar los perfiles del aceite. Los que mejor se desempeñaron se enumeran en la Tabla 12 a continuación, donde el palmitato que permaneció en el aceite se enumera como un porcentaje de los ácidos grasos unidos totales. Para evaluar el impacto de un refinamiento cáustico intermedio, los ensayos a 45°C se refinaron en forma cáustica por adición de 10 11% NaOH (estimado para 7% FFA) y se calentó con agitación continua a 60°C. Se añadió enzima nueva al aceite refinado a 20% contenido de agua, se homogeneizó, y la reacción del aceite procedió con agitación durante otras 24 horas a 45°C. El contenido de palmitato final en las muestras refinadas cáusticas se expone en la última columna, "CR24H".

15 De los que tuvieron los mejores desempeños que se muestran en la Tabla 12, 15 mutantes (que se muestran en cursiva y en negrilla en la Tabla 12) se seleccionaron para combinación usando tecnología TMCA. La genoteca de TMCA se construyó como se describe en la publicación PCT número WO 2009/018449 y como se describe a continuación. Esta genoteca comprendió 9216 variantes únicas.

Tabla 12

		Palmitato				Palmitato 3 HORAS			Palmitato 24 HORAS			Palmitato 48 HORAS			
Enzima	Mutaciones	45C 24H	25C 24H	25C 48H	45C 48H	55C 3H	45C 3H	25C 3H	55C 24H	45C 24H	25C 24H	55C 48H	45C 48H	25C 48H	CR 24H
TT11	A48C	8,0%	8,2%	7,5%	7,3%	8,7%	9,3%	10,1%	6,5%	6,7%	7,5%	6,7%	6,6%	6,8%	5,3%
TT41, (TTC)135(TTT)	E116I,	8,0%	9,9%	9,4%	7,2%	9,4%	9,3%	10,7%	9,3%	7,1%	9,5%	9,1%	6,5%	9,1%	5,6%
TT43	E116L	7,3%	7,6%	6,8%	6,5%	9,0%	9,1%	9,8%	6,3%	6,8%	8,1%	6,2%	6,0%	6,8%	4,8%
TT44	E116N	5,9%	6,5%	5,3%	4,9%	8,9%	9,9%	10,3%	7,1%	6,4%	8,1%	6,5%	5,6%	7,2%	4,4%
TT70	P162G	8,5%	9,7%	7,9%	7,3%	9,7%	10,2%	10,9%	7,6%	6,6%	9,4%	6,7%	5,6%	8,4%	4,7%
TT84	R172H	6,3%	6,3%	5,5%	5,2%	8,1%	8,0%	9,5%	6,3%	6,9%	7,5%	6,8%	6,4%	6,7%	6,1%
TT64	A150I	6,9%	7,3%	6,8%	6,5%	7,4%	7,0%	8,8%	6,6%	5,9%	6,8%	6,8%	5,4%	6,0%	5,2%
TT63	E149H	9,0%	10,2%	9,5%	8,8%	10,2%	9,8%	10,7%	9,4%	8,7%	9,6%	9,4%	8,7%	9,6%	8,2%
TT26 (GCG)92(GCT)	E95K,	7,5%	8,9%	6,9%	6,8%	8,1%	7,9%	9,8%	6,7%	5,7%	7,1%	6,9%	5,1%	6,4%	4,7%
TT71	P162K	6,6%	8,7%	6,9%	6,3%	9,0%	9,1%	10,4%	8,2%	6,1%	7,9%	7,6%	5,3%	6,7%	4,5%
TT86	R172L	6,1%	6,8%	6,1%	5,8%	8,7%	8,6%	9,6%	6,8%	6,3%	6,9%	6,7%	6,4%	6,3%	5,1%
TT25	R8SY	6,8%	8,7%	6,8%		7,8%	7,6%	9,9%	8,0%	6,0%	7,1%	8,2%	6,7%	6,7%	6,3%
TT118 N1580, P162G		7,5%	8,2%	6,7%		9,7%	10,2%	10,4%	8,3%	6,7%	9,1%	9,2%	6,1%	7,6%	
7759	A144I	9,7%	10,1%	9,7%	9,2%	10,4%	10,3%		9,8%	9,5%	10,2%	9,9%	9,6%	10,3%	9,1%
TT112	A225S	8,6%	9,2%	8,6%	8,1%	9,9%	9,8%	10,3%	8,9%	7,9%	8,9%	9,5%	7,5%	8,6%	6,1%
TT15	D49R	7,9%	7,1%	8,0%		9,0%	8,6%	9,7%	8,3%	7,5%	8,6%	8,9%	7,4%	8,8%	8,2%
TT14	049N	6,7%	7,6%	5,3%	6,4%	8,5%	7,8%	8,9%	7,7%	5,4%	5,8%	7,9%	5,5%	5,6%	4,8%
TT62	A144V	7,4%	7,5%	6,7%		9,2%	9,7%	9,9%	7,7%	8,6%	7,6%	7,6%	8,7%	7,4%	6,8%
TT105	T214H	6,4%	7,3%	-6,1%	6,1%	8,3%	7,8%	9,5%	6,7%	7,3%	7,0%	6,3%	6,8%	5,7%	4,8%
TT61	A144M	9,0%	9,2%	8,4%	8,4%	10,6%	10,5%	10,3%	9,8%	10,1%	9,5%	9,0%	9,7%	8,6%	
TT113	R163Y	6,4%	7,3%	6,0%	5,6%	7,6%	7,0%	9,7%	6,4%	6,1%	6,2%	6,5%	5,9%	5,5%	5,3%
TT7	G32P	6,1%	8,7%	8,3%	5,8%	8,6%	8,5%	9,0%	8,1%	7,1%	7,0%	7,6%	6,8%	6,5%	

		Palmitato				Palmitato 3 HORAS			Palmitato 24 HORAS			Palmitato 48 HORAS			
Enzima	Mutaciones	45C 24H	25C 24H	25C 48H	45C 48H	55C 3H	45C 3H	25C 3H	55C 24H	45C 24H	25C 24H	55C 48H	45C 48H	25C 48H	CR 24H
TT120	P162S, R163F	6,6%	7,5%	6,3%	6,4%	8,7%	9,1%	10,3%	6,9%	6,6%	7,5%				
TT37	E116A	8,0%	8,2%	7,3%	7,6%	9,6%	9,5%	10,2%	8,5%	7,4%	8,6%				

Tecnología personalizada de ensamblaje combinatorio de múltiples sitios (Tailored Multi-Site Combinatorial Assembly o TMCA), La tecnología TMCA (véase publicación PCT núm. WO 09/018449) comprende un método para producir una pluralidad de polinucleótidos de descendencia que tienen diferentes combinaciones de diversas mutaciones en múltiples sitios. El método se puede implementar, en parte, por una combinación de por lo menos una o más de las siguientes etapas:

Obteniendo información de la secuencia de un polinucleótido ("primero" o "molde"). Por ejemplo, la primera secuencia o secuencia molde puede ser una secuencia de tipo salvaje (p. ej., la SEC ID NÚM:2 con mutaciones D61E, R72K y V163R) o una secuencia mutada. La información de la secuencia puede ser del polinucleótido completo (p. ej., un gen o un marco de lectura abierto) o de regiones parciales de interés, como una secuencia que codifica un sitio para unión, especificidad de unión, catálisis o especificidad de sustrato.

Identificar tres o más mutaciones de interés a lo largo de la primera secuencia o la secuencia molde del polinucleótido. Por ejemplo, las mutaciones pueden estar en 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 20 o más posiciones dentro de la primera secuencia o secuencia molde. Las posiciones se pueden determinar por posición absoluta o por el contexto de los residuos circundantes, o por homología. Por ejemplo, para TMCA de polipéptidos de palmitasa, los principales cambios de aminoácidos termotolerantes que resultaron en un mejor desempeño enzimático se incluyeron como mutaciones de interés. Las secuencias que flanquean las posiciones de mutación en cualquiera de los lados pueden ser desconocidas. Cada posición de mutación puede contener dos o más mutaciones, tal como diferentes aminoácidos. Dichas mutaciones se pueden identificar usando tecnología Gene Site Saturation MutagenesisSM (GSSMSM), como se describe en este documento y en, p. ej., las patentes de Estados Unidos núm. 6.171.820; 6.562.594 y 6.764.835.

Proporcionando cebadores (p. ej., oligonucleótidos sintéticos) que comprenden las mutaciones de interés. Se provee un cebado para cada mutación de interés.

Por consiguiente, un cebador polinucleótido o polinucleótido de molde que tiene 3 mutaciones de interés puede usar 3 cebadores en esa posición. El cebador puede también ser provisto como una herramienta de cebadores que contienen una posición degenerada de modo que la mutación de interés esté en el intervalo de cualquier nucleótido o aminoácido natural, o en un subconjunto de ese intervalo. Por ejemplo, se puede proporcionar una combinación de cebadores que favorezca mutaciones para residuos de aminoácidos alifáticos. Los cebadores se pueden preparar como cebadores directos o inversos, o los cebadores se pueden preparar como por lo menos un cebador directo y por lo menos un cebador inverso. Cuando las mutaciones están posicionadas muy juntas unas de otras, puede ser conveniente usar cebadores que contengan mutaciones para más de una posición o diferentes combinaciones de mutaciones en múltiples posiciones.

Proporcionar un polinucleótido que contiene la secuencia de molde. El primer polinucleótido o polinucleótido molde puede ser circular o puede ser superenrollado, tal como un plásmido o vector para clonación, secuenciación o expresión. El polinucleótido puede ser monocatenario ("ssDNA") o puede ser bicatenario ("dsDNA"). Por ejemplo, el método TCMA somete el molde de dsDNA superenrollado ("sc") a una etapa de calentamiento a 95°C durante 1 min (véase Levy, Nucleic Acid Res., 28(12):e57(i-vii) (2000)).

Añadir los cebadores al polinucleótido molde en una mezcla de reacción. Los cebadores y el polinucleótido molde se combinan bajo condiciones que permiten que los cebadores se anelen al polinucleótido molde. En el protocolo de TMCA, los cebadores se añaden al polinucleótido en una mezcla de reacción individual, pero pueden añadirse en múltiples reacciones.

Efectuar una reacción o reacciones de extensión de polimerasa. Los productos de extensión (p. ej., una "descendencia" o "polinucleótido extendido modificado") pueden ampliarse con métodos convencionales. Los productos se pueden analizar para longitud, secuencia, propiedades deseadas de ácido nucleico, o expresarse como polipéptidos. Otros métodos de análisis incluyen hibridación *in situ*, detección de secuencias o detección de expresión. Los análisis pueden incluir una o más tandas de detección y selección de una propiedad deseada.

Los productos también pueden transformarse en una célula u otro sistema de expresión, tal como un sistema libre de células. El sistema libre de células puede contener enzimas relacionadas con la replicación, reparación, recombinación, transcripción o traducción de DNA. Los hospedantes ilustrativos incluyen células y líneas celulares bacterianas, de levadura, vegetales y animales, e incluyen *E. coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pichia pastoris* y *Aspergillus niger*. Por ejemplo, se pueden usar cepas XL1-Blue o Stb12 de *E. coli* como hospedantes.

El método se puede usar con los mismos cebadores o con cebadores diferentes bajo condiciones de reacción diferentes para promover productos que tengan distintas combinaciones o números de mutaciones.

Poniendo en práctica el método ilustrativo anteriormente descrito, este protocolo también proporciona uno o más polinucleótidos producidos por este método de evolución TMCA, que puede luego detectarse o seleccionarse para una propiedad deseada. Uno o más polinucleótidos de descendencia pueden expresarse como polipéptidos, y opcionalmente detectarse o seleccionarse para una propiedad deseada. Por lo tanto, esta realización del protocolo de evolución TMCA provee polinucleótidos y los polipéptidos codificados, como también genotecas de dichos polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos. Esta realización del protocolo de evolución TMCA también

proporciona la detección de genotecas detectando o seleccionando la genoteca para obtener uno o más polinucleótidos que codifican uno o más polipéptidos que tienen la actividad deseada.

El protocolo de evolución TMCA descrito en la publicación PCT núm. WO 2009/018449 comprende un método para producir una pluralidad de polinucleótidos modificados. Dichos métodos en general incluyen (a) añadir por lo menos tres cebadores a un polinucleótido molde bicatenario en una mezcla de reacción individual, en donde los por lo menos tres cebadores no se superponen, y en donde cada uno de los por lo menos tres cebadores comprende por lo menos una mutación diferente de los otros cebadores, en donde por lo menos un cebador es un cebador directo que puede anelarse a una cadena menos del molde y por lo menos un cebador es un cebador inverso que puede anelarse a una cadena más del molde, y (b) someter la mezcla de reacción a una reacción de extensión de polimerasa para producir una pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos de los por lo menos tres cebadores.

El protocolo de evolución TMCA descrito en la publicación PCT núm. WO 2009/018449 comprende un método en donde una célula es transformada con la pluralidad de productos extendidos que no han sido tratados con una ligasa. La pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos se recupera de la célula. La pluralidad recuperada de polinucleótidos modificados extendidos se analiza, por ejemplo, expresando por lo menos uno de la pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos y analizando el polipéptido expresado a partir de allí. Se selecciona la pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos que comprende las mutaciones de interés. Con el protocolo de evolución TMCA, se obtiene la información de la secuencia respecto del polinucleótido molde, y se pueden identificar tres o más mutaciones de interés en el polinucleótido molde. Los productos obtenidos por la extensión de polimerasa se pueden analizar antes de transformar la pluralidad de productos modificados extendidos en una célula.

En el protocolo de evolución de TMCA, los productos obtenidos por extensión de polimerasa se tratan con una enzima, p. ej., una enzima de restricción, tal como una enzima de restricción DpnI, destruyendo así la secuencia del polinucleótido molde. Los productos tratados se pueden transformar en una célula, p. ej., una célula de *E. coli*.

En el protocolo de evolución TMCA, se pueden usar por lo menos dos, o por lo menos tres, o por lo menos cuatro, o por lo menos cinco, o por lo menos seis, o por lo menos siete, o por lo menos ocho, o por lo menos nueve, o por lo menos diez, o por lo menos once o por lo menos doce, o más cebadores. Cada cebador comprende una mutación puntual individual. Los dos cebadores directos o los dos cebadores inversos comprenden un cambio distinto en la misma posición del polinucleótido molde. Por lo menos un cebador comprende por lo menos dos cambios en diferentes posiciones del polinucleótido molde. Incluso en otra realización, por lo menos un cebador comprende por lo menos dos cambios en diferentes posiciones, y por lo menos dos cebadores directos o inversos comprenden un cambio distinto en la misma posición del polinucleótido molde.

En el protocolo de evolución TMCA, los cebadores directos están agrupados en un grupo directo y los cebadores inversos están agrupados en un grupo inverso, y los cebadores del grupo directo y los cebadores del grupo inverso, independientes unos de otros, están normalizados para tener igual concentración en el correspondiente grupo, más allá de las posiciones en el polinucleótido molde, y donde después de la normalización, una cantidad equivalente de los cebadores directos e inversos se añade a la reacción. En este método de normalización, una combinación de algunas posiciones puede sesgarse. El sesgo puede deberse a, por ejemplo, una concentración de cebador relativamente baja en una posición que contiene un cebador en comparación con una posición que contiene múltiples cebadores. "Sesgo de posición" se refiere a los polinucleótidos resultantes que exhiben una fuerte preferencia por la incorporación de cebadores en una sola posición en relación con otras posiciones dentro de su grupo de cebadores directos o inversos. Esto resulta en una combinación de polinucleótidos modificados que pueden tener un alto porcentaje de mutaciones dentro de una sola posición de cebador pero un bajo porcentaje de mutaciones en otra posición dentro de su grupo de cebadores directos o inversos. Este sesgo es desfavorable cuando la meta del TMCA es generar polinucleótidos de descendencia que comprenden todas las combinaciones posibles de cambios al molde. El sesgo se puede corregir, por ejemplo, normalizando los cebadores como una combinación en cada posición para que sean equivalentes.

En el protocolo de evolución TMCA, la normalización del cebador se realiza organizando los cebadores en múltiples grupos dependiendo de su localización en el polinucleótido molde, en donde los cebadores que cubren la misma región seleccionada del molde están en un grupo; normalizando los cebadores agrupados dentro de cada grupo para concentración equivalente; mezclando los cebadores directos dentro de un grupo en un grupo directo y normalizando la concentración entre cada grupo de cebadores directos para que sea equivalente; mezclando los cebadores inversos dentro de un grupo en un grupo inverso y normalizando la concentración entre cada grupo de cebadores inversos para que sea equivalente; y añadir una cantidad equivalente de los cebadores inversos y directos mezclados a la reacción. No se ha observado ningún sesgo para combinaciones de posiciones.

En el protocolo de evolución TMCA, un conjunto de cebadores degenerados comprenden cada uno una posición degenerada, en donde la mutación de interés es una gama de distintos nucleótidos en la posición degenerada. Se provee un conjunto de cebadores degenerados que comprende por lo menos un codón degenerado correspondiente a por lo menos un codón del polinucleótido molde y por lo menos una secuencia adyacente que es homóloga a una secuencia adyacente al codón de la secuencia del polinucleótido molde. El codón degenerado es N,N,N y codifica cualquiera de los 20 aminoácidos naturales. El codón degenerado codifica menos de los 20 aminoácidos naturales.

El protocolo de evolución TMCA descrito en la publicación PCT núm. WO 2009/018449 comprende un método para producir una pluralidad de polinucleótidos modificados que comprenden mutaciones de interés. Dichos métodos en general incluyen (a) añadir por lo menos dos cebadores a un polinucleótido molde bicatenario en una mezcla de reacción individual, en donde por lo menos dos cebadores no se superponen, y donde cada uno de los dos cebadores comprende por lo menos una mutación diferente de los otros cebador(es), en donde por lo menos un cebador es un cebador directo que puede anelarse a una cadena menos del molde y por lo menos un cebador es un cebador inverso que puede anelarse a una cadena más del molde, (b) someter la mezcla de reacción a una reacción de extensión de polimerasa para producir una pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos de los por lo menos dos cebadores, (c) tratar la pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos con una enzima, destruyendo así el polinucleótido molde, (d) transformar en una célula los polinucleótidos modificados extendidos tratados que no han sido tratados con una ligasa, (e) recuperar la pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos de la célula, y (f) seleccionar la pluralidad de polinucleótidos modificados extendidos que comprenden las mutaciones de interés.

En este ejemplo, las 15 mutaciones seleccionadas para inclusión en la genoteca de TMCA termotolerante se muestran en la Tabla 13 a continuación. Se usaron seis moldes de DNA: SEC ID NÚM:2 con mutaciones D61E, R72K y V163R (original), original con mutación E95K, original con mutación P162G, original con mutación P162K, original con mutación E95K y mutación P162G, y original con mutaciones E95K y P162K. Los plásmidos del original con mutación E95K, original con mutación P162G, original con mutación P162K se sometieron a un pasaje a través de células de *E. coli* XL 1 Blue competentes al metilato de DNA. Se efectuaron seis evoluciones TMCA separadas, una para cada uno de los seis moldes en combinación con los oligos enumerados en la Tabla 14 a continuación.

Tabla 13

MUTACIÓN	CODÓN NUEVO
A48C	TGT
D49R	CGT
R85Y	TAT
E95K	AAG
E116I	ATT
E116L	CTT
E116N	AAT
A144I	ATT
E149H	CAT
A150I	ATT
P162G	GGT
P162K	AAG
R172H	CAT
R172L	CTT
A225S	TCT

Tabla 14

Nombre del oligo	Secuencia del oligo -5'- 3'
A144I-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATCGCCTCGTAGATCTTCCAAATATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEC ID NÚM:24)
A144I-A150I-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATAATCTCGTAGATCTTCCAAATATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEC ID NÚM:25)
A144I-E149H-A150I-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATAAATATGGTAGATCTTCCAAATATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEC ID NÚM:26)
A144I-E149H-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATCGCATGGTAGATCTTCCAAATATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEC ID NÚM:27)
A150I-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATAATCTCGTAGATCTTCCACGCATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEC ID NÚM:28)
A225S-R	TTGGGCTCGAGTCAGAGCCGAGACGCGACCCAGCCGGACCACAG (SEC ID NÚM:29)
A48C-D49R-F	TGGTGCTGCCCCGGCTTCTGTGTGACGCAACGCCACCTCGGTGCT (SEC ID NÚM:30)
A48C-F	TGGTGCTGCCCCGGCTTCTGTGTGACGCAACGCCACCTCGGTGCT (SEC ID NÚM:31)
D49R-F	TGGTGCTGCCCCGGCTTCTGGCCCCGTGACAACGCCACCTCGGTGCT (SEC ID NÚM:32)
E116I-F	TCGGCGGCCCTCTATGCGCGCATTTCTGGGCCACAAGCGCCCCGA (SEC ID NÚM:33)
E116L-F	TCGGCGGCCCTCTATGCGCGCGTTCTGGGCCACAAGCGCCCCGA (SEC ID NÚM:34)
E116N-F	TCGGCGGCCCTCTATGCGCGCAATCTGGGCCACAAGCGCCCCGA (SEC ID NÚM:35)
E149H-A150I-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATAAATATGGTAGATCTTCCACGCATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEC ID NÚM:36)
E149H-R	TCGACCGTGTGGCTGTTGATCGCATGGTAGATCTTCCACGCATGGTTGGCGTGGAGGTCGC (SEC ID NÚM:37)
R172H-R	GGCGACCACACCGCGATGGTATGCACCGGGGGCTTAATCTGGA (SEC ID NÚM:38)
R172L-R	GGCGACCACACCGCGATGGTAAGCACCGGGGGCTTAATCTGGA (SEC ID NÚM:39)
R85Y-F	TTCGTGCGGACCTCGTGGACTATCTGGTCGACCGGCTGCGGGC (SEC ID NÚM:40)

Se ampliaron miembros de la genoteca en el vector pDOW-kan, se analizaron por gel de agarosa y se trataron con DPNI. Las muestras se transformaron luego en células competentes XLIBLue de *E. coli*. Las colonias se recogieron, se desarrollaron y se secuenciaron. Los resultados de la secuenciación indicaron que la mutación E116L y las mutaciones en los aminoácidos 144, 149 y 150 estaban sub-representadas en comparación con el máximo teórico.

En consecuencia, se creó otra genoteca de TMCA usando una mezcla normalizada de los seis moldes. Las reacciones de TMCA se repitieron usando los oligos enumerados en la Tabla 14, excepto aquellos para las mutaciones E116I y E116N mutaciones. Se duplicó la cantidad de cebadores utilizados para la mutación E116L y para la región 4 (aminoácidos 144, 149 y 150). Las muestras se ampliaron en el vector pDOW-kan, se analizaron por gel de agarosa y se trataron con DPNI. El DNA de muestra se transformó en células competentes XLIBLue de *E. coli*. Las colonias se recogieron, se desarrollaron y se secuenciaron. La incorporación de mutaciones en los aminoácidos 144, 149 y 150 mejoró pero E116L todavía estuvo sub-representado en comparación con el máximo teórico. El DNA de ambas genotecas se transformó en células competentes XLIBLue de *E. coli*. Las colonias se combinaron y se preparó DNA usando el kit Qiagen mini-prep. El DNA se usó luego para transformar células competentes de *Pseudomonas fluorescens*. Las células se desarrollaron en medio LB enriquecido con uracilo (750 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Se obtuvo un número suficiente de colonias para muestrear en exceso la genoteca en 10 veces. La genoteca se muestreó en exceso en 10 veces para representar la sub-representación de E116L.

La genoteca de TMCA termotolerante resultante se desarrolló en medio mínimo M9 enriquecido con uracilo (750 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml) y se estudió usando el estudio HTP descrito anteriormente en el Ejemplo. La genoteca se incubó a 60°C durante 30 minutos antes y después de la adición de UMB-Palmitato. Se leyeron luego las placas de 384 pocillos con excitación a 365nm y emisión a 460nm. Cada placa se enfrió rápidamente por centrifugación y el espectrofotómetro se precalentó para minimizar artefactos en las lecturas. Se exponen los valores de fluorescencia de cada una de las placas de 384 pocillos. Los hits se identificaron como aquellos que tienen >2 desviaciones estándar encima del control positivo (mutación individual E116L). Un estudio HTP secundario ensayó los hits HTP primarios a dos temperaturas: 60°C y 63 °C. Los hits secundarios se definieron como >4 desviaciones estándar encima del control positivo promedio en la placa de 63 °C y reteniendo >50% de actividad entre 60°C y 63°C.

Se identificaron 318 hits HTP secundarios únicos de la secuencia. Estos hits contienen entre 2 y 9 mutaciones. Se efectuaron ensayos de 5 g de aceite en bruto estándar (como se describió en el Ejemplo 5) con lisados clarificados de los 318 hits. De los 318 hits HTP secundarios, aquellos que redujeron el palmitato más eficazmente a temperaturas elevadas (45°C o 60°C) que a 25°C en el ensayo de aceite, se escogieron como "hits de aceite" de tolerancia térmica. Se identificaron 57 hits de aceite de tolerancia térmica primarios y se caracterizaron por ensayos de aceite adicionales (véanse las Tablas 15 y 16 a continuación). Se efectuaron otros ensayos en 5 g de aceite y se identificaron 9 hits de aceite que tuvieron perfiles de desempeño de temperatura preferida además de niveles de actividad total variables (véase la Tabla 17 a continuación).

Tabla 15

Hit termo- tolerante núm.											Palmitato 24h			Palmitato 48h		
	48	85	9S	116	144	149	150	162	172	225	25°C	45°C	60°C	25°C	45°C	60°C
12	A48C			E116I	A144I	E149H	A150I				8,1%	7,5%	9,6%	7,3%	7,1%	9,5%
16	A48C			E116I					R172H	A225S	10,4%	9,5%	10,4%	9,7%	9,1%	10,6%
17	A48C								R172H	A225S	7,3%	7,4%	10,2%	6,4%	6,8%	10,2%
29*		R85Y							R172H		5,0%	5,8%	6,3%	4,3%	6,3%	6,7%
38	A48C	R85Y	E95K	E116L					R172H	A225S	9,9%	7,8%	9,9%	8,7%	7,1%	9,8%
40*	A48C	R85Y	E95K					P162G	R172H	A225S	10,0%	9,1%	8,8%	9,7%	8,4%	9,3%
41*	A48C	R85Y	E95K					P162G	R172H		10,1%	8,4%	8,7%	9,8%	8,8%	8,6%
53	A48C	R85Y		E116I				P162K	R172H	A225S	10,0%	9,1%	8,1%	9,7%	8,6%	7,7%
64		R85Y		E116L				P162G		A225S	7,5%	6,7%	10,2%	6,3%	6,0%	10,1%
66								P162G	R172H	A225S	9,6%	9,4%	10,5%	8,3%	8,8%	10,6%
74*		R85Y	E95K	E116L					R172H	A225S	5,5%	6,2%	6,3%	4,9%	5,7%	6,5%
77	A48C		E95K				A150I	P162G	R172H	A225S	10,0%	9,0%	10,5%	9,7%	9,0%	10,6%
81	A48C	R85Y		E116L				P162G	R172H	A225S	10,2%	8,9%	7,4%	9,4%	8,3%	7,2%
88			E95K					P162G	R172H	A225S	8,2%	7,4%	8,0%	7,2%	6,8%	10,6%
89		R85Y						P162G	R172H	A225S	9,2%	7,9%	7,6%	8,1%	7,5%	7,6%
94	A48C	R85Y	E95K	E116L					R172H	A225S	10,5%	10,1%	10,8%	10,3%	9,9%	10,9%
104	A48C	R85Y		E116I	A144I			P162K			10,7%	10,5%	10,6%	10,7%	10,6%	10,7%
105	A48C	R85Y		E116L			A150I		R172H	A225S	6,6%	9,1%	9,0%	10,0%	8,9%	8,8%
108	A48C			E116L				P162G	R172H	A225S	9,2%	7,8%	10,4%	8,6%	7,2%	10,5%
109	A48C	R85Y	E95K	E116L				P162G	R172H	A225S	10,0%	10,3%	8,4%	9,6%	10,0%	7,8%
114		R85Y	E95K					P162G	R172H	A225S	9,5%	9,1%	8,4%	8,5%	8,7%	8,4%
118		R85Y						P162G	R172H		9,7%	8,7%	8,1%	8,9%	8,3%	7,9%

Hit termo- tolerante num.											Palmitato 24h			Palmitato 48h		
	48	85	9S	116	144	149	150	162	172	225	25°C	45°C	60°C	25°C	45°C	60°C
134	A48C							P162G	R172H	A225S	10,3%	9,4%	9,2%	10,3%	9,0%	9,2%
135		R85Y						P162K	R172H		6,8%	7,0%	9,6%	6,0%	7,0%	9,4%
136	A48C							P162K	R172H		9,2%	8,1%	8,0%	8,7%	8,1%	7,6%
155								P162K	R172H	A225S	9,5%	8,6%	10,5%	8,5%	8,1%	10,5%
161		R85Y	E95K	E116N	A144I						9,8%	9,6%	9,8%	9,7%	11,6%	9,7%
184	A48C		E95K	E116N	A144I		A150I				10,5%	10,4%	10,4%	10,5%	10,5%	10,4%
202				E116N				P162G	R172H		8,8%	7,4%	8,2%	8,1%	6,9%	8,0%
204		R85Y		E116I				P162G	R172H		9,4%	8,3%	6,7%	8,8%	7,4%	7,1%
211	A48C	R85Y		E116L				P162G	R172H		9,6%	8,9%	8,7%	8,6%	8,3%	8,5%
215	A48C			E116I				P162G	R172L	A225S	10,4%	10,1%	10,3%	10,5%	10,0%	10,0%
216		R85Y						P162G	R172H	A225S	9,7%	9,6%	8,9%	9,0%	8,0%	8,8%
229	A48C	R85Y						P162G	R172L	A225S	10,3%	9,8%	10,1%	10,0%	9,7%	10,1%
235	A48C			E116I				P162G	R172L		10,3%	10,0%	10,3%	10,0%	9,3%	10,4%
236	A48C							P162G			10,1%	9,7%	9,7%	10,1%	9,3%	9,6%
238		R85Y		E116N				P162G	R172H	A225S	9,2%	7,6%	7,6%	8,3%	6,9%	7,6%
239	A48C							P162G			10,2%	8,8%	10,1%	9,8%	7,8%	10,3%
241				E116L				P162G	R172L	A225S		7,4%	10,2%	6,5%	6,6%	10,3%
243				E116I				P162G		A225S	9,2%	7,5%	10,3%	8,2%	6,8%	10,4%
244		R85Y						P162G			10,1%	7,6%	7,8%	9,6%	6,9%	8,0%
246	A48C	R85Y	E95K	E116I				P162G	R172H		10,2%	9,7%	10,6%	9,7%	9,7%	10,5%
247		R85Y	E95K	E116I				P162G		A225S	10,1%	7,8%	10,0%	9,8%	7,0%	10,1%
248		R85Y	E95K					P162G	R172H		9,6%	8,7%	9,8%	8,6%	7,9%	9,9%
257			E95K					P162G	R172H		8,7%	8,0%	9,5%	7,2%	7,4%	9,4%

Hit termo- tolerante núm.											Palmitato 24h			Palmitato 48h		
	48	85	9S	116	144	149	150	162	172	225	25°C	45°C	60°C	25°C	45°C	60°C
263											10,3%	9,9%	9,8%	10,1%	10,0%	9,7%
269			E95K	E116I				P162G	R172L	A225S	9,5%	8,6%	10,5%	9,1%	8,0%	10,6%
274		R85Y	E95K					P162G	R172L		10,1%	9,4%	10,5%	10,5%	9,0%	10,5%
278	A48C			E116L					R172H	A225S	10,1%	9,2%	10,4%	10,2%	9,1%	10,4%
282	A48C	R85Y		E116N	A144I				R172H	A225S	10,6%	10,6%	10,5%	10,6%	10,5%	10,4%
284	A48C		E95K	E116I	A144I	E149H			R172H	A225S	10,6%	10,6%	10,5%	10,6%	10,5%	10,5%
286				E116I	A144I				R172H		10,5%	10,5%	10,2%	10,4%	10,4%	10,0%
288		R85Y			A144I		A150t				10,4%	10,4%	9,9%	10,3%	10,1%	9,8%
292	A48C			E116N	A144I		A150I		R172H		10,5%	10,6%	10,0%	10,2%	10,9%	9,8%
296	A48C			E116N	A144I	E149H	A150I		R172H		10,6%	10,6%	10,6%	10,6%	10,6%	10,5%
297	A48C	R85Y		E116I							10,3%	9,8%	10,5%	10,2%	9,7%	10,5%
298		R85Y		E116N					R172H		8,6%	7,8%	10,2%	7,9%	7,3%	10,2%
Los hits termotolerantes 29, 40, 41 y 74 también contienen mutaciones adicionales (véanse las mutaciones adicionales mencionadas en la Tabla 16, a continuación.																

Tabla 16: Mutaciones adicionales también contenidas en los hits termotolerantes 29, 40, 41 y 74

Hit termo- tolerante núm.	codón antiguo	codón nuevo	aminoácido antiguo	aminoácido nuevo	posición del aminoácido
29	GTG	ATG	V	M	83
40	GCG	GCT	A	A	92
41	GCG	GOT	A	A	92
74	GCG	GCT	A	A	92

Tabla 17

Enzima		Palmitato 3h			Palmitato 24h			Palmitato 48h	
	25°C-	45°C	60°C	25°C	45°C	60°C	25C	45C	60C
Negativa	10,7%	10,6%	10,7%	10,6%	10,5%	10,6%	10,6%	10,5%	10,6%
Original	7,8%	7,3%	10,3%	5,4%	6,2%	10,3%		5,9%	10,3%
29	8,1%	6,5%	9,1%	4,9%	5,7%	8,8%	4,2%	5,9%	8,9%
40	10,5%	10,3%	10,0%	10,0%	9,1%	8,8%	9,7%	8,4%	9,3%
41	10,5%	10,3%	9,9%	10,1%	8,4%	8,7%	9,8%	8,8%	8,6%
74	9,2%	8,0%	9,9%	6,2%	6,1%	9,8%	5,1%	6,1%	9,8%
81	10,3%	9,8%	9,3%	9,5%	8,1%	8,0%	8,2%	7,4%	7,9%
202	10,2%	9,4%	10,5%	9,3%	7,4%	10,4%	8,5%	7,2%	10,4%
204	10,5%	10,1%	9,7%	10,0%	9,0%	8,7%	9,4%	8,6%	8,5%
238	10,4%	9,8%	9,5%	9,8%	7,7%	9,0%	8,5%	7,6%	8,9%
244	10,3%	9,6%	10,4%	9,5%	8,0%	10,2%	8,3%	7,5%	10,2%

Ejemplo 11: Evolución ilustrativa para expresión mejorada de palmitasa usando tecnología TMCASM

- 5 Las 37 mutaciones silenciosas individuales identificadas durante el estudio de detección GSSM (véase Tabla 11, Ejemplo 9, arriba) se evaluaron para expresión (véase Tabla 18, a continuación). Se expresaron 50 ml de cultivos en medio M9, enriquecido con uracilo y kanamicina, en matraces de 250 ml. Se desarrollaron los hits a 30°C durante 16 a 20 horas antes y después de la inducción con IPTG 0, 3 mM. Las células se sedimentaron por centrifugación y se lisaron con B-PER™ (número de catálogo 78248, Pierce Protein Research Products, Rockford, IL). Una porción del lisado entero se centrifugó para clarificar. Tanto el lisado celular entero como los lisados clarificados se ensayaron para concentración de proteína total usando el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, catálogo núm. 500-0006) basado en el método de Bradford, y para actividad en el sustrato fluorogénico UMB-Palmitato, y por SDS-PAGE. Los valores se normalizaron con el valor original fijado a 100%. Se identificaron 16 hits, lo que demuestra un aumento de la actividad frente al original).
- 10

Tabla 18

sitio a.a.	% actividad del original		% soluble	
	entero	clarificado	Actividad	Proteína
35	352	247	53	79
37	191	126	50	83
41	163	103	48	91
45	706	640	68	89
52	252	161	48	57
89	281	190	51	47
97	167	102	46	77

sitio a.a.	% actividad del original		% soluble	
	entero	clarificado	Actividad	Proteína
102	617	525	64	72
108	583	452	58	60
109	373	244	49	72
114	238	147	46	72
115	n.d.			
117	653	555	64	70
124	442	336	57	62
126	509	368	55	70
128	416	327	59	70
129	354	260	55	73
133	511	455	67	47
137	339	240	53	54
138	266	186	53	75
139	135	101	56	105
142	221	175	60	63
172	243	210	65	59
183	433	356	62	65
188	455	325	54	97
192	253	179	53	60
193	117	59	38	57
202	196	121	47	63
203	339	247	55	68
205	63	31	37	68
206	125	78	47	63
208	232	162	53	99
212	320	238	56	87
222	126	75	45	86
223	149	88	45	99
226	213	110	39	81
227	183	174	71	71
Positivo	100	100	75	71
Negativo	0	1		

Las 11 mutaciones silenciosas individuales principales (Tabla 19 a continuación) se combinaron usando tecnología TMCA, como se describe en la publicación PCT número WO 2009/018449 y como se describe también a continuación).

Tabla 19

codón original	codón nuevo	sitio del aminoácido
GCG	GCT	35
GGC	GGA	45
GTG	GTT	102
AGC	AGT	108
CTG	CTT	117
CTG	TTG	124
CGG	AGG	126
GTC	GTG	128
AGT	TCT	133
GTG	GTT	183
ACC	ACG	188

Para la evolución de TMCA, se usaron cuatro moldes de DNA: (1) palmitasa "Original A" (SEC ID NÚM:2 con mutaciones D61E, R72K y V163R), (2) palmitasa "Original B" (Original A con mutaciones adicionales (GGC)45(GGA) y (CTG)117(CTT)), (3) palmitasa "Original C" (Original A con mutación adicional (GGC)45(GGA)) y (4) "Original D" (Original A con mutación adicional (CTG)117(CTT)). Observación: las mutaciones se enumeran proporcionando el codón original, seguido por el número de posición del aminoácido modificado, seguido por el codón nuevo. Por ejemplo, (GGC)45(GGA) indica que el codón para el aminoácido en la posición 45 de SEC ID NÚM:2 se cambió de (GGC) a (GGA).

Se completó una primera tanda de reacciones TMGA con cada uno de los cuatro moldes de DNA y los cebadores para las regiones 1 y 4 (véase la Tabla 20 a continuación; región 1: aminoácido 35; región 4: aminoácidos 183 y 188), creando así cuatro sub-genotecas. Los productos de las sub-genotecas se purificaron usando el kit de limpieza PCR Qiagen. Cada sub-genoteca, que contenía una mezcla de productos purificados y en consecuencia, contenía múltiples moldes, se usó luego en una segunda reacción TMCA individual por sub-genoteca con cebadores para las regiones 2 y 3 (véase la Tabla 21 a continuación; región 2: aminoácidos 102 y 108; región 3: aminoácidos 124, 126, 128 y 133).

Tabla 20

Nombre del oligo	Secuencia del oligo - 5' - 3'
35GCT	CTGCGAAAAATGGCAAACTGGCTGATGGCGAGCCGGTACTGGT (SEC ID NÚM:41)
183GTT	TGCTGGGGCGGAGCCTTCGAGAGTCTCCGGCGCCACAAACCCGTCGAGCGGGGACACACA (SEC ID NÚM:42)
183GTT188ACG	TGCTCGGGCGGAGCCTTCGACAGTGTCCGGCGCCACAAACCCGTCGAGCGGGGACACACA (SEC ID NÚM:43)
188ACG	TGCTCGGGCGGAGCCTTCGACAGTGTCCGGCGCCACCAACCCCGTCGAGCGGGGACACACA (SEC ID NÚM:44)

Tabla 21

Nombre del oligo	Secuencia del oligo - 5' - 3'
102GTT-RC	AGGCGGCGGGTGGTCAGAAAGTTATCGTGGTGGCTGGAGCCTCGGCGGCCCTCTATGCGC (SEC ID NÚM:45)
102GTT108 AGT-RC	AGGCGGCGGGTGGTCAGAAAGTTATCGTGGTGGCTGGAGTCTCGGCGGCCCTCTATGCGC (SEC ID NÚM:46)
108AGT-RC	AGGCGGCGGGTGGTCAGAAAGTTGATCGTGGTGGCTGGAGTCTCGGCGGCCCTCTATGCGC (SEC ID NÚM:47)
124TTG 133TCT-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCGGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:48)
124TTG 126AGG-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGACTGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:49)
124TTG126 AGG128GTG-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGACTGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:50)
126 AGG133TCT-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAGTTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:51)
124TTG126 AGG 128GTG133TCT-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:52)
133TCT-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAGTTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:53)
128GTG133TCT-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAGTTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:54)
124TTG126AGG133TCTG-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:55)
126AGG-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGACTGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAGTTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:56)
124TTG 128GTG-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGACTGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:57)
126AGG128GTG 133TCT-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAGTTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:58)
124TTG128GTG133TCT-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGAGAGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:59)
124TTG-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGACTGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAATTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:60)
128GTG-RC corto	TCGCCCCGCGAACGGACTGCCGAGCGTGACGACCATCCTGATCAGTTCGGGCGCCTTGTGG (SEC ID NÚM:61)

Las muestras se ampliaron en un vector pDOW-kan, se analizaron con gel de agarosa, se trataron con DPNI y luego se transformaron en células competentes de XLIBlue *E. coli*. Las colonias se desarrollaron, se recogieron y se secuenciaron. Las colonias se combinaron y se preparó DNA para cada subgenoteca, usando el kit Qiagen mini-prep (Catálogo núm. 27106, Qiagen, Valencia, CA). Se transformaron luego células competentes de *Pseudomonas fluorescens* con el DNA. Las células se desarrollaron en medio LB enriquecido con uracilo (750 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Se obtuvo un número suficiente de colonias para un sobre-muestreo de siete veces de la genoteca (por lo menos 14.000 colonias).

La genoteca se ordenó, se desarrolló en medio mínimo M9 enriquecido con uracilo (750 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml), y se ensayó con 400 µM 4-metilumbeliferil palmitato en HEPES 80mM a pH 7,5. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a 54°C antes y después de la adición del sustrato. La fluorescencia se detectó a E_x 360nm y E_m 465nm. Las 46 muestras de mutaciones silenciosas produjeron secuencias únicas (véase la Tabla 22 a continuación). La lectura de fluorescencia para cada una de las 46 muestras de mutaciones silenciosas se enumera también en la Tabla 22, primera columna "Actividad de UMB". Las muestras de las mutaciones silenciosas 2, 7, 9, 10, 13, 16, 23, 25, 40 y 44 tuvieron cambios de aminoácidos (AA) además de las mutaciones silenciosas (véase la Tabla 23 a continuación).

Tabla 22

Activid. UMB	Hit núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm
31850	1	GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
33936	2	GCG	GCT.	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
42764	3	GCG	GCT	35	ACC	ACG	188												
39330	4	GCG	GCT	35	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188									
38876	5	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	GTC	GTG	128						
31705	S	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
35315	7				GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	TTG	124						
36662	8	GCG	GCT	35	GTG	GTT	183												
35945	9	GCG	GCT	35	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133									
37161	10	GCG	GCT	35	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
35399	11	GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	CTG	TTG	124	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
39316	12	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126
39682	13	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124				GTG	GTT	183
46354	14	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126	ACC	ACG	188
39952	15	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133			
37049	16				GGC	GGA	45	GTG.	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126
34741	17	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117									
34261	18	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188			
30495	19	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
31485	20	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	AGT	TCT	133
34474	21	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CTG	TCT	133	ACC	ACG	188
36301	22	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	CGG	AGG	126
37711	23	GGC	GGA	45				AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188			
37855	24	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188						

Activid. UMB	Hit núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm	codón antiguo	codón nuevo	AA núm
34094	25	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	CGG	AGG	126	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133
41223	26	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	AGT	TCT	133						
35751	27	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45												
34878	28	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	CTG	TTG	90	GTG	GTT	183						
36361	29	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	AGC	AGT	108	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133			
35801	30	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	GTC	GTG	128	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
42393	31	GCG	GCT	35	GGC	GGA	45	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CGG	AGG	126	GTC	GTG	128
29278	32	GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188									
34274	33	GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
36610	34	GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	GTC	GTG	128	AGC	AGT	153
42445	35	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126	AGT	TCT	133
41151	36	GTG	GTT	102	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126						
39376	37	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188			
35116	38	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
35224	39	GCG	GCT	35	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	GTC	GTG	128	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183
39996	40	GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	AGT	TCT	133						
35206	41	CTG	CTT	117	CGG	AGG	126	AGT	TCT	133	CGC	CAC	172	ACC	ACG	188			
34163	42	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188						
34789	43	AGC	AGT	108	CTG	CTT	117	CTG	TTG	124	CGG	AGG	126	GTC	GTG	128	GTG	GTT	183
33168	44				GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	ACC	ACG	188						
37120	45	GCG	GCT	35	CTG	CTT	117	GTG	GTT	183									
38626	46	GCG	GCT	35	GTG	GTT	102	CTG	CTT	117	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188

Tabla 22 (continuación)

Actividad UMB	Hit núm.	codón antiguo	codón nuevo	AA núm.	codón antiguo	codón nuevo	AA núm.	codón antiguo	codón nuevo	AA núm.
31850	1									
33936	2				GTG	GTT	183			
42764	3									
39330	4									
38876	5									
31705	6	GTG	GTT	183						
35315	7									
36662	8									
35945	9									
37161	10									
35399	11									
39316	12	ACT	TCT	133						
39682	13	ACC	ACG	188						
46354	14									
39952	15									
37049	16	ACC	ACG	188						
34741	17									
34261	18									
30495	19									
31485	20									
34474	21									
36301	22	GTC	GTG	128						
37711	23									
37855	24									
34094	25									
41223	26									
35751	27									
34878	28									
36361	29									
35801	30									
42393	31	AGT	TCT	133	GTG	GTT	183	ACC	ACG	188
29278	32									
34274	33									
36610	34	ACC	ACG	188						
42445	35	ACC	ACG	188						
41151	36									
39376	37									

Actividad UMB	Hit núm.	codón antiguo	codón nuevo	AA núm.	codón antiguo	codón nuevo	AA núm.	codón antiguo	codón nuevo	AA núm.
35116	38									
35224	39	ACC	ACG	188						
39996	40									
35206	41									
34163	42									
34789	43	ACC	ACG	188						
33168	44									
37120	45									
38626	46									

Tabla 23

Mutación silenciosa Hit núm.	Additional mutations				
	codón antiguo	codón nuevo	AA antiguo	AA nuevo	AA núm.
2	CCG	TCG	P	S	162
7	ACG	ATG	T	M	22
9	AGC	GGC	S	G	153
10	GAA	AAA	E	K	190
13	CGC	CAC	R	H	172
16	ATG	ATA	M	I	31
23	GTG	ATG	V	M	83
25	CTA	ATA	L	I	200
40	GCA	GTA	A	V	211
44	ACG	ATG	T	M	22

Las muestras de las 46 mutaciones silenciosas únicas se desarrollaron en matraces de agitación de 250 ml. Los lisados clarificados se cuantificaron usando el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, catálogo núm. 500-0006) basado en el método de Bradford, y luego se normalizaron para expresión de proteínas totales. La expresión se analizó por SDS-PAGE.

El original (SEC ID NÚM:2 con mutaciones D61E, R72K y V163R), el control negativo y los 4 hits de mutaciones silenciosas principales se expresaron en una escala de 1L. Cada muestra se lisó con microfluidizador o en presencia de detergente BPER. La concentración de proteína se cuantificó para lisados brutos y clarificados usando el Ensayo de Proteínas Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, catálogo núm. 500-0006) basado en el método de Bradford. Cada carril del gel SDS-PAGE se cargó luego con proteína total equivalente. Se observaron niveles similares de palmitasa bajo todas las condiciones de solubilidad y lisis ensayadas. Los hits de mutaciones silenciosas 26, 34, 35 y 37 (Tablas 22 y 23, arriba) exhibieron un mayor porcentaje de expresión de la palmitasa, comparado con el original (SEC ID NÚM:2 con mutaciones D61E, R72K y V163R). El hit de mutación silenciosa 35 tuvo el porcentaje de expresión de palmitasa más alto. El hit de mutación silenciosa 35 tuvo las siguientes siete mutaciones silenciosas en comparación con el original: (GCG)35(GCT), (GTG)102(GTT), (AGC)108(AGT), (CTG)117(CTT), (CGG)126(AGG), (AGT)133(TCT) y (ACC)188(ACG).

Ejemplo 12: Evolución ilustrativa para expresión mejorada de palmitasas termotolerantes

Para evaluar la expresión de las 9 palmitasas iniciales termotolerantes candidatas (Ejemplo 10, Tablas 15, 16 y 17), las 7 mutaciones silenciosas principales (Ejemplo 11) se incorporaron a cada palmitasa inicial termotolerante como se describe a continuación. El resultado fue que cada inicial termotolerante (Hits de tolerancia térmica 29, 40, 41, 74, 81, 202, 204, 238 y 244) tuvo las siguientes mutaciones silenciosas incorporadas (35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT, 188ACG) en cada una. Con las mutaciones silenciosas incorporadas, cada palmitasa inicial termotolerante se renombró añadiendo "SM" al final del número del hit termotolerante. Por ejemplo, el hit

termotolerante 29 con las mutaciones silenciosas incorporadas se renombró "29 SM". Asimismo, el hit 40 se convirtió en "40 SM", el hit 41 se convirtió en "41 SM", el hit 74 se convirtió en "74 SM", el hit 81 se convirtió en "81 SM", el hit 202 se convirtió en "202 SM", el hit 204 se convirtió en "204 SM", el hit 238 se convirtió en "238 SM" y el hit 244 se convirtió en "244 SM".

- 5 Con el fin de incorporar las 7 mutaciones silenciosas principales las 9 palmitasas iniciales termotolerantes, se empleó tecnología TMCA como se describe en la publicación PCT número WO 2009/018449 y como se describe también a continuación.

Para la primera tanda de evolución TMCA, las 9 palmitasas iniciales termotolerantes y el hit de expresión inicial (hit de mutación silenciosa núm. 35) se sometieron a pasaje a través de células competentes de *E. coli* XLBlue con el fin de metilar el DNA. El hit de mutación silenciosa núm. 35 se usó como molde de DNA. Los oligos enumerados en la Tabla 24 siguiente se usaron para incorporar combinaciones de mutaciones en el molde de DNA.

10

Tabla 24

Nombre del oligo	Secuencia del oligo - 5' - 3'
1-ForJC	TGGTGCTGCCCGGCTTCCTGTGTGACGACAACGCCACCTCGGT (SEC ID NÚM:62)
2-ForJC	TTCGTGGCGACCTCGTGGACTATCTGGTCGACCGGCTGCGG (SEC ID NÚM:63)
2-Alt-ForJC	TCGGCATTCGTGGCGACCTCATGGACTATCTGGTCGACCGGCTGCGG (SEC ID NÚM:64)
3-ForJC	CTGGTCGACCGGCTGCGGGCTGTGTGAAGGCGGCCGGTGGTCAGAAG (SEC ID NÚM:65)
4-RevJC	TCGGGCGCCTTGTGGCCAAGAATGCGCGCATAGAGGCCGCCGA (SEC ID NÚM:66)
4-Alt-RevJC	TCGGGCGCCTTGTGGCCAAGATTGCGCGCATAGAGGCCGCCGA (SEC ID NÚM:67)
4-Alt2-RevJC	TCGGGCGCCTTGTGGCCAAGAAGGCGCGCATAGAGGCCGCCGA (SEC ID NÚM:68)
5-RevJC	cGGCTTAATCTGGAAATCCCGACCGATCGGCAGGTTGTCGACCG (SEC ID NÚM:69)
6-RevJC	GGCGACCACACCGCGATGGTATGCACCGGCGGCTTAATCTGGA (SEC ID NÚM:70)
7-RevJC	TTGGGCTCGAGTCAGAGCCGAGACGCGACCAGCCGGACCACAG (SEC ID NÚM:71)

Las muestras se ampliaron en el vector pDOW-kan, se analizaron con gel de agarosa y se trataron con DPNI. Las muestras se transformaron en células competentes de *E. coli* XLI Blue. Las colonias se recogieron, se desarrollaron y se secuenciaron. La secuenciación identificó varias combinaciones de mutaciones. No obstante, algunas combinaciones estuvieron sub-representadas. En consecuencia, algunos de los constructos nuevos de la primera tanda de evolución TMCA se seleccionaron para uso como molde en la tanda siguiente de evolución TMCA. Los moldes utilizados se enumeran en la Tabla 25 a continuación.

15

Tabla 25

Nombre del molde	Aminoácidos con mutaciones deseadas
F8	48, 92, 95, 162, 172
H10	48, 116L, 162, 172
A8	85, 92, 95
C11	116N, 172

Las combinaciones de moldes y oligos utilizadas en la segunda tanda de evolución TMCA se enumeran en la Tabla 26 que sigue. Se efectuó una reacción TMCA separada para cada fila de la Tabla 26, creando una genoteca individual para cada fila. Por ejemplo, una ejecución consistió en el molde F8 y en los cebadores 2For y 7 Rev. Una segunda ejecución consistió en el molde F8 y en los cebadores 2For y 6 Rev. Obsérvese que se usaron varios de los mismos cebadores que en la primera tanda. Se ordenaron dos cebadores adicionales para la segunda tanda de PCR. Estos oligos se denominaron 116LF y 162F. El oligo 116LF tiene la secuencia inversa y complementaria del oligo 4-Alt2-RevJC. El oligo 162F tiene la secuencia inversa y complementaria de 5-RevJC.

20

25

Tabla 26

Molde para segunda tanda TMCA	Aminoácidos para añadir en la segunda tanda TMCA	Cebadores para segunda tanda TMCA
F8	85,225	2For y 7 Rev
F8	85	2For y 6Rev
H10	85,225	2For y 7 Rev
Hit de mutación silenciosa núm. 35	83, 85, 172	2Alt y 6REV
A8	116L, 172, 225	116L F y 6Rev y 7Rev
C11	85, 162, 225	2For y 5Rev y 7Rev
Hit de mutación silenciosa núm. 35	85, 116, 162, 172	2For, 4Rev, 5Rev, 6Rev
Hit de mutación silenciosa núm. 35	85, 162	2For y 5Rev
C11	162	162F y 5Rev

Las muestras se ampliaron en el vector pDOW-kan, se analizaron con gel de agarosa y se trataron con DPNI. Las muestras se transformaron en células competentes de *E. coli* XL1Blue. Las colonias se recogieron, se desarrollaron y secuenciaron. La secuenciación identificó una representación lo suficientemente alta de 7 de los 9 constructos deseados. No obstante, dado que los otros dos constructos estuvieron sub-representados, se necesitó una tanda adicional de evolución TMCA para obtener los restantes iniciales termotolerantes en combinación con las siete mutaciones silenciosas. Se usaron dos nuevos constructos como moldes para la tercera tanda de evolución TMCA. Estos moldes se enumeran en la siguiente Tabla 27. Las combinaciones de moldes y oligos utilizados en la tercera tanda se enumeran en la siguiente Tabla 28. Se efectuó una reacción TMCA separada para cada fila en la Tabla 28, creando una genoteca individual para cada fila. Por ejemplo, una ejecución consistió en el molde F3 y los cebadores 162F y 7 Rev. La segunda ejecución consistió en el molde B5 y los cebadores 162F y 6 Rev.

Tabla 27

Nombre del molde	Aminoácidos con mutaciones deseadas
F3	85, 116N, 172
B5	85, 116I, 162

Tabla 28

Molde para tercera tanda TMCA	Aminoácidos para añadir en la tercera tanda TMCA	Cebadores para usar en la tercera tanda TMCA
F3	162, 225	162F y 7 Rev
B5	172	162F y 6Rev

Las muestras se ampliaron en el vector pDOW-kan, se analizaron con gel de agarosa y se trataron con DPNI. Las muestras se transformaron en células competentes de *E. coli* XL1Blue.

Las colonias se recogieron, se desarrollaron y secuenciaron. Se obtuvo la representación suficiente de los dos constructos restantes. Se preparó DNA para todos los constructos de *E. coli* XL1Blue deseados y se transformó en células competentes de *Pseudomonas fluorescens*. Las células se desarrollaron en medio LB enriquecido con uracilo (750 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Las muestras se confirmaron por secuenciación.

Para detección, la genoteca se desarrolló en medio mínimo M9 enriquecido con uracilo (750 µg/ml) y kanamicina (50 µg/ml). Los ensayos de aceite estándar se efectuaron cargando los lisados clarificados a 10% contenido de agua usando tampón de fosfato en ensayos de aceite en bruto a los niveles de actividad de UMB-Palmitato mencionados en la columna izquierda de la Tabla 29. Los ensayos de aceite se cargaron, homogeneizaron y posteriormente se mezclaron continuamente como para las reacciones estándar, a 25°C, 45°C y 60°C. Se añadieron alícuotas de 50 µl de 11% NaOH a 3 y 20 horas para cada reacción de aceite homogeneizada. Las alícuotas se eliminaron a 20, 44 y 68 horas y se sometieron a extracción estándar de cloroformo y metanol, y metanólisis total, seguida de análisis GC de FAME (como se describió en el Ejemplo 8 anterior). El palmitato remanente en el aceite se enumera para cada alícuota en la Tabla 29. El hit de mutación silenciosa termotolerante 29 SM redujo drásticamente el palmitato en el curso de tiempo de 25°C (Tabla 29).

Tabla 29

Actividad UMB	Enzima	Palmitato 20h (50 µl cáustico a 3h)			Palmitato 44h (cáustico a 3h y 20h)			Palmitato 68h (cáustico a 3h y 20h)		
		25°C	45°C	60°C	25°C	45°C	60°C	25C	45C	60C
0	Negativa	10,6%	10,6%	10,7%	10,7%	10,6%	10,6%	10,6%	10,6%	10,6%
3,2	Original	6,6%	7,0%	9,1%	5,5%	7,0%	8,9%	5,4%	7,0%	9,0%
10,8	29 SM	4,5%	5,1%	6,3%	3,3%	4,8%	6,3%	2,8%	5,0%	6,3%
1,1	40 SM	10,3%	9,9%	8,8%	10,1%	7,9%	8,7%	9,3%	7,1%	8,7%
1,1	41 SM	10,3%	10,1%	8,1%	10,2%	8,4%	7,9%	9,6%	7,5%	7,9%
11,8	74 SM	8,2%	5,3%	7,2%	5,0%	4,4%	7,4%	3,0%	4,4%	7,6%
7,2	81 SM	10,2%	9,2%	7,2%	9,2%	6,7%	6,7%	6,6%	5,7%	6,6%
3,7	202 SM	9,7%	6,6%	7,6%	7,8%	5,3%	7,6%	5,3%	5,1%	
9,1	204 SM	10,2%	8,6%	7,3%	8,9%	6,3%	7,4%	9,6%	5,9%	7,4%
4,7	238 SM	9,9%	8,1%	6,7%	7,6%	6,0%	6,5%	5,0%	5,9%	6,5%
3,7	244 SM	9,7%	8,3%	8,1%	7,3%	6,1%	8,1%	5,3%	6,2%	8,1%

Ejemplo 13: La sal potásica de ácido oleico como emulsionante permite a la enzima generar 1% de aceite de palmitato

- 5 Se incubaron muestras de aceite con 10% potasio-oleato para evaluar el impacto de este emulsionante sobre las reacciones de aceite con la palmitasa. Los lisados clarificados del Hit 29SM o control negativo se cargaron con 5% contenido de agua en ensayos de aceite pre-tratado (A y B) y aceite en bruto (C). El pre-tratamiento se efectuó tratando con las enzimas, calentando, centrifugando y luego filtrando el aceite para eliminar goma y fase acuosa y para reducir los ácidos grasos libres, como se describe en el Ejemplo 14, para <5% aceite de palmitato libre de goma. El aceite se homogeneizó antes y después de la adición de enzimas para asegurar emulsiones uniformes.
- 10 Se pesaron 0,5 g de sal de potasio de ácido oleico en 5g de aceite, se mezclaron a 60°C para solubilizar y luego se homogeneizaron. La adición cáustica para neutralización de 1% FFA se añadió a las reacciones listadas como "cáusticas". Los ensayos de aceite se cargaron con enzima, se re-homogeneizaron y posteriormente se mezclaron continuamente como para las reacciones estándar. Se extrajeron alícuotas a 3, 24, 48, 72 y 120 horas. Las alícuotas se sometieron a extracción de metanol y metanólisis total, seguida por análisis GC de FAME (como se describió en el Ejemplo 8 anterior). El palmitato restante en el aceite se enumera para cada alícuota en la Tabla 30 a continuación. Los aceites pre-tratados se promovieron exitosamente a un nivel de palmitato de 1%.
- 15

Tabla 30

		Palmitato				
		3h	24h	48h		
A	3,7% Aceite de palmitato	3h	24h	48h		
	enzima	3,4%	3,2%	3,1%		
	Oleato+enzima	2,3%	1,2%	1,2%		
	Oleato+cáustico+enzima	2,3%	1,1%	1,2%		
	Oleato+cáustico (Ensayo de control negativo)	3,4%	3,3%	3,3%		
B	4,5% Aceite de palmitato	3h	24h			
	Oleato+enzima	4,2%	1,1%	1,0%		
	Oleato (Ensayo de control negativo)	7,0%	6,7%	6,9%		
C	Aceite bruto	3h	24h	48h	72h	120h
	enzima	7,9%	4,9%	4,7%	4,6%	5,4%
	Oleato+enzima	10,0%	7,9%	6,6%	5,5%	3,9%
	Oleato+cáustico+enzima	10,7%	10,4%	10,6%	10,5%	10,4%
	Oleato+cáustico (Ensayo de control negativo)	10,7%	10,6%	10,6%	10,5%	10,5%

Ejemplo 14: 2 kg de aceite con centrifugación intermedia y emulsificación de oleato logran 1% acetite de palmitato

El impacto combinado del polipéptido, una etapa de filtración intermedia y la adición de oleato de potasio para alcanzar 1% aceite de palmitato se evaluó a escala banco. Se sometieron a reacción 2kg de aceite en bruto con 29 SM con 5% contenido de agua. La reacción oleosa se homogeneizó durante 1 minuto con IKA a una velocidad de 6

Se equipó una mezcladora superior con una mezcladora de paletas para pintura y se mezcló la reacción oleosa a 390 rpm. Después de 1 hora de reacción, la velocidad de mezclado se aceleró hasta 530 rpm. La mezcla de reacción se monitoreó y fluctuó de 21°C a 29°C sin calentamiento intermitente de un bloque de calor. Las muestras se extrajeron para seguir los cambios en el perfil de aceite. Después de 28 horas, la reacción oleosa se calentó a 66°C y se centrifugó en un aparato gyrotester. La fracción oleosa se enfrió a temperatura ambiente mezclando con paleta, luego se enfrió con un baño de hielo hasta menos de 10°C. Se añadió tierra diatomácea Se añadió tierra diatomácea y se separaron TAGS y DAGS de los ácidos grasos libres por filtración a través de un embudo Buchner enfriado con papel Whatman.

Se usó 1 kg de este aceite de palmitato reducido para iniciar las reacciones con potasio-oleato como emulsionante, se añadieron 100 g de of potasio-oleato al aceite. Las reacciones se calentaron a 60°C con agitación para asegurar la solubilidad. El aceite se enfrió hasta 23°C, luego se añadieron 50 ml de enzima para alcanzar 5% contenido de agua. Este aceite se homogeneizó antes y después de la adición de enzima 29 SM para asegurar emulsiones uniformes. Se extrajeron alícuotas a 6, 21, 24, 28, post-filtración, post-adición de oleato, en el inicio del nuevo ensayo y a 3, 20 y 22 horas en el segundo ensayo. Las alícuotas se sometieron a extracción de cloroformo y metanol estándar y a hidrólisis total, seguida de análisis GC de FAME (como se describió en el Ejemplo anterior). Los ácidos grasos que permanecen unidos en el aceite se mencionan para cada alícuota en la Tabla 31 a continuación. El hit 29 SM fue capaz de promover niveles de palmitato de hasta 1% en el aceite.

Tabla 31

		Palmitato	Estearato	Oleato	Linoleato	Linolenato
aceite		10,7%	4,8%	23,2%	52,9%	8,4%
6h		7,5%	4,7%	23,7%	55,4%	8,7%
21h		5,0%	4,7%	24,2%	57,5%	8,7%
24h		4,9%	4,7%	24,2%	57,6%	8,7%
28h		4,7%	4,6%	24,2%	57,9%	8,6%
aceite filtrado		4,8%	4,6%	24,2%	57,8%	8,6%
aceite+oleato		4,9%	4,6%	24,2%	57,7%	8,6%
+0h		4,7%	4,6%	24,2%	57,9%	8,5%
+3h		2,6%	4,6%	24,5%	59,9%	8,4%
+20h		1,0%	4,3%	24,4%	62,7%	7,7%
+22h		1,0%	4,2%	24,3%	62,8%	7,6%

Ejemplo 15: La doble centrifugación y filtración produce aceite con bajo contenido de palmitato

La capacidad de separar potasio y oleato después de las reacciones oleosas se demostró a continuación. Se sometieron a reacción 2kg de aceite bruto con 29 SM en 5% contenido de agua. La reacción oleosa se homogeneizó durante 1 minuto con IKA a velocidad 6 alcanzando una temperatura de 25°C. Se equipó una mezcladora superior con una paleta mezcladora para pintura y se mezcló la reacción oleosa a 390 rpm. Después de 1 hora de reacción, se aceleró la velocidad de mezclado a 530 rpm. La temperatura de reacción se monitoreó y fluctuó de 21 °C a 29°C con calentamiento intermitente a partir de un bloque de calor. Las muestras se extrajeron para seguir los cambios en el perfil de aceite. Después de 28 horas, la reacción oleosa se calentó hasta 80°C y se centrifugó en un aparato gyrotester. La fracción oleosa se enfrió hasta temperatura ambiente durante una noche mezclando con paleta, luego se enfrió más con un baño de hielo hasta menos de 10°C. Se añadió tierra diatomácea y se separaron TAGS y DAGS de los ácidos grasos libres por filtración a través de un embudo enfriado Buchner con papel Whatman. Se usó 1 kg de este aceite tratado para iniciar las reacciones con potasio-oleato como emulsionante. Se añadieron 50 g de potasio-oleato para lograr 5%. Esto se mezcló y homogeneizó. Se cargaron 50 ml de enzima para alcanzar 5% contenido de agua y se homogeneizaron durante 1 minuto a 6 en IKA, alcanzando 26,6°C. Esta reacción oleosa se mezcló con una paleta mezcladora de pintura equipada con una mezcladora superior a 400 rpm. Se utilizó un calentamiento con un bloque de calor intermitente. Se extrajeron alícuotas a 3, 20, 24 y a 8, 28 y 48 horas del inicio del segundo ensayo. Las alícuotas se sometieron a extracción de cloroformo y metanol estándar y a metanólisis total, seguida de análisis GC de FAME (como se describió previamente en el Ejemplo 8). Los ácidos grasos

remanentes unidos en el aceite se enumeran para cada alícuota en la Tabla 32 a continuación. 29 SM promovió niveles de palmitato hasta 1,5%.

El aceite se calentó hasta 85°C y se centrifugó eliminando los residuos de proteína. La fracción oleosa se enfrió a 6°C mezclando con paleta, se añadió tierra diatomea y el material se separó con un embudo Buchner. La filtración continuó a 25°C.

Tabla 32

		Palmitato	Estearato	Oleato	Linoleato	Linolenato
aceite		10,7%	4,8%	23,2%	52,9%	8,4%
3h		8,3%	4,7%	23,5%	54,8%	8,7%
20h		4,9%	4,7%	24,3%	57,4%	8,7%
24h		4,7%	4,6%	24,1%	57,9%	8,7%
+8h		3,2%	4,6%	24,4%	59,3%	8,5%
+28h		1,9%	4,5%	24,4%	60,9%	8,3%
+48h		1,5%	4,4%	24,5%	61,5%	8,1%

Ejemplo 16: Optimización de codones

Las versiones optimizadas con codones para expresión en *Pseudomonas fluorescens* del hit de mutación silenciosa termotolerante inicial 29 SM (Ejemplo 12) se designaron por dos métodos distintos. La primera versión optimizada con codones reemplazó todos los codones en el hit 29SM con aquellos preferidos por *Pseudomonas fluorescens*, incluyendo las 7 mejores mutaciones silenciosas incorporadas (Ejemplo 12). Esta versión se denominó 29SM-Pf (SEC ID NÚM:22). El uso de codones preferidos para *Pseudomonas fluorescens* se determinó por revisión de la base de datos de uso de codones (Codon Usage Database) disponible en línea en el sitio web de Kazusa DNA Research Institute (2-6-7 Kazusa- kamatari, Kisarazu, Chiba 292-0818 JAPÓN, recuperado en 2009 de la Internet <URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/index.html>>). En particular, los patrones de uso de codones para *Pseudomonas fluorescens* PfO-1 (recuperado en 2009 de la Internet <URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/cgHbin/showcodon.cgi?species=205922>>) y *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 (recuperado en 2009 de la Internet <URL: <http://www.kazusa.or.jp/codon/csi-bin/showcodon.cm?species=220664>>) se usaron en el diseño de secuencias optimizadas con codones, SEC ID NÚM:22.

La segunda versión optimizada con codones también reemplazó todos los codones en el hit 29SM con aquellos preferidos por *Pseudomonas fluorescens*, excepto que se mantuvieron las siete 7 mutaciones iniciales silenciosas (Ejemplo 11). Esta versión se denominó 29SM-Pf+SM (SEC ID NÚM:23). 29SM-Pf+SM (SEC ID NÚM:23) es el candidato principal frente a 29SM-Pf (SEC ID NÚM:22).

SEC. ID NÚM. 22:

ATGCTCAAGCCCCACCTTACGGCCGTCTGCTCCGCGAACTGGCTGATATCCC
GGCGATCGTGACTGCTCCGTTCCGCGGCGCAGCCAAAATGGGCAAACCTGGCA
GATGGCGAGCCGGTACTGGTGTCTGCCCGGCTTCCTGGCGGACGACAACGCGA
CCAGCGTGCTGCGGAAGACCTTCGAGGTGCGCCGGCTTTGCGTGACGCGGCTG
GGAAAAGGGCTTCAACCTCGGCATTTCGTGGCGACCTCATGGACTACCTGGTTCG
ACCGCCTGCGCGCCGTGAGCGAGGCGCGGGGGGGCAGAAGGTAATCGTGG
TCGGCTGGTCCCTCGGCGGCCTCTACGCCCGGGAGTTGGGCCACAAGGCCCC
CGAACTGATCCGTATGGTCGTACGCTCGGCTCCCGTTCCGCGGCGACCTCC
ACGCGAACCATGCCTGGAAGATCTACGAGGCCATCAACTCCCACACGGTCGAC
AACCTGCCGATCCCGCGCGATTTCAGATTAAGCCGCCGGTGCATACCATCGC
CGTGTGGAGCCCGCTCGACGGGGTGGTGGCCCCGGAGACGAGCGAAGGCAG
CCCCGAGCAGAGCGACGAGCGCTTGGAGCTGGCCGTGACCCACATGGGCTTT
GCGGCTAGCAAGACCGGGGCGGAGGCAGTGGTCCGCCTGGTCGCCGCCCGC
CTCTGA

SEC. ID NÚM. 23:

ATGCTCAAGCCCCACCTTACGGCCGTCTGCTCCGCGAACTGGCTGATATCCC
 GGCGATCGTGACTGCTCCGTTCGCGGGCGCAGCCAAAATGGGCAAACTGGCT
 GATGGCGAGCCGGTACTGGTGCTGCCCGGCTTCTGGCGGACGACAACGCGA
 CCAGCGTGCTGCGGAAGACCTTCGAGGTCGCCGGCTTTGCGTGACGCGGCTG
 GGAAAAGGGCTTCAACCTCGGCATTCGTGGCGACCTCATGGACTACCTGGTTCG
 ACCGCCTGCGCGCCGTGAGCGAGGCCGCGGGGGGGCAGAAGGTTATCGTGG
 TCGGCTGGAGTCTCGGCGGCCCTCTACGCCCGGGAGCTTGGCCACAAGGCCCC
 CGAACTGATCAGGATGGTTCGTCACGCTCGGCTCTCCGTTCCCGGGCGACCTCC
 ACGCGAACCATGCCTGGAAGATCTACGAGGCCATCAACTCCCACACGGTCGAC
 AACCTGCCGATCCCGCGCGATTTCAGATTAAGCCGCCGGTGCATACCATCGC
 CGTGTGGAGCCCGCTCGACGGGGTGGTGGCCCCGGAGACGAGCGAAGGCAG
 CCCCAGCAGAGCGACGAGCGCTTGGAGCTGGCCGTGACCCACATGGGCTTT
 GCGGCTAGCAAGACCGGGGCGGAGGCAGTGGTCCGCTGGTCCCGCCCCG
 CTCTGA

Las secuencias de ambas versiones optimizadas con codones del gen se enviaron a DNA 2.0 Incorporated (Menlo Park, CA) para síntesis de DNA. Los genes se sintetizaron en el vector pJ201 con un sitio de restricción *SpeI* y *XhoI* en cualquiera de los lados del gen. Cuando se enviaron los genes sintetizados, los plásmidos se cortaron con enzimas de restricción. El DNA del vector pDOW-Kan también se cortó con las mismas enzimas de restricción y luego se trató con fosfatasa alcalina intestinal de ternera (New England Biolabs Producto núm. M0290L). Todas las muestras se purificaron con gel y se extrajeron usando el kit de extracción de gel QIAquick (Qiagen, Producto núm. 28706). El vector y los insertos se ligaron luego usando el kit de ligadura Roche Rapid (Roche, Producto núm. 11635379001). Los productos de ligadura se transformaron luego en células competentes de *E.coli* XL1Blue. Las colonias se recogieron, se desarrollaron, se preparó DNA usando el kit Qiagen mini-prep. Las muestras de DNA se confirmaron con secuencias y se usó luego el DNA para transformar *Pseudomonas fluorescent*.

29SM-Pf (SEC ID NÚM:22), 29SM-Pf+SM (SEC ID NÚM:23), 29SM, el original (SEC ID NÚM:2 con mutaciones D61E, R72K y V163R) y el hospedante/vector control se desarrollaron e indujeron en matraces de agitación de 250 ml. La concentración de proteína en los lisados clarificados se cuantificó usando el ensayo de proteínas Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, catálogo núm. 500-0006) basado en el método de Bradford y luego se normalizó para expresión de proteína total. La expresión se analizó por SDS-PAGE, con cada carril del gel SDS-PAGE cargado con proteína total equivalente. 29SM-Pf y 29SM-Pf+SM tuvieron un porcentaje mayor de proteína palmitasa expresada en comparación con 29SM y con el original. 29SM-Pf+SM tuvo un porcentaje ligeramente mayor de expresión de palmitasa que 29SM-Pf. La mejoría en expresión fue, por consiguiente, ligeramente más pronunciada en presencia de las mutaciones silenciosas.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> BUNGE OILS, INC.
 DAYTON, Christopher L. G.
 HITCHMAN, Timothy
 5 KLINE, Katie
 LYON, Jonathan
 WALL, Mark A.
 BARTON, NELSON R.
 BUENO, ANALIA
 10 CUENCA, DOSLIN G.
- <120> HIDROLASAS, ÁCIDOS NUCLEICOS QUE LAS CODIFICAN Y MÉTODOS PARA ELABORARLAS Y USARLAS
 <130> 564462014740
 <140> Aún no asignado
 15 <141> concurrentemente con el presente
 <150> US 12/202.204
 <151> 29-08-2008
 <160> 71
 <170> Patentín versión 3.5
- 20 <210> 1
 <211> 684
 <212> DNA
 <213> Desconocido
 <220>
 25 <223> DNA obtenido de muestra ambiental
- <400> 1**
atgctgaaac cgcctcccta cggacgcctg ctgcgcgaac tggccgatat cccggccatc 60
gtgacggcac cggtccgggg cgctgcgaaa atgggcaaac tggcggatgg cgagccggta 120
ctggtgctgc ccggcttcct ggccgacgac aacgccacct cggtgctgcg caagaccttc 180
gatgtcgcgg gctttgcctg ttcgggctgg gaacgcggct tcaacctcgg cattcgtggc 240
gacctcgtgg accggctggt cgaccggctg cgggcgggtgt cggaggcggc cggtggtcag 300
aagggtgatcg tggtcggctg gagcctcggc ggcctctatg cgcgcgagct gggccacaag 360
gcgcccgaac tgatccggat ggtcgtcacg ctcggcagtc cgttcgcggg cgacctccac 420
gccaaccatg cgtggaagat ctacgaggcg atcaacagcc acacggtcga caacctgccg 480
atccccggtcg atttccagat taagccgccg gtgcgcacca tcgcggtgtg gtcgccgctc 540
gacgggggtgg tggcgccgga gacctcgaa ggctcgcccg agcagtcgga cgagcggcta 600
gagctggcgg tgaccacat gggctttgcc gcatcgaaga ccggggccga ggctgtggtc 660
cggctgggtc cggcgcggt ctag 684
- 30 <210> 2
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Desconocido
 <220>
 <223> Proteína obtenida de muestra ambiental
 <220>
 <221> SITIO

<222> (51)...(54)
 <223> Sitio de N-glucosilación. Prosite id = PS00001
 <220>
 <221> SITIO
 5 <222> (103)...(112)
 <223> Lipasas, sitio activo de serina. Prosite id = PS00120

<400> 2
 Met Leu Lys Pro Pro Pro Tyr Gly Arg Leu Leu Arg Glu Leu Ala Asp
 1 5 10 15
 Ile Pro Ala Ile Val Thr Ala Pro Phe Arg Gly Ala Ala Lys Met Gly
 20 25 30
 Lys Leu Ala Asp Gly Glu Pro Val Leu Val Leu Pro Gly Phe Leu Ala
 35 40 45
 Asp Asp Asn Ala Thr Ser Val Leu Arg Lys Thr Phe Asp Val Ala Gly
 50 55 60
 Phe Ala Cys Ser Gly Trp Glu Arg Gly Phe Asn Leu Gly Ile Arg Gly
 65 70 75 80
 Asp Leu Val Asp Arg Leu Val Asp Arg Leu Arg Ala Val Ser Glu Ala
 85 90 95
 Ala Gly Gly Gln Lys Val Ile Val Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu
 100 105 110
 Tyr Ala Arg Glu Leu Gly His Lys Ala Pro Glu Leu Ile Arg Met Val
 115 120 125
 Val Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ala Gly Asp Leu His Ala Asn His Ala
 130 135 140
 Trp Lys Ile Tyr Glu Ala Ile Asn Ser His Thr Val Asp Asn Leu Pro
 145 150 155 160
 Ile Pro Val Asp Phe Gln Ile Lys Pro Pro Val Arg Thr Ile Ala Val
 165 170 175
 Trp Ser Pro Leu Asp Gly Val Val Ala Pro Glu Thr Ser Glu Gly Ser
 180 185 190
 Pro Glu Gln Ser Asp Glu Arg Leu Glu Leu Ala Val Thr His Met Gly
 195 200 205
 Phe Ala Ala Ser Lys Thr Gly Ala Glu Ala Val Val Arg Leu Val Ala
 210 215 220
 Ala Arg Leu
 225

<210> 3
 <211> 633
 10 <212> DNA
 <213> desconocido
 <220>
 <223> DNA obtenido de muestra ambiental

```

<400> 3
atggccggcc accagggcgc gcggggcccc aaagacggtc cgccggcgat ggtgatcccg      60
ggcttcctcg cccacgacag gcacacgaca cgattgcgcc gggaaactcg cgaggcgggg      120
ttcagggttc acccctggcg gcagggctgg aacatgggag cgcgtgccga cacgctcgag      180
aaattgaagc gggcagtgga ccagtgcggt catgacgagc cgatcctgct ggtcggctgg      240
agtctgggcg ggctctacgc gagggaggtc gcgcgcgccg agccggatca ggtgcgggcg      300
gtggtcactc ttggttcccc ggtgtcgggc gaccggcgcc gctacaccaa cgtgtggaag      360
ctgtacgaat ggggtggcggg tcacccggtg gacgacccgc cgatccccga caaggaggaa      420
aagccgccgg tgccgaccct ggctttgtgg tcggcggatg acgggacgt cggcgccccg      480
tcggcgcgcg ggactcagtt atctcacgac aaggcggtcg agatgcgaac gagccacatg      540
ggctttgcc a tgcggcgaa gagcgcacgc tttgttgtcg ccgagatcgt gaagttcctg      600
aagaaaaccg aaggttccga gtcgcacgat tga                                     633

```

```

<210> 4
<211> 210
<212> PRT
5 <213> Desconocido

```

```

<220>
<223> Proteína obtenida de muestra ambiental

```

```

<220>
10 <221> SITIO
<222> (76)...(85)
<223> Lipasas, sitio activo de serina. Prosite id = PS00120

```

<400> 4
Met Ala Gly His Gln Gly Ala Arg Gly Pro Lys Asp Gly Pro Pro Ala
1 5 10 15
Met Val Ile Pro Gly Phe Leu Ala His Asp Arg His Thr Thr Arg Leu
20 25 30
Arg Arg Glu Leu Ala Glu Ala Gly Phe Arg Val His Pro Trp Arg Gln
35 40 45
Gly Trp Asn Met Gly Ala Arg Ala Asp Thr Leu Glu Lys Leu Lys Arg
50 55 60
Ala Val Asp Gln Cys Gly His Asp Glu Pro Ile Leu Leu Val Gly Trp
65 70 75 80
Ser Leu Gly Gly Leu Tyr Ala Arg Glu Val Ala Arg Ala Glu Pro Asp
85 90 95
Gln Val Arg Ala Val Val Thr Leu Gly Ser Pro Val Ser Gly Asp Arg
100 105 110
Arg Arg Tyr Thr Asn Val Trp Lys Leu Tyr Glu Trp Val Ala Gly His
115 120 125
Pro Val Asp Asp Pro Pro Ile Pro Asp Lys Glu Glu Lys Pro Pro Val
130 135 140
Pro Thr Leu Ala Leu Trp Ser Ala Asp Asp Gly Ile Val Gly Ala Pro
145 150 155 160
Ser Ala Arg Gly Thr Gln Leu Ser His Asp Lys Ala Val Glu Met Arg
165 170 175
Thr Ser His Met Gly Phe Ala Met Ser Ala Lys Ser Ala Arg Phe Val
180 185 190
Val Ala Glu Ile Val Lys Phe Leu Lys Lys Thr Glu Gly Ser Glu Ser
195 200 205

His Asp
210

<210> 5
<211> 711
<212> DNA

5 <213> Desconocido

<220>
<223> DNA obtenido de muestra ambiental

```

<400> 5
gtgagcgaga aaggcgcacc caagggaagg cagcggctga aggagatcgg cgcgcttctg      60
ttccacgcgc ctcgcagctt gggccatctg ggcgcgcgcg gcccgaagga cggtcctccg      120
gtgatgggtca tcccgggatt cctcgcgcac gacttgcata cgacgcagtt gcgccgggcg      180
ctcgcgaagg caggcttccg agtgcattccg tggcggcagg ggatgaacct tggagcgcgc      240
gccgatacgc tcgaaattct gaagcgcgcg gtggattcct gcggctcgag cgagccgatg      300
ctgctcgtcg gctggagcct gggcgggtctc tatgcccggg agatcgcgcg tgcggagccg      360
gaccggggtgc gggcgggtggt gacgatggga tcgccgggtgt ggggcgaccg caggcgctac      420
accaacgtgt ggaagctgta cgaacggatt gccggccatc cggtcgacaa gccgccgatc      480
ccggacaaga gccagaagcc gccggtgccg actctggctt tgtggtcgca gcatgatggc      540
atcgtcggcg cgccctcggc gagagggacg aagaagaccc gcgacaaggc ggtcgccatc      600
gacacgactc acatgggggtt tgccatgtcg cccaagacga cgcgcgcggc agtgcgtgag      660
atcgtgggct ttttgaatga agtcgaaggc ggttcgtcac cccgggcgtg a              711

```

```

<210> 6
<211> 236
<212> PRT
5 <213> Desconocido

```

```

<220>
<223> Proteína obtenida de muestra ambiental

```

<400> 6

Met Ser Glu Lys Gly Ala Pro Lys Gly Arg Gln Arg Leu Lys Glu Ile
1 5 10 15Gly Ala Leu Leu Phe His Ala Pro Arg Ser Leu Gly His Leu Gly Ala
20 25 30Arg Gly Pro Lys Asp Gly Pro Pro Val Met Val Ile Pro Gly Phe Leu
35 40 45Ala His Asp Leu His Thr Thr Gln Leu Arg Arg Ala Leu Ala Lys Ala
50 55 60Gly Phe Arg Val His Pro Trp Arg Gln Gly Met Asn Leu Gly Ala Arg
65 70 75 80Ala Asp Thr Leu Glu Ile Leu Lys Arg Ala Val Asp Ser Cys Gly Ser
85 90 95Ser Glu Pro Met Leu Leu Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu Tyr Ala
100 105 110Arg Glu Ile Ala Arg Ala Glu Pro Asp Arg Val Arg Ala Val Val Thr
115 120 125Met Gly Ser Pro Val Trp Gly Asp Arg Arg Arg Tyr Thr Asn Val Trp
130 135 140Lys Leu Tyr Glu Arg Ile Ala Gly His Pro Val Asp Lys Pro Pro Ile
145 150 155 160Pro Asp Lys Ser Gln Lys Pro Pro Val Pro Thr Leu Ala Leu Trp Ser
165 170 175Gln His Asp Gly Ile Val Gly Ala Pro Ser Ala Arg Gly Thr Lys Lys
180 185 190Thr Arg Asp Lys Ala Val Ala Ile Asp Thr Thr His Met Gly Phe Ala
195 200 205Met Ser Pro Lys Thr Thr Arg Ala Ala Val Arg Glu Ile Val Gly Phe
210 215 220Leu Asn Glu Val Glu Gly Gly Ser Ser Pro Arg Ala
225 230 235

<210> 7

<211> 669

<212> DNA

5 <213> desconocido

<220>

<223> DNA obtenido de muestra ambiental

```

<400> 7
atgaggctgc gcgagggggg cgcgctcgta tcgcgggcct atcgcgcctt cgggcgcctc    60
ggcgagcgcg gcccggcgga cgggcccgcg ctgatggtga tcccgggctt cctcgccacc    120
gatcgaccca ctttggggct gcagcgggcg ctggccaagg gcggtacaa ggtgaccgga    180
tggggcatgg gcctcaacag cggcgtcacc gaagacatag tcgaccgcat cgccgctcgg    240
gtcgaaaggt ttggagccgg ccgcaaagtg atcctcgtcg gctggagcct cggcggactc    300
tacgcgcgcg tggtcgcgca ggagcggccg gatctcgtcg acaagggtgg cacgctcggc    360
tcgccccctt cgggcgacag gcgccgcaac aacaatgtct ggcggctcta cgagtctcgtc    420
gccggccatc cgggtcaacag cccgccgatc gacaaggacc ccgaggtgaa gccgccggtg    480
ccgacgctcg ctatctggtc gcggcgcgac ggcatcgtct ctccggcggg cgcgcgcggg    540
cgggagggag agcgcgacgc cgagctcgag ctcgactgca gccacatggg ctttgcggtc    600
agcgccaggg cttatcccaa gatcgtggag gcggtgcggg cgtttccgga aaacatccgt    660
tcgcgctga

```

```

<210> 8
<211> 222
<212> PRT

```

5 <213> Desconocido

```

<220>
<223> Proteína obtenida de muestra ambiental

```

```

<220>
<221> SITIO
<222> (91)...(100)
<223> Lipasas, sitio activo de serina. Prosite id = PS00120

```

10

<400> 8
Met Arg Leu Arg Glu Gly Gly Ala Leu Val Ser Arg Ala Tyr Arg Ala
1 5 10 15
Phe Gly Arg Leu Gly Glu Arg Gly Pro Ala Asp Gly Pro Pro Leu Met
20 25 30
Val Ile Pro Gly Phe Leu Ala Thr Asp Arg Thr Thr Leu Gly Leu Gln
35 40 45
Arg Ala Leu Ala Lys Gly Gly Tyr Lys Val Thr Gly Trp Gly Met Gly
50 55 60
Leu Asn Ser Gly Val Thr Glu Asp Ile Val Asp Arg Ile Ala Ala Arg
65 70 75 80
Val Glu Arg Phe Gly Ala Gly Arg Lys Val Ile Leu Val Gly Trp Ser
85 90 95
Leu Gly Gly Leu Tyr Ala Arg Val Val Ala Gln Glu Arg Pro Asp Leu
100 105 110
Val Asp Lys Val Val Thr Leu Gly Ser Pro Phe Ser Gly Asp Arg Arg
115 120 125
Arg Asn Asn Asn Val Trp Arg Leu Tyr Glu Phe Val Ala Gly His Pro
130 135 140
Val Asn Ser Pro Pro Ile Asp Lys Asp Pro Glu Val Lys Pro Pro Val
145 150 155 160
Pro Thr Leu Ala Ile Trp Ser Arg Arg Asp Gly Ile Val Ser Pro Ala
165 170 175
Gly Ala Arg Gly Arg Glu Gly Glu Arg Asp Ala Glu Leu Glu Leu Asp
180 185 190
Cys Ser His Met Gly Phe Ala Val Ser Ala Arg Ala Tyr Pro Lys Ile
195 200 205
Val Glu Ala Val Arg Ala Phe Pro Glu Asn Ile Arg Ser Arg
210 215 220

<210> 9
<211> 669
<212> DNA
5 <213> Desconocido

<220>
<223> DNA obtenido de muestra ambiental

```

<400> 9
atgaagccgc cgcccggatg gatgaagatc cgggagggcgg gctcgctcct cgcgcgcttc      60
taccgcgcgt tcggcaagct cgagccgcgc gggccggcgg acgggccgaa gctgatggtg      120
atccccgggtt tcctcgcggg cgacaggacg acgctcgggc tgcagcgagc gctggccggc      180
ggcggctacc gggtcgccgg ctgggggctg ggggtgaacc gcggcgtttc ggaggacgtg      240
gtcgaccgga tcggccagca agtcgcgcgg ttcggggcgg gcgagaaggt gatcctggtc      300
ggctggagcc ttggcgggct ttatgcgcgc gtggtggcgc aggagcggcc cgacctcgtc      360
gagaaggtgg tgaccttggg ctgcgccgtt tcgggcgacc ggcggcgcaa caacaatgtg      420
tggcggctct atgagtgggt ggctgggcat ccggtgaacg atccgccgat cgacaaggac      480
ccggcgaaga agccccgggt gccgacgctc gcgatctggt cgcggcgtga tgggatcgtg      540
gcggtcgaag gcgcgcgggg gcggccggag gagcgggatg ccgagctgga gatcgattgc      600
agccacatgg ggtttggggt cagcggcaag gcgtttcccc gaatcgtaga ggcgggtgaag      660
gggttctaa      669

```

```

<210> 10
<211> 222
<212> PRT
5 <213> desconocido

```

```

<220>
<223> Proteína obtenida de muestra ambiental

```

```

10 <220>
    <221> SITIO
    <222> (98)...(107)
    <223> Lipasas, sitio activo de serina. Prosite id = PS00120

```

<400> 10

Met Lys Pro Pro Pro Gly Trp Met Lys Ile Arg Glu Ala Gly Ser Leu
 1 5 10 15

Leu Ala Arg Phe Tyr Arg Ala Phe Gly Lys Leu Glu Pro Arg Gly Pro
 20 25 30

Ala Asp Gly Pro Lys Leu Met Val Ile Pro Gly Phe Leu Ala Gly Asp
 35 40 45

Arg Thr Thr Leu Gly Leu Gln Arg Ala Leu Ala Gly Gly Tyr Arg
 50 55 60

Val Ala Gly Trp Gly Leu Gly Val Asn Arg Gly Val Ser Glu Asp Val
 65 70 75 80

Val Asp Arg Ile Gly Gln Gln Val Ala Arg Phe Gly Ala Gly Glu Lys
 85 90 95

Val Ile Leu Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu Tyr Ala Arg Val Val
 100 105 110

Ala Gln Glu Arg Pro Asp Leu Val Glu Lys Val Val Thr Leu Gly Ser
 115 120 125

Pro Phe Ser Gly Asp Arg Arg Arg Asn Asn Asn Val Trp Arg Leu Tyr
 130 135 140

Glu Trp Val Ala Gly His Pro Val Asn Asp Pro Pro Ile Asp Lys Asp
 145 150 155 160

Pro Ala Lys Lys Pro Pro Val Pro Thr Leu Ala Ile Trp Ser Arg Arg
 165 170 175

Asp Gly Ile Val Ala Val Glu Gly Ala Arg Gly Arg Pro Glu Glu Arg
 180 185 190

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

Gly Lys Ala Phe Pro Arg Ile Val Glu Ala Val Lys Gly Phe
 210 215 220

<210> 11

<211> 570

<212> DNA

5 <213> desconocido

<220>

<223> DNA obtenido de muestra ambiental

```

<400> 11
gtgttggtgc tgccggcggt cctcgccaac gaccttccca cttcgcttct ccgcaggacg      60
ctgaaggcga acgggtttcg cccgttcggc tgggcgaacg gtttcaactt aggtgcacgg      120
ccggacacgc tccagcgctt gagcgcacgg ctcgatgcgg tggttcagga agcgggcagg      180
ccggttgcat tgatcggctg gagccttggc gggctttatg cccgagagct ggcgaaacgc      240
aggtcggctg aggtgtcggc agtgatcacg ctcggcacgc ccttctcggg tgacctcaga      300
cgcaacaacg cctggaagct gtacgagctc atcaacgatc atcctgtcga tgccccctcc      360
ttggatgttc aggtcgacgc gaagccaccc gtccgaacct tcgctttgtg gtcgcgtcgc      420
gacgggatcg tagcgccgc gagcgcgcac ggcattggagg gcgagttcga ccaggcgatc      480
gagctgcagt gcacgcacaa cgagatgggtc agtgatccgg aggccctctc cacgatcggt      540
accttgctgc gggaaaatgt tggctcctga      570

```

```

<210> 12
<211> 189
<212> PRT
5 <213> Desconocido

```

```

<220>

```

```

<223> Proteína obtenida de muestra ambiental

```

<400> 12

Met Leu Val Leu Pro Ala Phe Leu Ala Asn Asp Leu Pro Thr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Arg Arg Thr Leu Lys Ala Asn Gly Phe Arg Pro Phe Gly Trp Ala
20 25 30

Asn Gly Phe Asn Leu Gly Ala Arg Pro Asp Thr Leu Gln Arg Leu Ser
35 40 45

Ala Arg Leu Asp Ala Val Val Gln Glu Ala Gly Arg Pro Val Ala Leu
50 55 60

Ile Gly Trp Ser Leu Gly Gly Leu Tyr Ala Arg Glu Leu Ala Lys Arg
65 70 75 80

Arg Ser Ala Glu Val Ser Ala Val Ile Thr Leu Gly Thr Pro Phe Ser
85 90 95

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

Asp His Pro Val Asp Ala Pro Pro Leu Asp Val Gln Val Asp Ala Lys
115 120 125

Pro Pro Val Arg Thr Phe Ala Leu Trp Ser Arg Arg Asp Gly Ile Val
130 135 140

Ala Pro Ala Ser Ala His Gly Met Glu Gly Glu Phe Asp Gln Ala Ile
145 150 155 160

Glu Leu Gln Cys Thr His Asn Glu Met Val Ser Asp Pro Glu Ala Leu
165 170 175

Ser Thr Ile Val Thr Leu Leu Arg Glu Asn Val Gly Ser
180 185

<210> 13

<211> 807

<212> DNA

5 <213> desconocido

<220>

<223> DNA obtenido de muestra ambiental

```

<400> 13
gtgaatacag ccgacctatt gaagccacca cccgcaagca tgacagttct cgaggcgaga      60
gcgctgctgg acatatgcaa gatgagcgcc ccattggcgc gcttgctatt caaaaagaac      120
tcgccctggc gcaaacaacg ggttctcgta atacctggct ttggcgctga tgatcgctac      180
acctggccgt tgcgcaattt cgtccaggca cagggctatg ccacgactgg ctggggcctg      240
ggcaccaaca aggcaggtct caatatgccg catcaactat ccgacgtcca ccccagatgg      300
aagctaaaac ccaagacgcc gtaccgtggt gaggcgggag taccttacgt gattgaccgc      360
ttgatcgaaac ggtttgacga attggcatcg acggatccgc aaccatcgc acttataggt      420
tggagtctgg gtggtttcat ggcccgtgaa gttgcccagag agcgcccaa ccagggtgag      480
caggttatta ccctcggttc tcctgtcatc ggaggcccaa aatacaccct cgctgcatcg      540
gctttcatcc ggcgcaaata cgatttggac tgggtggagc aagtgatcgc ggagcgggaa      600
gatcgcccca ttactgttcc tattacagca atagtcagcc agtctgatgg catcgtcgga      660
tattcagcgg caatcgatca ccacagtccc gctgtgcagc atttacatat ggatgttgcc      720
catttgggct ttccttaca cagaggggtt tggtcagaaa tcgccaatgc gctcaactct      780
ttagagggtg agaaggagcg tgtttag                                         807

```

```

<210> 14
<211> 268
<212> PRT
5 <213> Desconocido

```

```

<220>
<223> proteína obtenida de muestra ambiental

```

```

<220>
10 <221> SITIO
    <222> (138)...(147)
    <223> Lipasas, sitio activo de serina. Prosite id = PS00120

```

<400> 14

Met Asn Thr Ala Asp Leu Leu Lys Pro Pro Pro Ala Ser Met Thr Val
1 5 10 15Leu Glu Ala Arg Ala Leu Leu Asp Ile Cys Lys Met Ser Ala Pro Leu
20 25 30Ala Arg Leu Leu Phe Lys Lys Asn Ser Pro Trp Arg Lys Gln Arg Val
35 40 45Leu Val Ile Pro Gly Phe Gly Ala Asp Asp Arg Tyr Thr Trp Pro Leu
50 55 60Arg Asn Phe Val Gln Ala Gln Gly Tyr Ala Thr Thr Gly Trp Gly Leu
65 70 75 80Gly Thr Asn Lys Ala Gly Leu Asn Met Pro His Gln Leu Ser Asp Val
85 90 95His Pro Arg Trp Lys Leu Lys Pro Lys Thr Pro Tyr Arg Gly Glu Ala
100 105 110Gly Val Pro Tyr Val Ile Asp Arg Leu Ile Glu Arg Phe Asp Glu Leu
115 120 125Ala Ser Thr Asp Pro Gln Pro Ile Ala Leu Ile Gly Trp Ser Leu Gly
130 135 140Gly Phe Met Ala Arg Glu Val Ala Arg Glu Arg Pro Asn Gln Val Ser
145 150 155 160Gln Val Ile Thr Leu Gly Ser Pro Val Ile Gly Gly Pro Lys Tyr Thr
165 170 175Leu Ala Ala Ser Ala Phe Ile Arg Arg Lys Tyr Asp Leu Asp Trp Val
180 185 190Glu Gln Val Ile Ala Glu Arg Glu Asp Arg Pro Ile Thr Val Pro Ile
195 200 205Thr Ala Ile Val Ser Gln Ser Asp Gly Ile Val Gly Tyr Ser Ala Ala
210 215 220Ile Asp His His Ser Pro Ala Val Gln His Leu His Met Asp Val Ala
225 230 235 240His Leu Gly Phe Pro Tyr Asn Thr Arg Val Trp Ser Glu Ile Ala Asn
245 250 255Ala Leu Asn Ser Leu Glu Val Glu Lys Glu Arg Val
260 265

<210> 15

<211> 804

<212> DNA

5 <213> Desconocido

<220>

<221> misc_feature

<223> DNA bacteriano

```

<400> 15
atggagctcg ccaaggtcac cgccctgatg aaggccaccg ccctcgagat cgcgatcctc    60
accggccacc tcgtcctcta cccctccggg atcgtggccg agcgctcgc ggccgcccc    120
tcttcaccgt cctccccgtc cgcggggccg acgggccgac gtccggtcgt cctgctgcac    180
ggtttcgtgg acaaccgctc ggtcttcgtc ctgctgcgcc gtgccctcac ccggagcggc    240
cgtgactgcg tcgagtcgct caactactcg ccgctcacct gcgacctgcy ggccgcccgc    300
gaactgctgg ggcgccgggt ggacgagatc cgcgcccgga ccggacacgc cgaggtcgac    360
atcgtcggcc acagcctggg cgggctcatc gcccgttatt acgtacagcg tctcggcggt    420
gacagccggg tgcgcacctt ggtcatgctc ggcaccccgc actccggcac caccgtggcc    480
cggctcgccg acgcgcatcc gctggtgcyg cagatgcggc cgggttcgga ggtgctgcgg    540
gagctcgccg cgccctcgcc cggctgccgt acccggttcg tgagcttctg gagcgacctc    600
gaccaggtga tggtgccggg ggacacggcc tgcctggacc accccgacct gctggtgcac    660
aacgtccggg tcagcgggat cggctcatct gcgctgccgg tccatccac ggtggcggcc    720
gggggtccgg aggccctcga cgcgagcggc gcgggggtcc cgggggtgcy ggaggagggg    780
cccggcgccg gcgccgtggc gtga                                           804

```

```

<210> 16
<211> 267
<212> PRT
5 <213> desconocido

```

```

<220>
<221> misc_feature
<223> Proteína bacteriana

```

```

10 <220>
    <221> SITIO
    <222> (120)...(129)
    <223> Lipasas, sitio activo de serina. Prosite id = PS00120

```

<400> 16
 Met Glu Leu Ala Lys Val Thr Ala Leu Met Lys Ala Thr Ala Leu Glu
 1 5 10 15
 Ile Ala Ile Leu Thr Gly His Leu Val Leu Tyr Pro Ser Gly Ile Val
 20 25 30
 Ala Glu Arg Leu Ala Ala Ala Pro Ser Ser Pro Ser Ser Pro Ser Ala
 35 40 45
 Gly Pro Thr Gly Arg Arg Pro Val Val Leu Leu His Gly Phe Val Asp
 50 55 60
 Asn Arg Ser Val Phe Val Leu Leu Arg Arg Ala Leu Thr Arg Ser Gly
 65 70 75 80
 Arg Asp Cys Val Glu Ser Leu Asn Tyr Ser Pro Leu Thr Cys Asp Leu
 85 90 95
 Arg Ala Ala Ala Glu Leu Leu Gly Arg Arg Val Asp Glu Ile Arg Ala
 100 105 110
 Arg Thr Gly His Ala Glu Val Asp Ile Val Gly His Ser Leu Gly Gly
 115 120 125
 Leu Ile Ala Arg Tyr Tyr Val Gln Arg Leu Gly Gly Asp Ser Arg Val
 130 135 140
 Arg Thr Leu Val Met Leu Gly Thr Pro His Ser Gly Thr Thr Val Ala
 145 150 155 160
 Arg Leu Ala Asp Ala His Pro Leu Val Arg Gln Met Arg Pro Gly Ser
 165 170 175
 Glu Val Leu Arg Glu Leu Ala Ala Pro Ser Pro Gly Cys Arg Thr Arg
 180 185 190
 Phe Val Ser Phe Trp Ser Asp Leu Asp Gln Val Met Val Pro Val Asp
 195 200 205
 Thr Ala Cys Leu Asp His Pro Asp Leu Leu Val His Asn Val Arg Val
 210 215 220
 Ser Gly Ile Gly His Leu Ala Leu Pro Val His Pro Thr Val Ala Ala
 225 230 235 240
 Gly Val Arg Glu Ala Leu Asp Ala Ser Gly Ala Gly Val Pro Gly Val
 245 250 255
 Arg Glu Glu Gly Pro Gly Ala Gly Ala Val Ala
 260 265

<210> 17
 <211> 798
 <212> DNA
 <213> Desconocido

5

<220>
 <223> DNA obtenido de muestra ambiental

<400> 17
 gtggccgccc cggacagcgg gacggcggaa gggcaaaggc ttcggccgcc gagcctgttc 60
 ctgatgctgg ccgaggcgag gggcttgctc gaactgaact cgagcctgtt gttgtcgccg 120
 ctgttggttc gggcgccgaa gggcgacgga catccggtgc tggcgctgcc gggctttctc 180
 gccagcgatc tgtcgatggc gccgatgcgg cgctatctga aagaactcgg ctacgatgcc 240
 catgcgtgga acatgggccc caatctcggc ggcgtcgcgt ccaagcgcca agccttgccg 300
 gacctgttgc ggcgcattta cagccagacg ggccgcaagg tcagcctggt cggttgaggt 360
 ctggcgggcg tctatgcgcg cgatctcgtt ttgcaggcgc ccgacatggt gcgttccgtg 420
 atcacgctcg gcagtcggtt tgccagcgac atcaggcgga ccaacgccac gcggctctac 480
 gaggcgctgt cgggagaaaag ggtcgacgac aatccggagt taacagcggc gatcgccggc 540
 gacctgccgg tgccggcgac ctcgatctat tcccgtagcg acggtatcgt gaactggcac 600
 accagcctgc tgcgtccttc cgcaacggct gaaaacatcg aggtttactt cgccagccat 660
 atcgggctcg gcgtcaaccc ggcagcgctg tgggcggtgg ccgaccgcct ggcgcagccc 720
 gagggggaat ttaagcattt tgaccggtcg ggtccctttg ccattgccta tggccccctt 780
 gaaaatgcac aatcctga 798

<210> 18
 <211> 265
 <212> PRT
 5 <213> desconocido

<220>
 <223> Proteína obtenida de muestra ambiental

<220>
 <221> SITIO
 10 <222> (33)...(36)
 <223> Sitio de N-glucosilación. Prosite id = PS00001

<220>
 <221> SITIO
 <222> (115)...(124)
 15 <223> Lipasas, sitio activo de serina. Prosite id = PS00120

<220>
 <221> SITIO
 <222> (157)...(160)
 <223> Sitio de N-glucosilación. Prosite id = PS00001

<400> 18

Met Ala Ala Ala Asp Ser Gly Thr Ala Glu Gly Gln Arg Leu Arg Pro
1 5 10 15Pro Ser Leu Phe Leu Met Leu Ala Glu Ala Arg Gly Leu Leu Glu Leu
20 25 30Asn Ser Ser Leu Leu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Arg Ala Pro Lys Gly
35 40 45Asp Gly His Pro Val Leu Ala Leu Pro Gly Phe Leu Ala Ser Asp Leu
50 55 60Ser Met Ala Pro Met Arg Arg Tyr Leu Lys Glu Leu Gly Tyr Asp Ala
65 70 75 80His Ala Trp Asn Met Gly Arg Asn Leu Gly Gly Val Ala Ser Lys Arg
85 90 95Glu Ala Leu Arg Asp Leu Leu Arg Arg Ile Tyr Ser Gln Thr Gly Arg
100 105 110Lys Val Ser Leu Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Val Tyr Ala Arg Asp
115 120 125Leu Ala Leu Gln Ala Pro Asp Met Val Arg Ser Val Ile Thr Leu Gly
130 135 140Ser Pro Phe Ala Ser Asp Ile Arg Ala Thr Asn Ala Thr Arg Leu Tyr
145 150 155 160Glu Ala Leu Ser Gly Glu Arg Val Asp Asp Asn Pro Glu Leu Thr Ala
165 170 175Ala Ile Ala Gly Asp Leu Pro Val Pro Ala Thr Ser Ile Tyr Ser Arg
180 185 190Thr Asp Gly Ile Val Asn Trp His Thr Ser Leu Leu Arg Pro Ser Ala
195 200 205Thr Ala Glu Asn Ile Glu Val Tyr Phe Ala Ser His Ile Gly Leu Gly
210 215 220Val Asn Pro Ala Ala Leu Trp Ala Val Ala Asp Arg Leu Ala Gln Pro
225 230 235 240Glu Gly Glu Phe Lys His Phe Asp Arg Ser Gly Pro Phe Ala Ile Ala
245 250 255Tyr Gly Pro Pro Glu Asn Ala Gln Ser
260 265

<210> 19

<211> 798

<212> DNA

5 <213> desconocido

<220>

<223> DNA obtenido de muestra ambiental

<400> 19
 atgccggagc gaaacgaagc gcaggccccc ccgcgtcttc gtccgccggg gctcgggctg 60
 ttccctcgccg aagcgcgggg cattttcgag ctcaacgcga gcctgttgct gtcgccgctt 120
 ctggttgccg cgccgcgcgg cgacggccat ccggtgctgg cgttgccggg ctttcttgcc 180
 agtgatctat cgatggcgcc gttgcgccgc tacctcaccg agctcggcta cgacaccac 240
 gcctggcgca tgggcccga tgtcggcggc atcgcgaaga tgcggatcgc gctgctcgag 300
 cggctcacgc agatccatgc cgagtgcggc cgcaagggtc cgattgtcgg ctggagtctc 360
 ggcggcgtct atgcgcgcga cctcgcgttg caggcgcccc agatgggtgc ctacgtcgtc 420
 accctcggca gcccttcgc cagcgacgtc cgcgccacca atgcgacgcg gctctatgag 480
 gcgatgtcgg gcgaaacggt cggcgacaat gtcgacctc tgcaggcgat tgccggcgac 540
 ctgccggttc ccgtgacctc gatctattcg aagagcgacg gcacgtgaa ctggcggacc 600
 tgcctgctgc gcccgccgc gaccgccgag aatatcgagg tctatttcgc gagccatgtc 660
 ggcacggcg tcaatccggc cgcgctgtgg gcgatcgcgg accggctggc ccagcgggaa 720
 ggcgaattcc gcccttcga ccggtccggt ctttttgcca ttgcctacgc gccccggaa 780
 caggcacaat cgatctga 798

<210> 20
 <211> 265
 <212> PRT
 5 <213> Desconocido

<220>
 <223> Proteína obtenida de muestra ambiental

<220>
 10 <221> SITIO
 <222> (32)...(35)
 <223> sitio de N-glucosilación. Prosite id = PS00001

<220>
 <221> SITIO
 <222> (114)...(123)
 15 <223> Lipasas, sitio activo de serina. Prosite id = PS00120

<220>
 <221> SITIO
 <222> (156)...(159)
 <223> Sitio de N=glucosilación. Prosite id = PS00001

<400> 20

Met Pro Glu Arg Asn Glu Ala Gln Ala Pro Pro Arg Leu Arg Pro Pro
1 5 10 15Gly Leu Gly Leu Phe Leu Ala Glu Ala Arg Gly Ile Phe Glu Leu Asn
20 25 30Ala Ser Leu Leu Leu Ser Pro Leu Leu Leu Arg Ala Pro Arg Gly Asp
35 40 45Gly His Pro Val Leu Ala Leu Pro Gly Phe Leu Ala Ser Asp Leu Ser
50 55 60Met Ala Pro Leu Arg Arg Tyr Leu Thr Glu Leu Gly Tyr Asp Thr His
65 70 75 80Ala Trp Arg Met Gly Arg Asn Val Gly Gly Ile Ala Lys Met Arg Ile
85 90 95Ala Leu Leu Glu Arg Leu Thr Gln Ile His Ala Glu Cys Gly Arg Lys
100 105 110Val Ser Ile Val Gly Trp Ser Leu Gly Gly Val Tyr Ala Arg Asp Leu
115 120 125Ala Leu Gln Ala Pro Glu Met Val Arg Tyr Val Val Thr Leu Gly Ser
130 135 140Pro Phe Ala Ser Asp Val Arg Ala Thr Asn Ala Thr Arg Leu Tyr Glu
145 150 155 160Ala Met Ser Gly Glu Thr Val Gly Asp Asn Val Asp Leu Val Gln Ala
165 170 175Ile Ala Gly Asp Leu Pro Val Pro Val Thr Ser Ile Tyr Ser Lys Ser
180 185 190Asp Gly Ile Val Asn Trp Arg Thr Cys Leu Leu Arg Pro Ser Ala Thr
195 200 205Ala Glu Asn Ile Glu Val Tyr Phe Ala Ser His Val Gly Ile Gly Val
210 215 220Asn Pro Ala Ala Leu Trp Ala Ile Ala Asp Arg Leu Ala Gln Arg Glu
225 230 235 240Gly Glu Phe Arg Pro Phe Asp Arg Ser Gly Pro Phe Ala Ile Ala Tyr
245 250 255Ala Pro Pro Glu Gln Ala Gln Ser Ile
260 265

<210> 21

<211> 65

<212> DNA

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Constructo sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)...(65)
 <223> Enlazador de clonación con sitios de clonación

<400> 21
tctagataac gagggcaaaa ccatgggagg atccagatct catcaccatc accatcacta 60
agctt 65

<210> 22
 <211> 684
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Generado sintéticamente

<400> 22
atgctcaagc cccacacctta cggccgtctg ctccgcgaac tggctgatat cccggcgatc 60
gtgactgctc cggtccgcgg cgcagccaaa atgggcaaac tggcagatgg cgagccggta 120
ctggtgctgc ccggcttcct ggcggacgac aacgcgacca gcgtgctgcg gaagaccttc 180
gaggctgcgg gctttgcgtg cagcggctgg gaaaagggt tcaacctcgg cattcgtggc 240
gacctcatgg actacctggt cgaccgcctg cgcgccgtga gcgaggccgc gggggggcag 300
aaggtaatcg tggtcggctg gtccctcggc ggctctctacg cccgggagtt gggccacaag 360
gccccgaac tgatccgtat ggctcgtcacg ctccgctccc cgttcgccgg cgacctccac 420
gcgaaccatg cctggaagat ctacgaggcc atcaactccc acacggtcga caacctgccg 480
atcccgcgcg atttccagat taagccgccg gtgcatacca tcgccgtgtg gagcccgtc 540
gacgggggtg tggccccgga gacgagcgaa ggcagccccg agcagagcga cgagcgcttg 600
gagctggccg tgaccacat gggctttgcg gctagcaaga ccggggcgga ggcagtggtc 660
cgcttggctg ccgcccgcct ctga 684

<210> 23
 <211> 684
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Generado sintéticamente

<400> 23
atgctcaagc cccacacctta cggccgtctg ctccgcgaac tggctgatat cccggcgatc 60
gtgactgctc cggtccgcgg cgcagccaaa atgggcaaac tggctgatgg cgagccggta 120
ctggtgctgc ccggcttcct ggcggacgac aacgcgacca gcgtgctgcg gaagaccttc 180
gaggctgcgg gctttgcgtg cagcggctgg gaaaagggt tcaacctcgg cattcgtggc 240
gacctcatgg actacctggt cgaccgcctg cgcgccgtga gcgaggccgc gggggggcag 300
aaggttatcg tggtcggctg gactctcggc ggctctctacg cccgggagct tggccacaag 360
gccccgaac tgatcaggat ggctcgtcacg ctccgctctc cgttcgccgg cgacctccac 420
gcgaaccatg cctggaagat ctacgaggcc atcaactccc acacggtcga caacctgccg 480
atcccgcgcg atttccagat taagccgccg gtgcatacca tcgccgtgtg gagcccgtc 540
gacgggggtg tggccccgga gacgagcgaa ggcagccccg agcagagcga cgagcgcttg 600
gagctggccg tgaccacat gggctttgcg gctagcaaga ccggggcgga ggcagtggtc 660
cgcttggctg ccgcccgcct ctga 684

	<210>	24		
	<211>	61		
	<212>	DNA		
	<213>	Secuencia artificial		
5	<220>			
	<223>	Generado sintéticamente		
	<400>	24		
		tcgaccgtgt ggctgttgat cgcctcgtag atcttccaaa tatggttggc gtggaggtcg	60	
		c	61	
10	<210>	25		
	<211>	61		
	<212>	DNA		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Generado sintéticamente		
	<400>	25		
		tcgaccgtgt ggctgttgat aatctcgtag atcttccaaa tatggttggc gtggaggtcg	60	
		c	61	
15	<210>	26		
	<211>	61		
	<212>	DNA		
	<213>	Secuencia artificial		
20	<220>			
	<223>	Generado sintéticamente		
	<400>	26		
		tcgaccgtgt ggctgttgat aatgtggtag atcttccaaa tatggttggc gtggaggtcg	60	
		c	61	
25	<210>	27		
	<211>	61		
	<212>	DNA		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Generado sintéticamente		
	<400>	27		
		tcgaccgtgt ggctgttgat cgcattggtag atcttccaaa tatggttggc gtggaggtcg	60	
		c	61	
30	<210>	28		
	<211>	61		
	<212>	DNA		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Generado sintéticamente		
	<400>	28		
		tcgaccgtgt ggctgttgat aatctcgtag atcttccacg catggttggc gtggaggtcg	60	
35		c	61	
	<210>	29		
	<211>	43		
	<212>	DNA		
	<213>	Secuencia artificial		

	<220>		
	<223>	Generado sintéticamente	
	<400>	29	
		ttgggctcga gtcagagccg agacgcgacc agccggacca cag	43
5	<210>	30	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Generado sintéticamente	
10	<400>	30	
		tggtgctgcc cggcttcctg tgtegtgaca acgccacctc ggtgct	46
	<210>	31	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
15	<220>		
	<223>	Generado sintéticamente	
	<400>	31	
		tggtgctgcc cggcttcctg tgtgacgaca acgccacctc ggtgct	46
20	<210>	32	
	<211>	46	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Generado sintéticamente	
	<400>	32	
		tggtgctgcc cggcttcctg gcccgtagaca acgccacctc ggtgct	46
25	<210>	33	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
30	<220>		
	<223>	Generado sintéticamente	
	<400>	33	
		tcggcggcct ctatgcgcgc attctgggcc acaaggcgcc cga	43
35	<210>	34	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	
	<220>		
	<223>	Generado sintéticamente	
	<400>	34	
		tcggcggcct ctatgcgcgc cttctgggcc acaaggcgcc cga	43
40	<210>	35	
	<211>	43	
	<212>	DNA	
	<213>	Secuencia artificial	

	<220>			
	<223>	generado sintéticamente		
	<400>	35		
		tcggcggcct ctatgcgcgc aatctgggcc acaaggcgcc cga	43	
5	<210>	36		
	<211>	61		
	<212>	DNA		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Generado sintéticamente		
	<400>	36		
		tcgaccgtgt ggctgttgat aatatggtag atcttcacg catggttggc gtggaggtcg	60	
10		c	61	
	<210>	37		
	<211>	61		
	<212>	DNA		
	<213>	Secuencia artificial		
15	<220>			
	<223>	Generado sintéticamente		
	<400>	37		
		tcgaccgtgt ggctgttgat cgcattgtag atcttcacg catggttggc gtggaggtcg	60	
		c	61	
	<210>	38		
	<211>	43		
20	<212>	DNA		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	Generado sintéticamente		
	<400>	38		
		ggcgaccaca ccgcgatggt atgcaccggc ggcttaatat gga	43	
25	<210>	39		
	<211>	43		
	<212>	DNA		
	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
30	<223>	Generado sintéticamente		
	<400>	39		
		ggcgaccaca ccgcgatggt aagcaccggc ggcttaatat gga	43	
	<210>	40		
	<211>	43		
	<212>	DNA		
35	<213>	Secuencia artificial		
	<220>			
	<223>	generado sintéticamente		
	<400>	40		
		ttcgtggcga cctcgtggac tatctggtcg accggctgcg ggc	43	
40	<210>	41		
	<211>	43		

	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Generado sintéticamente	
5	<400> 41 ctgcgaaaat gggcaaaactg gctgatggcg agccggtact ggt	43
	<210> 42	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Generado sintéticamente	
	<400> 42 tgctcgggcg agccttccga ggtctccggc gccacaaccc cgtcgagcgg cgaccaca	58
	<210> 43	
	<211> 58	
15	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Generado sintéticamente	
	<400> 43 tgctcgggcg agccttccga cgtctccggc gccacaaccc cgtcgagcgg cgaccaca	58
20	<210> 44	
	<211> 58	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Generado sintéticamente	
	<400> 44	
	<400> 44 tgctcgggcg agccttccga cgtctccggc gccaccaccc cgtcgagcgg cgaccaca	58
	<210> 45	
	<211> 60	
30	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> generado sintéticamente	
	<400> 45 aggcggccgg tggtcagaag gttatcgtgg tcggctggag cctcggcggc ctctatgcgc	60
35	<210> 46	
	<211> 60	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Generado sintéticamente	
	<400> 46 aggcggccgg tggtcagaag gttatcgtgg tcggctggag tctcggcggc ctctatgcgc	60

<210> 47
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Generado sintéticamente

<400> 47
aggcggccgg tggtcagaag gtgatcgtgg tcggctggag tctcggcggc ctctatgcgc 60

10 <210> 48
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Generado sintéticamente

<400> 48
tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacg accatccgga tcaattcggg cgccttgtgg 60

15 <210> 49
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Generado sintéticamente

<400> 49
tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacg accatcctga tcaattcggg cgccttgtgg 60

25 <210> 50
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> generado sintéticamente

<400> 50
tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacc accatcctga tcaattcggg cgccttgtgg 60

30 <210> 51
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> generado sintéticamente

<400> 51
tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacg accatcctga tcagttcggg cgccttgtgg 60

35 <210> 52
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> generado sintéticamente

<400> 52
tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacc accatcctga tcaattcggg cgccttgtgg 60

<210> 53
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> generado sintéticamente

<400> 53
tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacg accatccgga tcagttcggg cgccttggtg 60

<210> 54
 <211> 60
 10 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Generado sintéticamente

<400> 54
tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacc accatccgga tcagttcggg cgccttggtg 60

15 <210> 55
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> generado sintéticamente

<400> 55
tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacg accatcctga tcaattcggg cgccttggtg 60

<210> 56
 <211> 60
 <212> DN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> generado sintéticamente

<400> 56
tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacg accatcctga tcagttcggg cgccttggtg 60

30 <210> 57
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Generado sintéticamente

<400> 57
tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacc accatccgga tcaattcggg cgccttggtg 60

35 <210> 58
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Generado sintéticamente

<400> 58
tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacc accatcctga tcagttcggg cgccttggtg 60

	<210> 59		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> generado sintéticamente		
	<400> 59		
	tcgcccgcga acggagagcc gagcgtgacc accatccgga tcaattcggg cgccttgagg	60	
	<210> 60		
	<211> 60		
10	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Generado sintéticamente		
	<400> 60		
	tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacc accatccgga tcaattcggg cgccttgagg	60	
15	<210> 61		
	<211> 60		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> generado sintéticamente		
	<400> 61		
	tcgcccgcga acggactgcc gagcgtgacc accatccgga tcagttcggg cgccttgagg	60	
	<210> 62		
	<211> 43		
	<212> DNA		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> generado sintéticamente		
	<400> 62		
	tgggtgctgcc cggcttcctg tgtgacgaca acgccacctc ggt	43	
	<210> 63		
30	<211> 41		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> generado sintéticamente		
	<400> 63		
35	ttcgtggcga cctcgtggac tatctggctg accggctgcg g	41	
	<210> 64		
	<211> 47		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> Generado sintéticamente		
	<400> 64		
	tcggcattcg tggcgacctc atggactatc tggtcgaccg gctgcgg	47	

	<210> 65		
	<211> 48		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
5	<220>		
	<223> Generado sintéticamente		
	<400> 65		
	ctggctcgacc ggctgcgggc tgtgtcgaag gcggccggtg gtcagaag	48	
	<210> 66		
	<211> 43		
10	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Generado sintéticamente		
	<400> 66		
	tcggg'gcct tgtggccaag aatgcgcgca tagaggccgc cga	43	
15	<210> 67		
	<211> 43		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
20	<223> Generado sintéticamente		
	<400> 67		
	tcggg'gcct tgtggccaag attgcgcgca tagaggccgc cga	43	
	<210> 68		
	<211> 43		
	<212> DNA		
25	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> generado sintéticamente		
	<400> 68		
	tcggg'gcct tgtggccaag aaggcgcgca tagaggccgc cga	43	
	<210> 69		
30	<211> 44		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Generado sintéticamente		
	<400> 69		
35	cggcttaatc tggaaatccc gaccgatcgg caggttgtcg accg	44	
	<210> 70		
	<211> 43		
	<212> DNA		
	<213> Secuencia artificial		
40	<220>		
	<223> generado sintéticamente		
	<400> 70		
	ggcgaccaca ccgcgatggt atgcaccggc ggcttaatct gga	43	

<210> 71
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Constructo sintético

<400> 71
ttgggctcga gtcagagccg agacgcgacc agccggacca cag

43

REIVINDICACIONES

1. Un método para hidrolizar un aceite o una grasa, que comprende las etapas de:

(a) obtener una composición que comprende un aceite o una grasa, en donde el aceite o la grasa puede ser hidrolizado por un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos aislados, sintéticos y recombinantes que tienen actividad de una hidrolasa y dicho polipéptido o bien

i. está codificado por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:1 de longitud total y donde el ácido nucleico codifica por lo menos un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa y el polipéptido tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y adicionalmente tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 9, la Tabla 16 o la Tabla 23, o una de sus secuencias complementarias; o

ii. tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:2 de longitud total, y tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y tiene adicionalmente uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 9, la Tabla 16 o la Tabla 23, o

iii. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; 1151G; 1151A; V163R; D164R, o una de sus combinaciones, o

iv. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E1 16T; E1 16G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q, o una de sus combinaciones;

(b) añadir el polipéptido de la etapa (a) a la composición que comprende dicho aceite o grasa en una cantidad suficiente y bajo condiciones suficientes para causar la hidrólisis del aceite o la grasa, hidrolizando así el aceite o la grasa.

2. El método según la reivindicación 1, en donde dicho aceite o grasa hidrolizado tiene un contenido de grasa saturada inferior que dicho aceite o grasa antes de la hidrólisis.

3. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha grasa o aceite hidrolizado tiene un contenido de grasa trans inferior que dicha grasa o aceite antes de la hidrólisis.

4. El método según las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho aceite o grasa comprende un aceite de alga, un aceite animal, un aceite vegetal, un aceite que tiene una composición de ácido graso alterada, un aceite poco saturado, un aceite de pescado o una combinación de éstos.

5. El método según la reivindicación 4, en donde dicho aceite comprende aceite de *Neochloris oleoabundans*, aceite de *Scenedesmus dimorphus*, aceite de *Euglena gracilis*, aceite de *Phaeodactylum tricomutum*, aceite de *Pleurochrysis carterae*, aceite de *Prymnesium parvum*, aceite de *Tetraselmis chui*, aceite de *Tetraselmis suecica*, aceite de *Isochrysis galbana*, aceite de *Nannochloropsis salina*, aceite de *Botryococcus braunii*, aceite de *Dunaliella tertiolecta*, aceite de especies *Nannochloris*, aceite de *Spirulina*, aceite de *Chlorophyceae*, aceite de *Bacilliarophy*, aceite de canola, aceite de ricino o aceite de coco, aceite de coriandro, aceite de maíz, aceite de semilla de algodón, aceite de avellana, otros aceites de nuez, aceite de cáñamo, aceite de lino, aceite de hierba de la pradera, aceite de oliva, aceite de palma, aceite de palmiste, aceite de cacahuete, aceite de colza, aceite de salvado de arroz, aceite de cártamo, aceite de sasanqua, aceite de sésamo, aceite de soja, aceite de semilla de girasol, aceite de resina, aceite de tsubaki, grasa de sebo, manteca de cerdo, grasa de mantequilla, grasa de pollo, o una mezcla de cualquiera de dichas grasas o aceites.

6. El método según la reivindicación 4, en donde el ácido graso alterado comprende aceite con alto contenido oleico, aceite con bajo contenido linolénico o una de sus combinaciones; o

donde el aceite poco saturado comprende aceite de canola de alto contenido oleico, aceite de soja de bajo contenido linolénico, aceite de girasol de alto contenido esteárico o una combinación de éstos; o

donde el aceite de pescado comprende aceite de pez vela, aceite de hígado de bacalao, aceite de pargo alazán, aceite de sardina, aceite de arenque, aceite de sábalo o una de sus combinaciones.

7. El método según la reivindicación 1, en donde dichas grasas o aceites comprenden moléculas que tienen un esqueleto de triacilglicérido y donde durante la hidrólisis los ácidos grasos se extraen de por lo menos uno de los esqueletos de triacilglicérido.

8. El método según la reivindicación 7, en donde dichos ácidos grasos comprenden uno o más de ácido acético, butírico, caproico, caprílico, undecanoico, láurico, mirístico, pentadecanoico, palmítico, margárico, esteárico, araquídico o behénico.
- 5 9. El método según la reivindicación 7, en donde dichos ácidos grasos se eliminan selectivamente de una posición Sn1, Sn2 o Sn3 en el esqueleto del triacilglicérido.
- 10 10. El método según la reivindicación 1, en donde dicho aceite o grasa está presente en un pienso o en un alimento, y dicha hidrólisis se alcanza antes del consumo de dicho pienso o alimento por parte de un animal o un individuo.
11. El método según la reivindicación 1, en donde dicho aceite o grasa comprende uno o más de un triacilglicerol, un diacilglicerol o un monoacilglicerol, y donde dicho polipéptido de la etapa (a) se pone en contacto con dicho aceite o grasa bajo condiciones en las que dicho polipéptido hidroliza uno o más de dichos triacilglicerol, diacilglicerol o monoacilglicerol.
12. El método según la reivindicación 11, en donde dicha hidrólisis causa que la cantidad de triacilglicerol, diacilglicerol o monoacilglicerol en la composición disminuya.
- 15 13. El método según la reivindicación 1, en donde el aceite o grasa comprende un éster de glicerol de un ácido graso polinsaturado.
14. El método según la reivindicación 1, en donde dicha grasa o aceite hidrolizado comprende cualquiera de uno o más de una grasa o aceite de baja saturación, un aceite o grasa no trans, un lípido que contiene ácidos grasos esenciales, un lípido que contiene ácidos grasos monoinsaturados, un lípido que contiene fosocolina, un lípido que contiene fososerina, un lípido que contiene un fitosterol, un 1,3- diacilglicérido, un 2-monoacilglicérido y un triacilglicérido.
- 20 15. El método según la reivindicación 1, en donde dicha composición comprende una composición dietaria a base de leche o vegetales, en donde el polipéptido puede hidrolizar el aceite o la grasa en la composición, reduciendo de este modo su contenido de grasa.
16. Un método para síntesis biocatalítica de un lípido estructurado que comprende las siguientes etapas:
- 25 (a) proveer un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos sintéticos o recombinantes aislados que tienen actividad de una hidrolasa y donde dicho polipéptido o bien
- 30 i. está codificado por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:1 de longitud total y donde el ácido nucleico codifica por lo menos un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa y el polipéptido tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y adicionalmente tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez once o doce, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 9, la Tabla 16 o la Tabla 23, o una de sus secuencias complementarias; o
- 35 ii. tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:2 de longitud total, y tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y adicionalmente tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez once o doce, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 9, la Tabla 16 o la Tabla 23, o
- 40 iii. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R, o una de sus combinaciones, o
- iv. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; 218H; A218S; V223A; A225M; A225Q, o una de sus combinaciones;
- 45 (b) proveer una composición que comprende un triacilglicérido (TAG);
- (c) contactar el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) bajo condiciones en las que el polipéptido hidroliza un residuo acilo en la posición Sn2 del triacilglicérido (TAG), produciendo así un 1,3- diacilglicérido (DAG);
- (d) proveer un éster R1;
- 50 (e) proveer una hidrolasa específica de R1, y

(f) contactar el 1,3-DAG de la etapa (c) con el éster R1 de la etapa (d) y la hidrolasa específica de R1 de la etapa (e) bajo condiciones en las que la hidrolasa específica de R1 cataliza la esterificación de la posición Sn2, produciendo de este modo el lípido estructurado.

17. El método según la reivindicación 16, en donde la hidrolasa específica de R1 es una lipasa específica de Sn2.

- 5 18. El método según la reivindicación 16, en donde dicho éster R1 comprende un ácido graso de saturación inferior que dicho residuo acilo hidrolizado; o

donde dicho éster R1 comprende uno o más de un ácido graso omega-3, un ácido graso omega-6, un ácido graso omega-9, un ácido graso monoinsaturado, un grupo fosfo, un éster de fitosterol u orizanol; o

- 10 donde dicho éster R1 comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en ácido alfa-linolénico, ácido estearidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido gamma-linolénico, ácido dihomo-gamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido palmoleico, colina, serina, beta-sitosterol, coumestrol y dietilstilbestrol.

19. Un método para síntesis biocatalítica de un lípido estructurado que comprende las etapas de:

- 15 (a) proveer un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos sintéticos y recombinantes aislados que tienen actividad de una hidrolasa y dicho polipéptido o bien

- 20 i. está codificado por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 85% identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:1 de longitud total y donde el ácido nucleico codifica por lo menos un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa y el polipéptido tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y adicionalmente tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez once o doce, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 9, la Tabla 16 o la Tabla 23, o una de sus secuencias complementarias; o

- 25 ii. tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:2 de longitud total, y tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y adicionalmente tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez once o doce, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 9, la Tabla 16 o la Tabla 23, o

iii. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R, o una de sus combinaciones, o

- 30 iv. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q, o una de sus combinaciones;

(b) proveer una composición que comprende un triacilglicérido (TAG);

- 35 (c) poner en contacto el polipéptido de la etapa (a) con la composición de la etapa (b) bajo condiciones en las que el polipéptido hidroliza un residuo acilo en la posición Sn1 o Sn3 del triacilglicérido (TAG), produciendo de este modo un 1,2-DAG o 2,3-DAG; y

(d) promover la migración de acilo en el 1,2-DAG o 2,3-DAG de la etapa (c) bajo condiciones cinéticamente controladas, produciendo así un 1,3-DAG.

- 40 20. El método según la reivindicación 19, que comprende además la etapa de proveer un éster R1 y una lipasa específica de R1, y poner en contacto el 1,3-DAG de la etapa (d) con el éster R1 y la lipasa específica de R1 bajo condiciones en las que la lipasa específica de R1 cataliza la esterificación de la posición Sn2, produciendo así un lípido estructurado.

- 45 21. El método según la reivindicación 20, en donde dicha lipasa específica de R1 es una lipasa específica de Sn1 o Sn3.

22. El método según la reivindicación 16 o la reivindicación 20, en donde dicho lípido estructurado se selecciona del grupo que consiste en una alternativa a la manteca de cacao (CBA), una manteca de cacao sintética, una manteca de cacao natural, 1,3-dipalmitoil-2-oleoilglicerol (POP), 1,3-distearoil-2-oleoilglicerol (SOS), 1-palmitoil-2-oleoil-3-stearoilglicerol (POS) y 1-oleoil-2,3-dimristoilglicerol (OMM).

- 50 23. El método según la reivindicación 20, en donde dicho éster R1 comprende un ácido graso de saturación inferior que dicho residuo acilo hidrolizado.

- 24 El método según la reivindicación 23, en donde dicho éster R1 comprende uno o más de ácido graso omega-3, un ácido graso omega-6, un ácido graso mono-insaturado, un grupo fosfo, un grupo fitosterol y orizanol.
- 5 25. El método según la reivindicación 23, en donde dicho éster R1 comprende un resto seleccionado del grupo que consiste en ácido alfa-linolénico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico, ácido gamma-linolénico, ácido dihomogamma-linolénico, ácido araquidónico, ácido oleico, ácido palmoleico, colina, serina, beta-sitosterol, coumestrol, dietilstilbestrol y orizanol.
26. El método según la reivindicación 19, en donde la etapa (d) comprende además el uso de resinas de intercambio iónico.
- 10 27. El método según la reivindicación 19, en donde dichas condiciones cinéticamente controladas de la etapa (d) comprenden condiciones de no equilibrio que resultan en la producción de un producto final que tiene más de una relación 2:1 de 1,3-DAG a 2,3-DAG.
28. El método según la reivindicación 16 o la reivindicación 20, en donde dicho lípido estructurado sintetizado tiene un contenido de grasa saturada inferior que dicho triacilglicérido; o
- donde dicho lípido estructurado sintetizado tiene un contenido de grasa trans inferior que dicho triacilglicérido.
- 15 29. Un método para catalizar una reacción de interesterificación para producir triacilglicéridos nuevos, que comprende las siguientes etapas:
- (a) proveer una composición que comprende un polipéptido que tiene actividad específica de una lipasa 1,3, donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos sintéticos o recombinantes aislados que tienen actividad de una hidrolasa y dicho polipéptido o bien
- 20 i. está codificado por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:1 de longitud total y donde el ácido nucleico codifica por lo menos un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa y el polipéptido tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y adicionalmente tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, en la Tabla 4, en la Tabla 9, en la Tabla 16 o en la Tabla 23, o
- 25 una de sus secuencias complementarias; o
- ii. tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:2 de longitud total, y tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y adicionalmente tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, en la Tabla 4, en la Tabla 9, en la Tabla 16 o en la Tabla 23, o
- 30 iii. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos D61A;
- D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; I151G; I151A; V163R; D164R, o una de sus combinaciones, o
- 35 iv. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q, o una de sus combinaciones;
- (b) proveer una mezcla de triacilglicéridos y ácidos grasos libres;
- (c) tratar la composición de la etapa (b) con el polipéptido bajo condiciones en las que el polipéptido puede catalizar el intercambio de ácidos grasos libres con los grupos acilo, produciendo de este modo nuevos triacilglicéridos enriquecidos en dichos ácidos grasos.
- 40 30. El método según la reivindicación 29, en donde dicha composición de la etapa (b) comprende 1,3-dipalmitoil-2-monoleína (POP) y los nuevos triacilglicéridos de la etapa (c) comprenden uno o ambos de 1-palmitoil-3-stearoil-2-monoleína (POST) y 1,3-distearoil-2-monoleína (StOST).
- 45 31. El método según la reivindicación 29, en donde dichos triacilglicéridos nuevos de la etapa (c) tienen un contenido de ácido graso saturado inferior que dichos triacilglicéridos de la etapa (b); o
- donde dichos triacilglicéridos de la etapa (c) tienen un contenido de grasa trans inferior que dichos triacilglicéridos de la etapa (b).
- 50 32. Un método de interesterificación para preparar un alimento, pienso o un aceite, que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una mezcla de reacción de interesterificación que comprende un material fuente de ácido esteárico seleccionado del grupo que consiste en ácido esteárico, monoésteres de ácido esteárico de alcoholes monohídricos de bajo peso molecular y sus mezclas,

(b) proveer un alimento, pienso o un aceite que contiene un triacilglicérido;

5 (c) proveer un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos sintéticos y recombinantes aislados que tienen actividad de una hidrolasa y dicho polipéptido o bien

10 i. está codificado por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:1 de longitud total y en donde el ácido nucleico codifica por lo menos un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa y el polipéptido tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y adicionalmente tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 9, la Tabla 16 o la Tabla 23, o una de sus secuencias complementarias; o

15 ii. tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:2 de longitud total, y tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y adicionalmente tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once o doce, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 9, la Tabla 16 o la Tabla 23, o

iii. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos D61A;

20 D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; 1151G; 1151A; V163R; D164R, o una de sus combinaciones, o

25 iv. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q, o una de sus combinaciones;

(d). interesterificar el material fuente de ácido esteárico y el triacilglicérido del alimento, pienso, o el aceite, y

(e). separar los componentes de ácido graso de los componentes de glicérido interesterificados de la mezcla de interesterificación para proveer un producto de aceite interesterificado y una mezcla de ácido graso que comprende ácidos grasos, monoésteres de ácido graso o sus mezclas liberadas del alimento, pienso o aceite.

30 33. El método según la reivindicación 32, donde dicha reacción de interesterificación continúa hasta que hay un equilibrio sustancial de los grupos éster en las posiciones 1, 3 del componente de glicérido con componentes de ácido graso no de glicérido de la mezcla de reacción.

34. El método según la reivindicación 32, que comprende la etapa adicional de hidrogenar la mezcla de ácido graso.

35 35. El método según la reivindicación 32, en donde dichos triacilglicéridos interesterificados tienen un contenido de grasa saturada inferior que dichos triacilglicéridos de la etapa (b); o

donde dichos triacilglicéridos interesterificados tienen un contenido de grasa trans inferior que dichos triacilglicéridos de la etapa (b).

36. Un método para producir un DAG, donde el método comprende las etapas de

(a) proveer una composición oleosa que comprende una cantidad de TAG,

40 (b) proveer un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa, donde dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en polipéptidos sintéticos y recombinantes aislados que tienen actividad de una hidrolasa y dicho polipéptido o bien

45 i. está codificado por un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:1 de longitud total y donde el ácido nucleico codifica por lo menos un polipéptido que tiene actividad de una hidrolasa y el polipéptido tiene mutaciones D61E, R72K y V163R, y adicionalmente tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 9, la Tabla 16 o la Tabla 23, o una de sus secuencias complementarias; o

50 ii. tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM:2 de longitud total, y tiene mutaciones D61E, R72K y V163R y adicionalmente tiene uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, o más cambios de residuos de aminoácidos expuestos en la Tabla 3, la Tabla 4, la Tabla 9, la Tabla 16 o la Tabla 23, o

- iii. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos D61A; D61E; R72E; R72K; E116A; E116Q; E116R; E116T; E116V; S133A; 1151G; 1151A; V163R; D164R, o una de sus combinaciones, o
- 5 iv. comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en la SEC ID NÚM:2, pero además comprende por lo menos una modificación de residuos de aminoácidos I20L; V62S; G77P; V83C; D88H; Y113G; E116T; E116G; H140K; K146S; I167S; L180E; E194M; A211Q; S212Y; G215C; G215V; G215W; A218H; A218S; V223A; A225M; A225Q, o una de sus combinaciones;
- (c) poner en contacto dicha composición oleosa de la etapa (a) con dicho polipéptido de la etapa (b) bajo condiciones suficientes para que el polipéptido hidrolice un residuo acilo en el TAG para formar un DAG.
- 10 37. El método según la reivindicación 36, en donde dicho polipéptido es específico de Sn2 y dicho DAG es un 1,3-DAG; o
- donde dicho polipéptido es específico de Sn1 o Sn3 y dicho DAG es un 1,2-DAG o un 2,3-DAG.
38. El método según la reivindicación 36, en donde dicho residuo arilo comprende un ácido graso saturado y dicho DAG es una grasa saturada inferior que dicho TAG; o
- 15 donde dicho residuo acilo comprende un ácido graso trans y dicho DAG es una grasa trans inferior que dicho TAG.
39. Un método para hidrolizar un aceite o grasa, que comprende someter a reacción el aceite o la grasa con una enzima palmitasa en presencia de un emulsionante que tiene HLB mayor que 12, donde la enzima palmitasa está codificada por una secuencia de ácido nucleico que tiene por lo menos 85% de identidad de secuencia con la SEC ID NÚM: 1 de longitud total, y que tiene
- 20 i) un cambio de nucleótido que codifica el residuo de aminoácidos en la posición 95 como se expone en la Tabla 9,
- ii) cambios de nucleótidos que codifican los residuos de aminoácidos en las posiciones 85 y 172 como se expone en las Tabla 15,
- iii) un cambio de nucleótido que codifica el residuo de aminoácidos en la posición 83 como se expone en la Tabla 16, y
- 25 iv) las siguientes mutaciones silenciosas 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT y 188ACG, y donde el ácido nucleico codifica un polipéptido que tiene mutaciones D61E, R72K y V163R.
40. El método según la reivindicación 39, en donde la secuencia de ácido nucleico es la secuencia de la SEC. ID NÚM:1 y tiene
- i) un cambio de nucleótido que codifica el residuo de aminoácido en la posición 95 que se expone en la Tabla 9,
- 30 ii) cambios de nucleótidos que codifican los residuos de aminoácidos en las posiciones 85 y 172 que se exponen en la Tabla 15,
- iii) un cambio de nucleótido que codifica el residuo de aminoácido en la posición 83 que se expone en la Tabla 16, y
- iv) las siguientes mutaciones silenciosas 35GCT, 102GTT, 108AGT, 117CTT, 126AGG, 133TCT y 188ACG.
- 35 41. El método según la reivindicación 39 o 40, en donde el emulsionante se selecciona entre oleato de sodio, oleato de potasio, linoleato de sodio, linoleato de potasio, linolenato de sodio, linolenato de potasio, laureato de sodio, laureato de potasio, estearato de sodio, estearato de potasio, palmitato de sodio, palmitato de potasio, oleato de palma de sodio, oleato de palma de potasio o sus combinaciones.
42. El método según cualquiera de las reivindicaciones 39-41, en donde la reacción se lleva a cabo a aproximadamente 20 a 70 °C.
- 40 43. El método según cualquiera de las reivindicaciones 39-42, en donde la mezcla de reacción comprende aproximadamente 1 a 20% de agua, basada en el peso total de los reaccionantes.
44. El método según cualquiera de las reivindicaciones 39-43, en donde la reacción produce un aceite o una grasa que comprende aproximadamente 5% de palmitato basado en el peso total del aceite o la grasa; o
- 45 donde la reacción produce un aceite o una grasa que comprende aproximadamente 1% de palmitato basado en el peso total del aceite o la grasa.
45. El método según cualquiera de las reivindicaciones 39-44, donde el aceite es aceite refinado.

46. El método según cualquiera de las reivindicaciones 39-45, donde la reacción comprende además la adición de un fosfolípido.

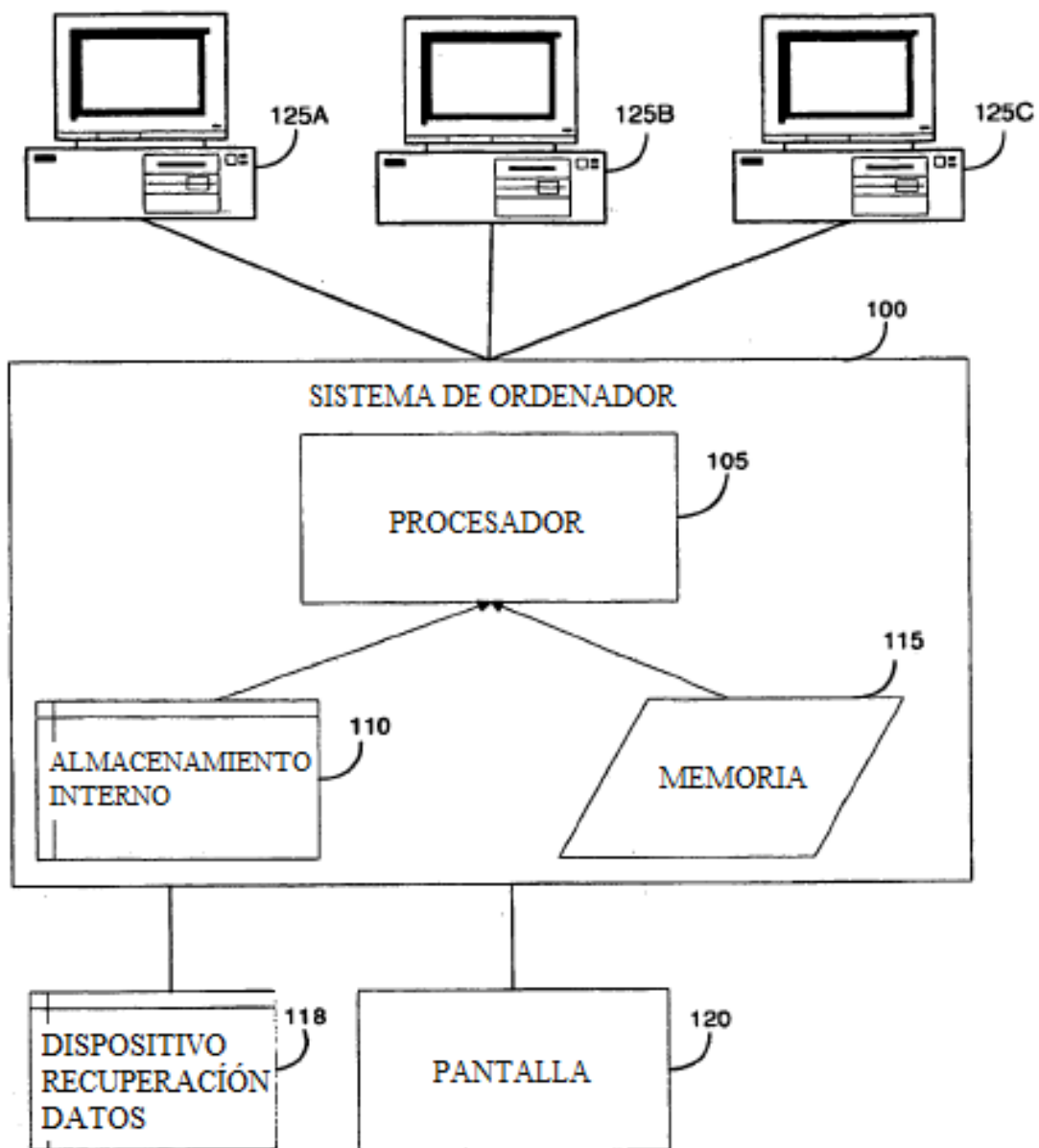
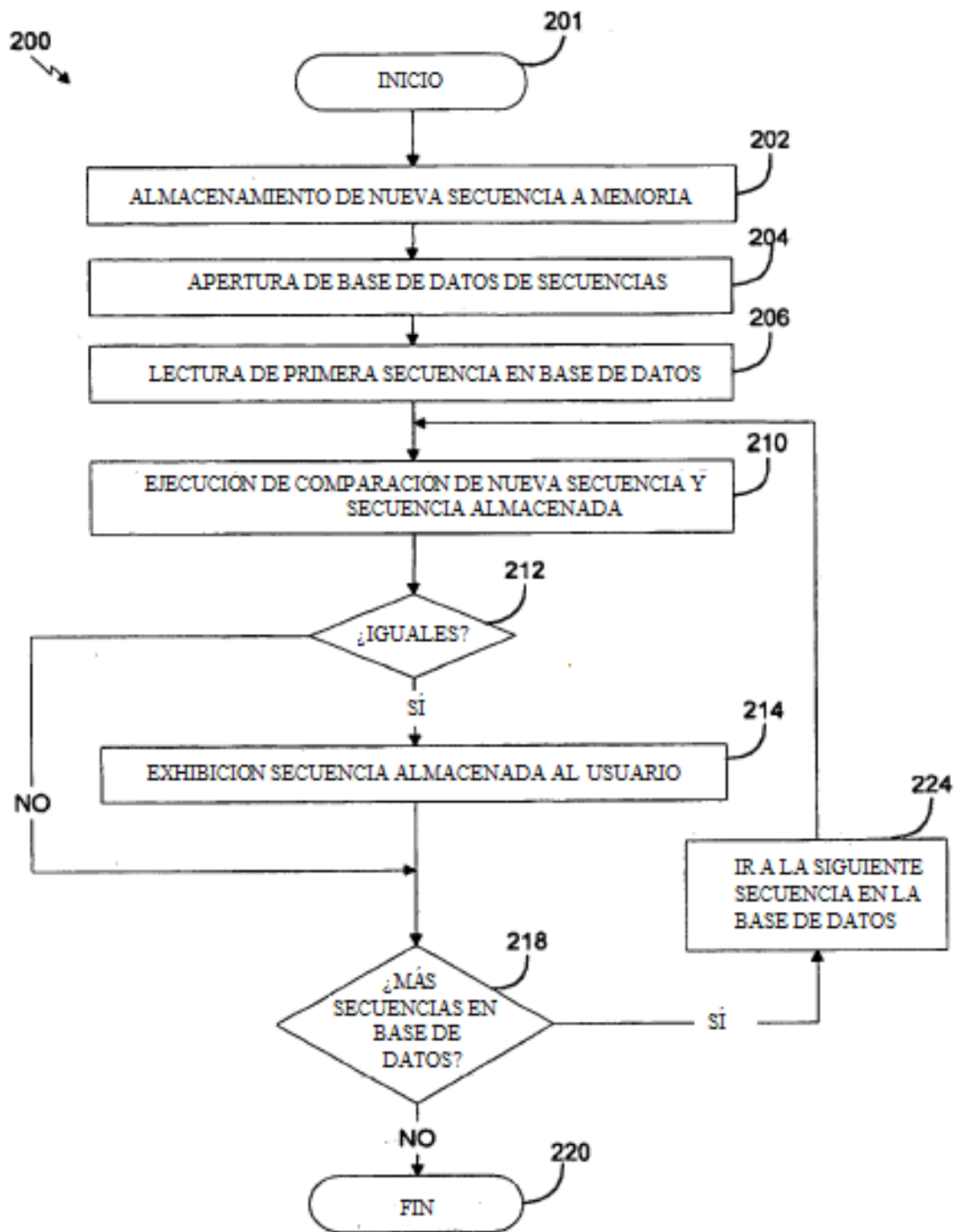


FIGURA 1

**FIGURA 2**

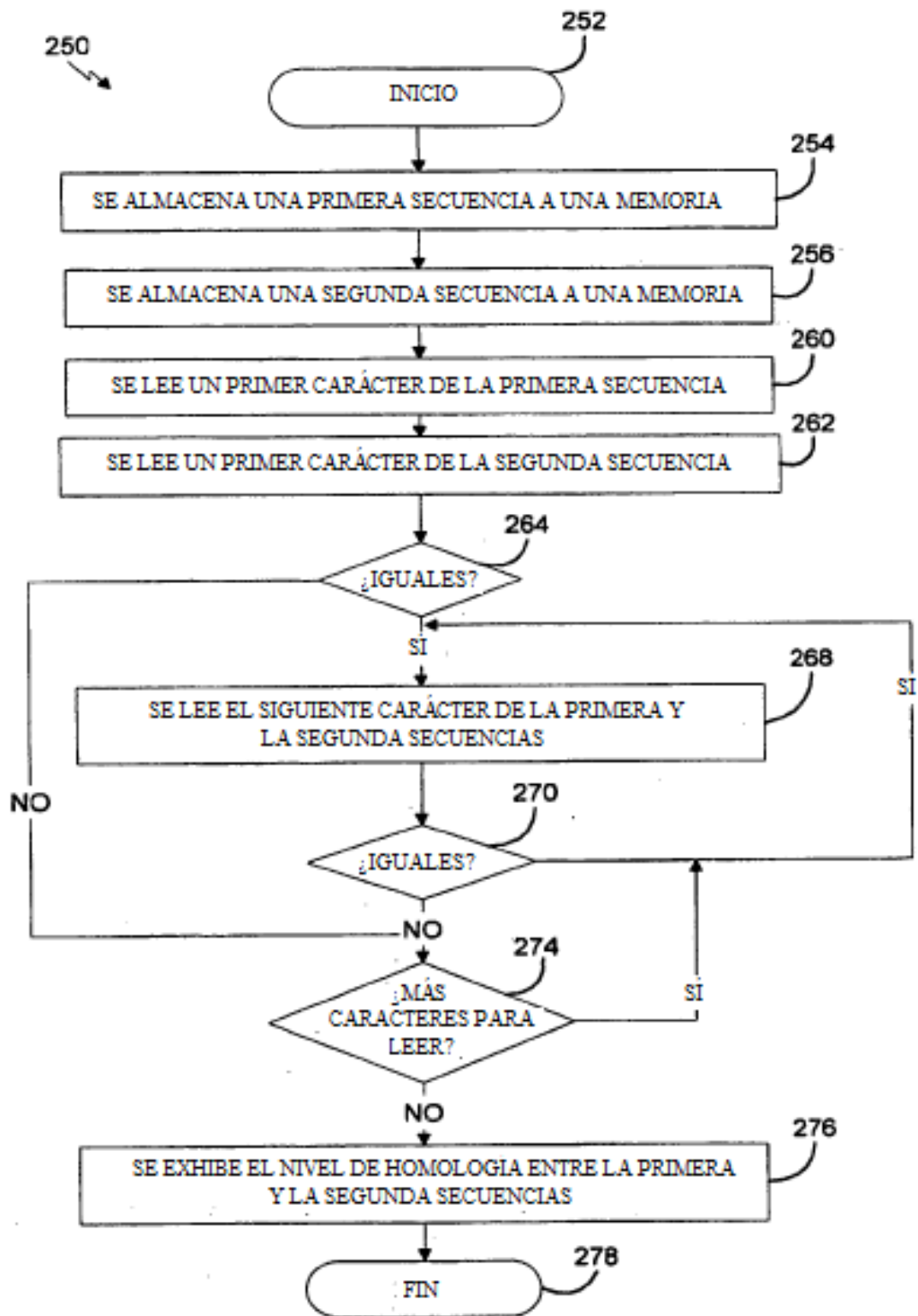


FIGURA 3

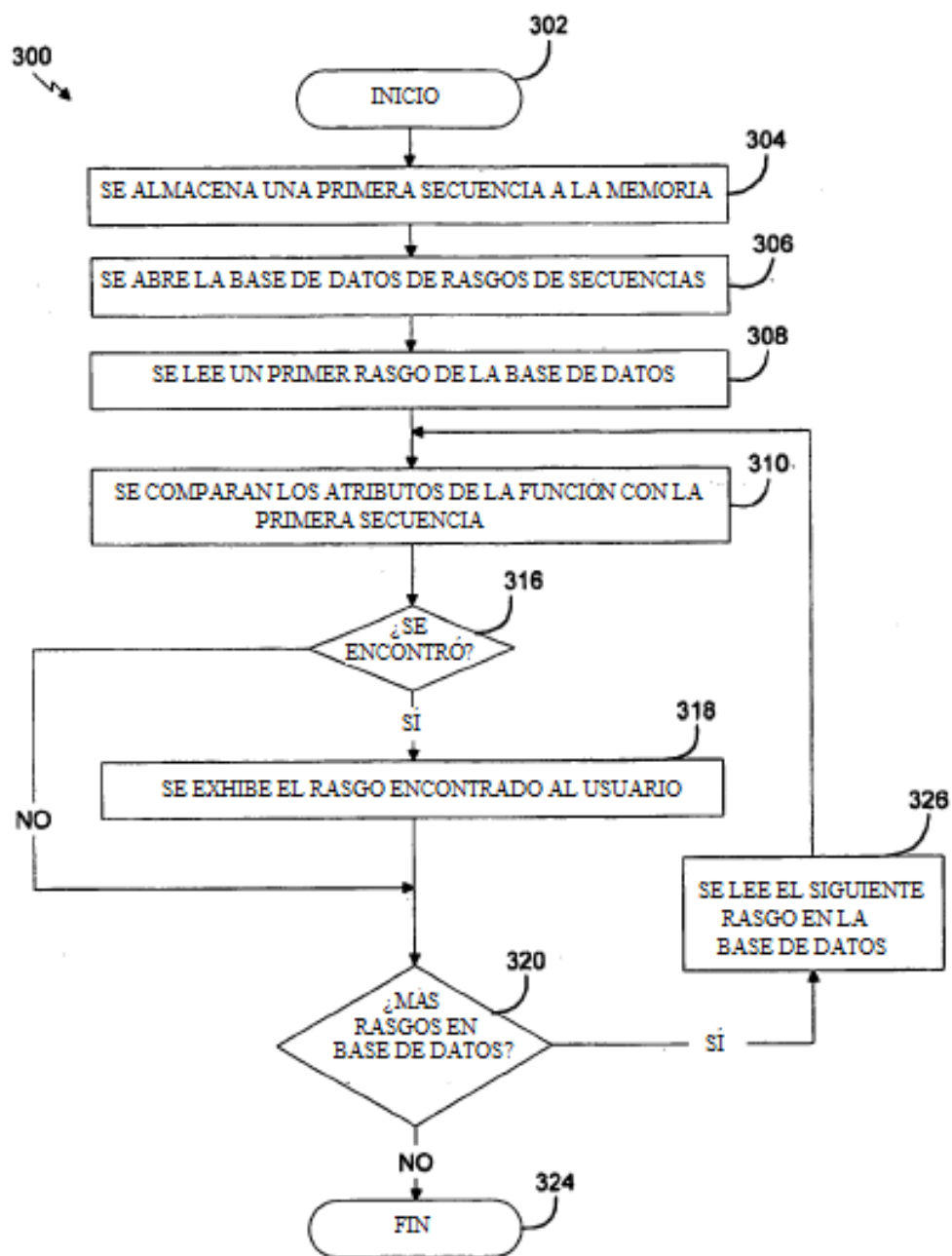
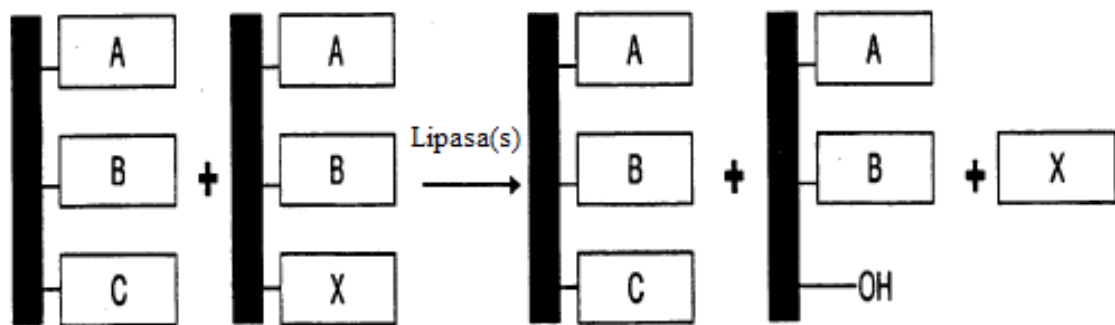


FIGURA 4

FIGURA 5



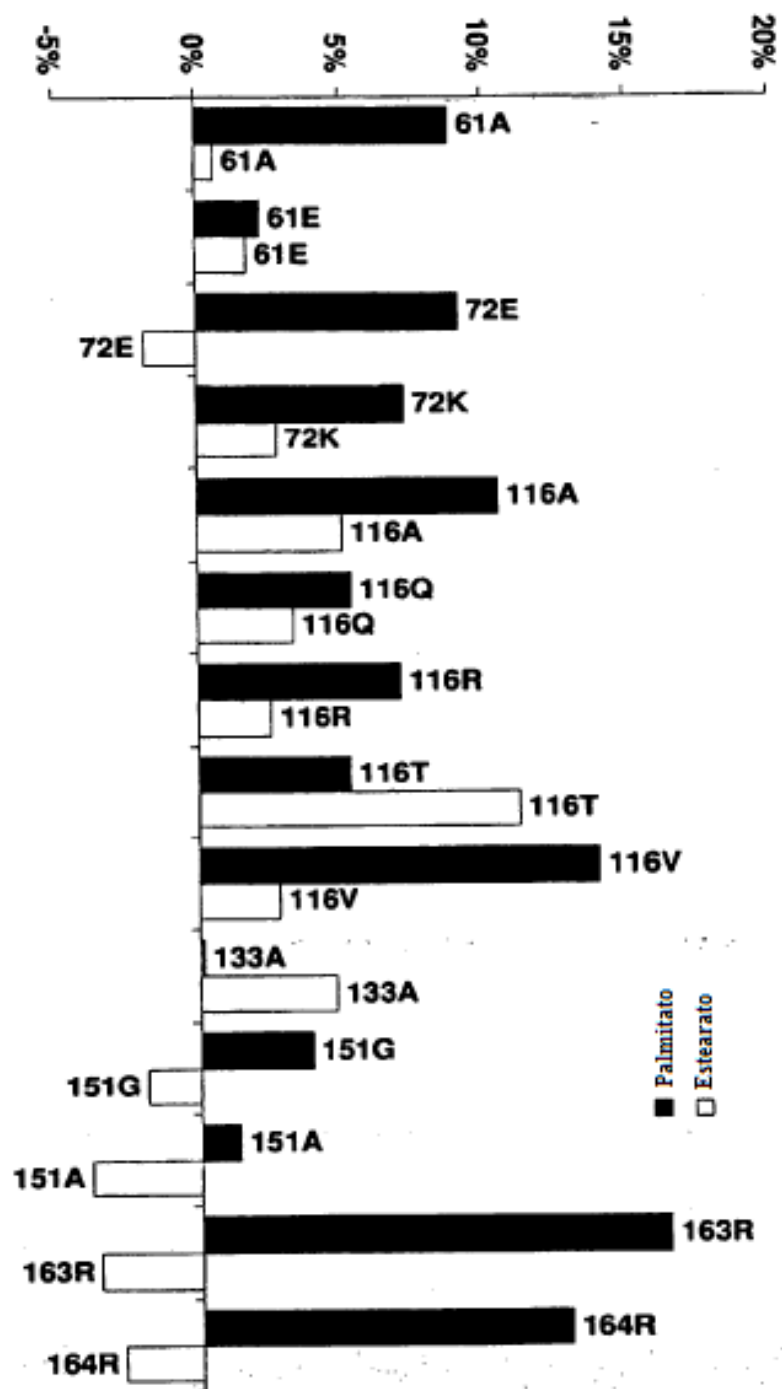


FIGURA 6a

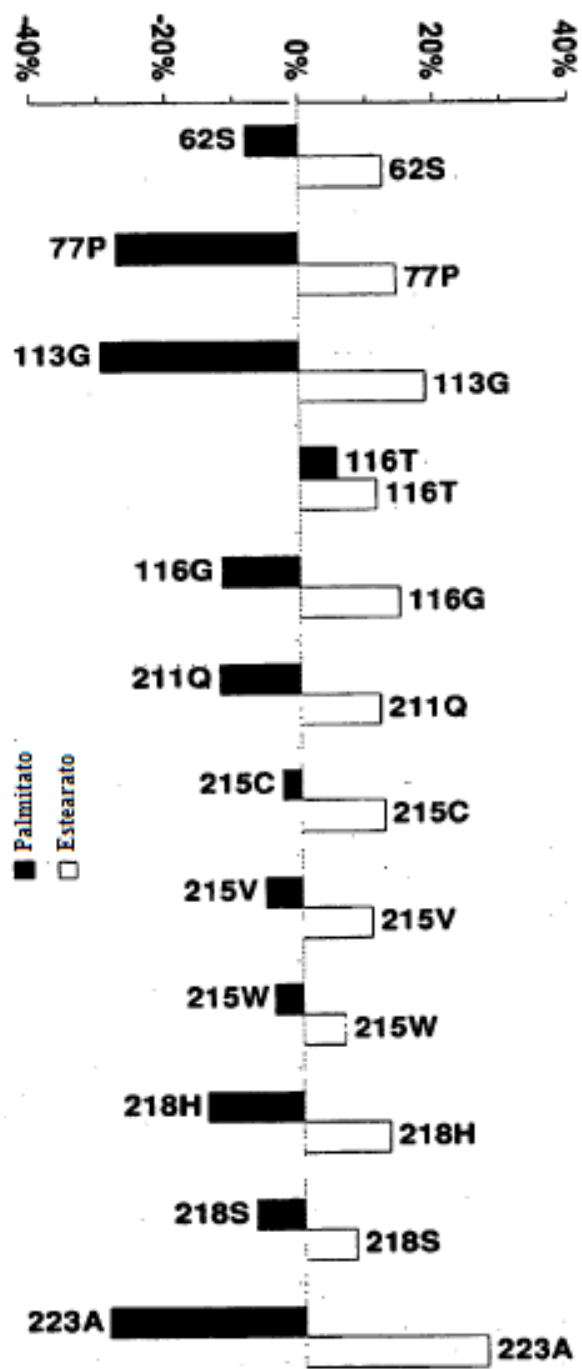


FIGURA 6b

FIGURA 7

MLKPPPYGRL LRELADIPA**I** VTAPFRGA AK MGKLADGEPV LVLPGFLADD
20L

61A,E 72E,K
NATSVLRKTF **D**VAGFACSGW **E**RGFNL**G**IRG DL**V**DRLV**D**RL RAVSEAAGGQ
62S 77P 83C 88H

113G 133A
KVIVVGWSLG GL**Y**AR**E**LGHK APELIRMVVT LG**S**PFAGDL**H** ANHAW**K**IYEA
116A,Q,R,T,V;G,T 140K 146S

167S
151G,A 163R
INSHTVDNLP IP**V**DFQ**I**KPP VRTIAVWSP**L** DGVVAPETSE GSP**E**QSDERL
164R 180E 194M

212Y
211Q 218H,S 225M,Q
ELAVTHMGFA **A**SKT**G**A**E**AVV RL**V**A**A**RL- (SEC. ID NÚM: 2)
215C,V,W 223A

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición										Selección secundaria									
										Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos graso liberados (ug)				
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total	
E	K	V	A	A	R			0,0%	1,1%	0,0%	98,9%	0,0%	0,00	0,04	0,00	4,03	0,00	4,07	
E	K	V	A	A				0,0%	2,7%	2,9%	94,4%	0,0%	0,00	0,19	0,20	6,70	0,00	7,10	
E	K	V	A			R		Alto	Alto	Bajo	Alto	Alto	Sin pico	Sin pico	0,00	Sin pico	Sin pico	Alto	
E	K	V		G	R			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
E	K	V		A				Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
E	K	V			R			0,3%	5,0%	3,5%	91,2%	0,0%	0,03	0,55	0,38	10,00	0,00	10,96	
E	K	V			R			0,0%	0,0%	0,0%	99,9%	0,1%	0,00	0,00	0,00	2,86	0,00	2,86	
E	K	V				R		0,0%	1,0%	0,0%	99,0%	0,0%	0,00	0,06	0,00	5,52	0,00	5,58	
E	K	V						0,0%	3,1%	0,0%	96,9%	0,0%	0,00	0,21	0,00	6,50	0,00	6,71	
E	K	T		A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	5,53	0,00	5,53	
E	K	T		A	R			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	
E	K	T		A	R			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	
E	K	Q		A	R			4,0%	7,8%	5,4%	82,5%	0,3%	0,50	0,15	0,23	6,88	0,08	7,83	
E	K	Q		A	R			4,5%	9,4%	5,6%	80,5%	0,0%	0,56	0,18	0,24	6,71	0,00	7,69	
E	K	Q		A	R			11,0%	38,5%	34,4%	Alto	16,1%	1,38	0,73	1,49	Alto	4,03	Alto	
E	K	Q		A	R			4,2%	8,6%	6,4%	80,2%	0,7%	0,52	0,16	0,28	6,68	0,17	7,81	
E	K	A	A	A	R			0,0%	1,7%	0,0%	98,3%	0,0%	0,00	0,11	0,00	6,47	0,00	6,58	
E	K	A	A	A	R			0,0%	3,7%	0,0%	96,3%	0,0%	0,00	0,30	0,00	7,80	0,00	8,10	
E	K	A	A			R		0,9%	4,1%	6,7%	88,0%	0,4%	0,09	0,43	0,70	9,26	0,04	10,52	
E	K	A		G	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,94	0,00	0,94	
E	K	A		A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,97	0,00	0,97	
E	K	A		A				0,0%	2,6%	4,3%	93,1%	0,0%	0,00	0,15	0,26	5,56	0,00	5,97	
E	K	A				R		0,0%	2,2%	5,0%	92,4%	0,5%	0,00	0,19	0,44	8,20	0,04	8,88	
E	K	A				R		0,0%	3,0%	4,7%	91,9%	0,4%	0,00	0,19	0,30	5,79	0,03	6,30	
E	K	A				R		1,0%	5,2%	6,4%	87,2%	0,3%	0,08	0,41	0,51	6,97	0,02	8,00	
E	K	A				R		0,0%	6,2%	0,0%	93,8%	0,0%	0,00	0,36	0,00	5,44	0,00	5,80	
E	K		A	G		R	S18G,K12M	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
E	K		A	A	R		L86M	5,2%	14,1%	8,1%	72,6%	0,0%	0,66	0,27	0,35	6,05	0,00	7,32	

Figura 8-1

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Selección secundaria											
							Porcentaje de ácidos grasos liberados						Cantidad de ácidos graso liberados (ug)					
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total
E	K		A	A	R		L86M	0,0%	10,3%	5,6%	84,1%	0,0%	0,00	0,19	0,24	7,01	0,00	7,45
E	K		A	A				Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E	K		A	A			K12M	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
E	K		A	A			K12M	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
E	K		A				W17L	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E	K		A			R		Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
E	K		A			R		Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
E	K				R			0,6%	3,7%	3,7%	91,9%	0,0%	0,09	0,55	0,55	13,50	0,00	14,68
E	E	V	A	A		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00	0,60
E	E	V	A	A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,30	0,00	1,30
E	E	V	A		R			0,0%	3,8%	3,0%	93,2%	0,0%	0,00	0,31	0,24	7,53	0,00	8,08
E	E	V	A				A52S	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	2,17	0,00	2,17
E	E	V	A				A52S	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E	E	V	A		R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	4,73	0,00	4,73
E	E	V	A					0,0%	8,0%	8,0%	83,9%	0,0%	0,00	0,64	0,64	6,68	0,00	7,96
E	E	V	A			R		0,0%	1,9%	4,0%	94,1%	0,0%	0,00	0,08	0,18	4,17	0,00	4,43
E	E	V		G				Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E	E	V			R			1,3%	7,4%	4,9%	86,4%	0,0%	0,16	0,85	0,56	9,92	0,00	11,48
E	E	V						0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	2,31	0,00	2,31
E	E	V	A		R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	2,23	0,00	2,23
E	E	V		G				6,0%	0,0%	0,0%	94,0%	0,0%	0,17	0,00	0,00	2,61	0,00	2,78
E	E	V		A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,90	0,00	0,90
E	E	V		A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	2,43	0,00	2,43
E	E	V			R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	4,89	0,00	4,89
E	E	V			R			1,7%	0,0%	0,0%	98,3%	0,0%	0,05	0,00	0,00	2,59	0,00	2,64
E	E	V				R		0,0%	3,3%	0,0%	96,7%	0,0%	0,00	0,17	0,00	4,91	0,00	5,08
E	E	T			R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	8,01	0,00	8,01

Figura 8-2

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Selección secundaria													
							Porcentaje de ácidos grasos liberados							Cantidad de ácidos graso liberados (ug)						
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total		
E	E	Q	A	G				5,9%	11,7%	11,6%	67,2%	3,6%	0,73	0,22	0,50	5,60	0,91	7,97		
E	E	Q	A	G				4,1%	12,6%	11,7%	68,1%	3,5%	0,52	0,24	0,51	5,67	0,88	7,82		
E	E	A	A	G				0,0%	13,5%	23,3%	63,2%	0,0%	0,00	0,11	0,20	0,53	0,00	0,84		
E	E	A	A	G				2,6%	0,0%	0,0%	97,4%	0,0%	0,04	0,00	0,00	1,57	0,00	1,61		
E	E	A	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,99	0,00	1,99		
E	E	A	A	A	R			0,0%	1,0%	2,3%	96,3%	0,5%	0,00	0,06	0,15	6,27	0,03	6,51		
E	E	A	A	A				0,0%	4,9%	2,8%	922%	0,0%	0,00	0,14	0,08	2,53	0,00	2,74		
E	E	A	A		R			2,2%	7,6%	6,8%	83,4%	0,0%	0,28	0,99	0,87	10,80	0,00	12,95		
E	E	A	A					0,0%	2,3%	3,4%	94,3%	0,0%	0,00	0,13	0,19	5,36	0,00	5,68		
E	E	A	A					1,9%	4,1%	6,3%	87,1%	0,5%	0,13	0,27	0,42	5,78	0,03	6,63		
E	E	A	A		R			0,0%	2,9%	0,0%	97,1%	0,0%	0,00	0,12	0,00	4,07	0,00	4,19		
E	E	A	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,93	0,00	0,93		
E	E	A	A	A				1,6%	5,8%	5,4%	86,3%	0,9%	0,20	0,73	0,69	10,90	0,12	12,63		
E	E	A	A	A		R		1,3%	4,7%	4,7%	88,1%	1,2%	0,11	0,39	0,40	7,37	0,10	8,37		
E	E	A			R			1,7%	5,1%	6,4%	85,8%	1,0%	0,18	0,56	0,70	9,32	0,11	10,86		
E	E	A			R			0,0%	2,9%	0,0%	97,1%	0,0%	0,00	0,17	0,00	5,79	0,00	5,96		
E	E	A			R			0,0%	2,8%	0,0%	97,2%	0,0%	0,00	0,23	0,00	8,19	0,00	8,42		
E	E		A	G				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00	0,18		
E	E		A	G				6,6%	7,6%	8,5%	77,1%	0,2%	0,35	0,40	0,45	4,06	0,01	5,27		
E	E		A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	5,53	0,00	5,53		
E	E		A	A	R		P18S,A21V	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00	0,10		
E	E		A	A	R			2,5%	9,4%	7,2%	78,0%	3,0%	0,31	0,18	0,31	6,50	0,75	8,04		
E	E		A	A	R			5,8%	14,4%	8,2%	71,6%	0,0%	0,73	0,27	0,35	5,97	0,00	7,32		
E	E		A	A	R			4,5%	11,9%	8,6%	73,5%	1,6%	0,56	0,22	0,37	6,12	0,39	7,67		
E	E		A	A	R			4,4%	10,4%	5,8%	79,4%	0,0%	0,55	0,20	0,25	6,62	0,00	7,62		
E	E		A		R		K12M	4,4%	10,2%	7,0%	76,7%	1,7%	0,55	0,19	0,31	6,39	0,43	7,87		
E	E		A		R		K12M	4,8%	8,6%	7,0%	79,5%	0,1%	0,60	0,16	0,30	6,63	0,01	7,71		
E	E			G	R			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
E	E			G		R		0,0%	7,8%	10,2%	79,2%	0,0%	0,47	1,35	1,77	13,70	0,00	17,29		
E	E		A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	3,61	0,00	3,61		

Figura 8-3

Selección secundaria																		
Porcentaje de ácidos grasos liberados																		
Cantidad de ácidos graso liberados (ug)																		
Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición																		
Otros cambios de aminoácidos																		
61	72	116	133	151	163	164	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total	
E	E			G	R		F65V	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
E	E			G	R		F65V	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
E		V	A	G	R			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E		V	A	G				Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E		V	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,00	0,00	0,00	5,31	0,00	0,00	5,31
E		V	A	A	R			0,0%	0,5%	1,1%	97,3%	0,00	0,04	0,10	8,81	0,10	0,10	9,05
E		V	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,00	0,00	0,00	2,51	0,00	0,00	2,51
E		V	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,00	0,00	0,00	1,71	0,00	0,00	1,71
E		V	A	A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,00	0,00	0,00	1,68	0,00	0,00	1,68
E		V	A	A	R			0,0%	2,9%	2,4%	94,6%	0,00	0,24	0,20	7,83	0,00	0,00	8,27
E		V	A		R			0,0%	0,0%	0,8%	99,2%	0,00	0,00	0,06	7,62	0,00	0,00	7,68
E		V	A		R			1,7%	5,7%	5,4%	87,3%	0,19	0,62	0,60	9,63	0,00	0,00	11,04
E		V	A					0,4%	3,6%	0,0%	95,8%	0,03	0,25	0,00	6,52	0,01	0,00	6,80
E		V		A	R			0,4%	3,4%	3,2%	92,5%	0,05	0,42	0,40	11,40	0,06	0,00	12,33
E		V			R			1,7%	5,8%	6,3%	86,2%	0,20	0,66	0,72	9,82	0,00	0,00	11,40
E		V				R		0,0%	0,4%	2,7%	96,9%	0,00	0,03	0,17	6,01	0,00	0,00	6,20
E		Q						2,7%	7,7%	10,9%	77,5%	0,75	2,16	3,08	21,80	0,34	0,34	28,13
E		Q	A			R		5,4%	12,0%	15,2%	66,1%	1,07	2,37	2,99	13,00	0,25	0,25	19,68
E		Q		A	R			1,9%	4,1%	4,6%	88,9%	0,31	0,68	0,75	14,60	0,08	0,08	16,42
E		A	A	G	R			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E		A	A	A				0,4%	0,0%	0,0%	99,6%	0,00	0,00	0,00	0,73	0,00	0,00	0,73
E		A	A					2,6%	6,4%	8,5%	81,5%	0,19	0,45	0,59	5,71	0,07	0,07	7,01
E		A		A	R			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E		A		A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,00	0,00	0,00	2,07	0,00	0,00	2,07
E		A		A				0,0%	0,0%	2,2%	97,8%	0,00	0,00	0,07	2,93	0,00	0,00	3,00
E		A		A				0,0%	3,6%	0,0%	96,4%	0,00	0,14	0,00	3,64	0,00	0,00	3,78
E		A			R		G132V	0,1%	0,0%	0,0%	99,9%	0,00	0,00	0,00	1,99	0,00	0,00	1,99
E		A				R		3,3%	2,5%	6,3%	87,9%	0,15	0,11	0,28	3,89	0,00	0,00	4,43
E				G	R		K12M	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Figura 8-4

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición										Selección secundaria									
										Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos graso liberados (ug)				
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total	
E				G		R	K12M	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,04	
E				A			A15S	4,1%	10,5%	14,4%	70,2%	0,8%	0,43	1,11	1,52	7,41	0,08	10,55	
E			A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,29	0,00	0,29	
E		Q			R			5,1%	9,7%	7,0%	77,6%	0,6%	0,63	0,18	0,30	6,46	0,16	7,74	
E		Q			R			5,4%	8,4%	7,6%	78,6%	0,0%	0,68	0,16	0,33	6,55	0,00	7,71	
E		Q	A	G		R		4,2%	14,2%	12,1%	62,6%	7,0%	0,52	0,27	0,53	5,21	1,75	8,28	
E		Q	A	G		R		7,9%	12,0%	13,7%	65,5%	0,9%	0,98	0,53	0,60	5,46	0,21	7,48	
E					R			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	
E					R			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	
E			A			R		4,9%	11,3%	8,3%	73,9%	1,7%	0,62	0,21	0,36	6,16	0,41	7,76	
E			A			R		4,6%	10,2%	8,1%	77,1%	0,0%	0,57	0,19	0,35	6,42	0,00	7,54	
E			A		R			3,3%	8,5%	6,9%	77,8%	3,5%	0,42	0,16	0,30	6,49	0,87	8,23	
E			A		R			5,0%	8,6%	7,8%	76,2%	2,4%	0,63	0,16	0,34	6,35	0,60	8,08	
A	K	V	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	6,48	0,00	6,48	
A	K	V	A	A	R			1,1%	3,0%	2,4%	93,5%	0,0%	0,12	0,33	0,25	10,00	0,00	10,70	
A	K	V	A	A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	2,75	0,00	2,75	
A	K	V	A	A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	3,20	0,00	3,20	
A	K	V	A	A				0,0%	0,6%	0,0%	99,4%	0,0%	0,00	0,02	0,00	3,55	0,00	3,57	
A	K	V	A	A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	2,92	0,00	2,92	
A	K	V	A			R		0,9%	3,6%	0,0%	95,5%	0,0%	0,05	0,19	0,00	4,88	0,00	5,11	
A	K	V		A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	4,32	0,00	4,32	
A	K	V		A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	2,16	0,00	2,16	
A	K	V				R		0,0%	0,0%	0,8%	99,2%	0,0%	0,00	0,00	0,06	7,36	0,00	7,42	
A	K	V				R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	2,85	0,00	2,85	
A	K	V						0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	4,81	0,00	4,81	
A	K	V						2,3%	8,0%	8,5%	81,1%	0,1%	0,23	0,79	0,84	8,01	0,01	9,87	
A	K	T	A	A				6,7%	10,5%	9,2%	73,6%	0,0%	0,84	0,20	0,40	6,13	0,00	7,57	
A	K	T	A	A				7,1%	9,6%	7,9%	75,4%	0,0%	0,89	0,18	0,34	6,28	0,00	7,70	
A	K	T	A		R			5,1%	8,3%	6,0%	79,2%	1,4%	0,63	0,16	0,26	6,60	0,36	8,01	

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Selección secundaria										
							Porcentaje de ácidos grasos liberados						Cantidad de ácidos graso liberados (ug)				
61	72	116	133	151	163	164	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total
A	K	T	A		R		4,8%	6,2%	5,3%	83,7%	0,0%	0,60	0,12	0,23	6,97	0,00	7,92
A	K	Q	A	G			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A	K	Q		G	R		3,8%	9,0%	5,8%	79,9%	1,5%	0,48	0,17	0,25	6,66	0,37	7,93
A	K	Q		G	R		0,0%	7,5%	5,8%	86,7%	0,0%	0,00	0,14	0,25	7,23	0,00	7,62
A	K	A	A		R		1,4%	5,9%	5,2%	87,4%	0,0%	0,27	1,12	1,00	16,60	0,00	18,98
A	K	A	A		R		1,9%	5,5%	5,0%	87,6%	0,0%	0,30	0,84	0,77	13,40	0,00	15,31
A	K	A	A		R		0,0%	0,2%	0,4%	99,5%	0,0%	0,00	0,01	0,02	6,25	0,00	6,28
A	K	A		A	R		0,0%	3,2%	0,0%	96,8%	0,0%	0,00	0,17	0,00	4,95	0,00	5,12
A	K	A		A			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A	K	A			R		2,2%	2,3%	1,8%	93,7%	0,0%	0,15	0,16	0,12	6,37	0,00	6,80
A	K	A				R	0,0%	3,1%	3,0%	93,3%	0,6%	0,00	0,21	0,21	6,50	0,04	6,96
A	K	A	A	G		R	5,8%	11,8%	10,4%	69,2%	2,8%	0,72	0,22	0,45	5,77	0,71	7,87
A	K		A	G		R	7,7%	11,6%	11,5%	68,2%	1,0%	0,97	0,22	0,50	5,68	0,24	7,61
A	K		A	A	R		5,4%	13,0%	8,0%	73,7%	0,0%	0,67	0,25	0,35	6,14	0,00	7,40
A	K		A	A	R		4,2%	10,3%	7,3%	78,3%	0,0%	0,52	0,19	0,32	6,52	0,00	7,55
A	K		A	A	R		5,0%	12,2%	7,5%	75,3%	0,0%	0,62	0,23	0,33	6,28	0,00	7,45
A	K		A	A	R		0,0%	13,8%	0,0%	86,2%	0,0%	0,00	0,26	0,00	7,19	0,00	7,45
A	K		A		R		4,4%	7,9%	6,4%	80,3%	1,0%	0,55	0,15	0,28	6,69	0,25	7,92
A	K		A		R		5,3%	10,9%	7,6%	76,2%	0,0%	0,67	0,21	0,33	6,35	0,00	7,55
A	K			A	R		Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A	K				R		Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A	K						3,6%	8,9%	8,9%	78,6%	0,0%	0,77	1,91	1,92	16,90	0,00	21,50
A	K			A	R		6,0%	9,8%	7,5%	76,0%	0,7%	0,75	0,19	0,33	6,33	0,18	7,77
A	K			A	R		0,0%	6,6%	4,2%	87,9%	1,3%	0,00	0,12	0,18	7,33	0,33	7,96
A	K			A	R		4,1%	11,2%	7,1%	76,2%	1,4%	0,52	0,21	0,31	6,35	0,36	7,74
A	K			A	R		4,9%	12,0%	7,2%	76,0%	0,0%	0,61	0,23	0,31	6,33	0,00	7,48
A	E	V	A	G		R	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	4,59	0,00	4,59
A	E	V	A	A	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,78	0,00	0,78
A	E	V	A	A			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	2,53	0,00	2,53

Figura 8-6

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Otros cambios de aminoácidos	Selección secundaria									
								Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)				
61	72	116	133	151	163	164	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total
A	E	V	A		R		0,0%	4,0%	3,6%	92,4%	0,0%	0,00	0,33	0,30	7,60	0,00	8,23
A	E	V	A		R		0,0%	4,2%	3,8%	92,1%	0,0%	0,00	0,36	0,33	8,02	0,00	8,71
A	E	V	A		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,02	0,00	1,02
A	E	V	A				2,7%	4,3%	4,2%	88,8%	0,0%	0,13	0,20	0,20	4,17	0,00	4,70
A	E	V		G			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A	E	V		A	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,31	0,00	0,31
A	E	V		A	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,53	0,00	0,53
A	E	V		A	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,71	0,00	0,71
A	E	V		A	R		1,6%	7,1%	1,8%	89,6%	0,0%	0,18	0,81	0,20	10,20	0,00	11,39
A	E	V		A		R	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A	E	V		A		R	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,09	0,00	1,09
A	E	V			R		0,8%	5,3%	4,2%	89,7%	0,0%	0,07	0,50	0,39	8,39	0,00	9,35
A	E	V					0,0%	5,4%	0,0%	94,6%	0,0%	0,00	0,39	0,00	6,77	0,00	7,16
A	E	Q	A	A	R		0,0%	1,2%	2,4%	96,5%	0,0%	0,00	0,13	0,26	10,70	0,00	11,09
A	E	Q		G			5,2%	12,4%	11,4%	69,3%	1,7%	0,65	0,23	0,50	5,77	0,41	7,57
A	E	Q		G			6,1%	15,9%	10,6%	67,4%	0,0%	0,76	0,30	0,46	5,62	0,00	7,14
A	E	A	A	G		R	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,19	0,00	0,19
A	E	A	A		R		0,0%	4,2%	6,2%	89,7%	0,0%	0,00	0,32	0,48	6,93	0,00	7,73
A	E	A	A		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	7,06	0,00	7,06
A	E	A	A				1,2%	5,5%	6,4%	85,9%	1,0%	0,09	0,42	0,48	6,52	0,07	7,59
A	E	A	A			R	0,0%	0,0%	1,0%	99,0%	0,0%	0,00	0,00	0,06	5,72	0,00	5,78
A	E	A		G		R	0,8%	0,0%	0,0%	99,2%	0,0%	0,01	0,00	0,00	1,31	0,00	1,32
A	E	A		A	R		0,0%	3,7%	0,0%	96,3%	0,0%	0,00	0,23	0,00	6,12	0,00	6,35
A	E	A	A			R	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,91	0,00	0,91
A	E	A		A			1,1%	8,8%	2,3%	86,3%	1,4%	0,08	0,59	0,16	5,79	0,09	6,71
A	E						Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A	E				R		Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
A	E				R		Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo
A	E		A	R			2,9%	10,9%	7,7%	75,3%	3,3%	0,37	0,21	0,33	6,27	0,81	7,99

Figura 8-7

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición		Selección secundaria																	
		Porcentaje de ácidos grasos liberados						Cantidad de ácidos graso liberados (ug)											
		Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total							
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos	5,5%	13,8%	7,7%	71,7%	1,3%	0,69	0,26	0,34	5,97	0,33	7,59	
A	E			A	R		K12M	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,39
A		V	A	A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,87	0,00	0,87
A		V	A	A				0,0%	3,6%	0,0%	96,4%	0,0%	0,00	0,12	0,00	0,00	3,05	0,00	3,17
A		V	A	A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,00	3,16	0,00	3,16
A		V	A		R			0,0%	4,8%	5,9%	89,3%	0,0%	0,00	0,44	0,54	8,18	0,00	9,16	
A		V	A		R			0,0%	1,4%	0,0%	98,6%	0,0%	0,00	0,11	0,00	7,57	0,00	7,68	
A		V	A			R		4,7%	11,0%	10,4%	74,0%	0,0%	0,50	1,18	1,12	7,96	0,00	10,76	
A		V	A			R		0,4%	3,3%	4,0%	90,9%	1,4%	0,02	0,18	0,22	4,92	0,08	5,41	
A		V	A			R		1,9%	5,5%	1,7%	90,9%	0,0%	0,18	0,50	0,16	8,33	0,00	9,17	
A		V	A			R		0,0%	3,7%	0,0%	96,3%	0,0%	0,00	0,16	0,00	4,10	0,00	4,26	
A		V	A			R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,79	0,00	1,79	
A		V	A			R		0,1%	4,6%	0,0%	95,3%	0,0%	0,01	0,34	0,00	7,05	0,00	7,40	
A		V		G	R			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A		V		A		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,04	0,00	1,04	
A		V				R		4,3%	9,0%	9,7%	76,9%	0,0%	0,59	1,23	1,33	10,50	0,00	13,65	
A		V				R		0,7%	3,4%	3,5%	92,1%	0,3%	0,05	0,25	0,26	6,80	0,02	7,39	
A		V						0,3%	7,6%	0,0%	92,1%	0,0%	0,02	0,41	0,00	4,98	0,00	5,41	
A		V				R		2,6%	8,3%	4,2%	84,7%	0,2%	0,29	0,91	0,45	9,23	0,03	10,90	
A		V						0,1%	3,9%	0,5%	95,5%	0,0%	0,01	0,26	0,03	6,43	0,00	6,73	
A		V				R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00	0,35	
A		T					D138E,K213E	Bajo	Bajo	Bajo	low	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A		Q	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	3,54	0,00	3,54	
A		A	A	G		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,39	0,00	0,39	
A		A	A	A			K146N	1,7%	6,4%	6,6%	85,3%	0,0%	0,25	0,90	0,93	12,10	0,00	14,18	
A		A	A					1,7%	4,5%	8,2%	83,8%	1,7%	0,18	0,46	0,85	8,64	0,18	10,31	
A		A		A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,45	0,00	1,45	
A		A		A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,65	0,00	1,65	
A		A	A			R		1,2%	4,1%	5,6%	88,8%	0,3%	0,13	0,45	0,63	9,85	0,03	11,09	

Figura 8-8

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición								Selección secundaria										
								Porcentaje de ácidos grasos liberados						Cantidad de ácidos graso liberados (ug)				
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total
A			A	G	R		S54L	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
A			A		R			5,3%	11,0%	8,2%	74,6%	0,9%	0,9%	0,66	0,21	0,36	6,22	0,24
A			A		R		S54L	5,2%	9,3%	9,1%	76,5%	0,0%	0,65	0,18	0,39	6,37	0,00	7,59
A			A		R		K12M	4,4%	10,2%	7,0%	76,8%	1,6%	0,55	0,19	0,31	6,40	0,40	7,84
A			A		R		K12M	5,3%	10,1%	8,4%	75,4%	0,9%	0,66	0,19	0,36	6,28	0,22	7,72
	K	V	A	G				3,8%	8,3%	7,9%	80,0%	0,0%	0,62	1,37	1,31	13,20	0,00	16,50
	K	V	A	G				Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	K	V	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	2,25	0,00	2,25
	K	V	A	A	R			0,5%	0,0%	0,0%	99,5%	0,0%	0,02	0,00	0,00	3,73	0,00	3,75
	K	V	A	A	R			0,7%	0,0%	0,0%	99,3%	0,0%	0,03	0,00	0,00	3,76	0,00	3,79
	K	V	A	A				0,7%	0,0%	0,0%	99,3%	0,0%	0,02	0,00	0,00	3,10	0,00	3,12
	K	V	A		R		A141T	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	4,54	0,00	4,54
	K	V	A		R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	3,16	0,00	3,16
	K	V	A		R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	3,68	0,00	3,68
	K	V	A		R		V62F	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	7,51	0,00	7,51
	K	V	A				P162S	2,2%	8,5%	7,5%	81,8%	0,0%	0,39	1,51	1,32	14,50	0,00	17,72
	K	V		G		R		1,2%	0,0%	0,0%	98,8%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,33
	K	V		A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,43	0,00	0,43
	K	V		A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,58	0,00	0,58
	K	V		A				Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	K	V		A		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,14	0,00	0,14
	K	V		A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,38	0,00	1,38
	K	V			R		A35V	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	6,35	0,00	6,35
	K	V			R			2,7%	1,8%	0,0%	0,0%	95,5%	0,0%	0,19	0,12	0,00	6,64	0,00
	K	V						2,2%	9,4%	9,5%	78,9%	0,0%	0,27	1,15	1,16	9,63	0,00	12,21
	K	V						0,0%	0,8%	1,1%	98,1%	0,0%	0,00	0,04	0,06	5,11	0,00	5,21
	K	T	A	G				6,8%	0,0%	0,0%	93,2%	0,0%	0,11	0,00	0,00	1,51	0,00	1,62
	K	Q	A		R			0,3%	2,4%	1,9%	95,4%	0,0%	0,04	0,36	0,28	14,00	0,00	14,68

Figura 8-9

[illegible]

Figura 8-10

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Otros cambios de aminoácidos	Selección secundaria									
								Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos graso liberados (ug)				
61	72	116	133	151	163	164	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total
	E	A	A	G	R		0,0%	2,8%	0,0%	97,2%	0,0%	0,00	0,11	0,00	3,75	0,00	3,86
	E	A	A	G	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,36	0,00	1,36
	E	A	A	G			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01
	E	A	A	A	R		0,2%	2,9%	5,0%	91,1%	0,8%	0,02	0,27	0,47	8,50	0,08	9,33
	E	A	A	A			1,3%	5,3%	6,6%	86,3%	0,5%	0,08	0,34	0,42	5,55	0,03	6,43
	E	A	A			R	0,0%	5,6%	1,7%	92,6%	0,0%	0,00	0,40	0,12	6,59	0,00	7,12
	E	A		G	R		Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	E	A		G	R		0,0%	0,0%	0,9%	99,1%	0,0%	0,00	0,00	0,03	3,25	0,00	3,28
	E	A		G	R		0,0%	3,8%	3,1%	93,1%	0,0%	0,00	0,16	0,13	3,86	0,00	4,15
	E	A				R	4,1%	14,7%	9,4%	68,8%	3,0%	0,34	1,21	0,78	5,67	0,25	8,24
	E	A					1,3%	6,4%	1,0%	90,9%	0,5%	0,08	0,40	0,06	5,69	0,03	6,26
	E		A	A		R	2,9%	6,3%	7,6%	83,2%	0,0%	0,51	1,13	1,36	14,90	0,00	17,90
	E					R	5,4%	14,5%	16,2%	60,6%	3,3%	1,06	2,86	3,21	12,00	0,66	19,79
	E		A		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	5,27	0,00	5,27
	E				R		0,4%	3,1%	3,5%	93,0%	0,0%	0,04	0,38	0,43	11,30	0,00	12,15
	E				R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	3,79	0,00	3,79
		V	A	A	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,54	0,00	0,54
		V	A	A	R		2,9%	7,7%	9,0%	78,5%	1,8%	0,43	1,13	1,32	11,50	0,27	14,65
		V	A	A	R		1,8%	0,0%	0,0%	98,2%	0,0%	0,07	0,00	0,00	3,72	0,00	3,79
		V	A		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	3,85	0,00	3,85
		V	A				2,8%	8,2%	9,4%	79,6%	0,0%	0,28	0,84	0,97	8,15	0,00	10,24
		V		G			1,9%	0,0%	0,0%	98,1%	0,0%	0,04	0,00	0,00	1,90	0,00	1,94
		V				R	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,16	0,00	1,16
		V					Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		V					0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,67	0,00	1,67
		A	A	A	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	5,08	0,00	5,08
		A	A		R		0,3%	1,7%	2,1%	95,9%	0,0%	0,02	0,15	0,19	8,42	0,00	8,78
		A	A		R		2,2%	6,7%	7,1%	84,0%	0,0%	0,38	1,16	1,23	14,60	0,00	17,37
		A	A		R		7,3%	8,6%	52%	71,8%	7,1%	0,79	0,92	0,56	7,72	0,77	10,76

Figura 8-11

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición										Selección secundaria									
										Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)				
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos			Linoléico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total
		A	A				P179Q			0,3%	2,6%	6,3%	0,0%	0,02	0,17	0,41	5,83	0,00	6,42
		A	A			R				0,0%	5,7%	8,7%	0,5%	0,00	0,32	0,50	4,87	0,03	5,72
		A		A	R					Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		A		A	R					0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,73	0,00	0,73
		A			R					3,0%	8,2%	81,4%	0,2%	0,92	2,55	2,24	25,30	0,06	31,07
		A			R					Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
		A				R				0,9%	6,1%	4,8%	1,1%	0,06	0,43	0,34	6,15	0,08	7,06
		A				R				2,9%	4,5%	10,1%	1,6%	0,22	0,34	0,77	6,15	0,12	7,61
							peso			5,1%	14,5%	17,4%	1,7%	0,75	2,12	2,55	8,96	0,26	14,63
							mixto			0,0%	1,4%	0,8%	0,0%	0,00	0,24	0,14	17,00	0,00	17,38
K	T			A	R					5,5%	10,4%	6,4%	1,5%	0,69	0,20	0,28	6,34	0,37	7,88
K	T			A	R					5,5%	8,7%	5,6%	0,0%	0,69	0,16	0,24	6,68	0,00	7,78
K	Q	A	A							4,4%	8,7%	9,9%	2,2%	0,54	0,16	0,43	6,24	0,54	7,92
K	Q	A	A							7,6%	11,1%	9,4%	0,0%	0,95	0,21	0,41	5,99	0,00	7,56
K	Q	A	A	G	R					3,6%	7,6%	7,7%	1,0%	0,46	0,14	0,33	6,67	0,25	7,86
K	Q	A	A	G	R					3,7%	8,1%	5,8%	0,0%	0,46	0,15	0,25	6,86	0,00	7,73
K		A			R					4,3%	10,0%	6,7%	0,9%	0,54	0,19	0,29	6,51	0,23	7,76
K		A			R					4,0%	9,9%	6,3%	0,2%	0,50	0,19	0,28	6,64	0,04	7,64
E		A	A	A	R					3,5%	10,9%	7,9%	2,8%	0,44	0,21	0,34	6,24	0,70	7,93
E		A	A	A	R					5,6%	13,2%	7,2%	0,0%	0,70	0,25	0,31	6,17	0,00	7,43
E				G		R				5,7%	12,8%	11,1%	2,9%	0,72	0,24	0,48	5,62	0,72	7,79
E				G		R				7,1%	13,9%	12,4%	1,8%	0,88	0,26	0,54	5,41	0,45	7,54
E			A		R					5,7%	11,9%	11,1%	1,9%	0,71	0,22	0,48	5,79	0,47	7,67
E			A		R					6,6%	13,2%	10,9%	1,1%	0,82	0,25	0,48	5,68	0,26	7,50
	Q			A	R		A97V			3,8%	7,6%	6,2%	1,5%	0,47	0,14	0,27	6,74	0,38	8,00
	Q			A	R		A97V			4,1%	7,7%	5,9%	0,0%	0,51	0,15	0,26	6,86	0,00	7,77
			A		R					0,6%	4,3%	3,6%	0,0%	0,06	0,42	0,35	8,87	0,00	9,70

Figura 8-12

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Otros cambios de aminoácidos	Selección primaria									
								Porcentaje de ácidos grasos liberados						Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)			
61	72	116	133	151	163	164	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total
E	K	V	A	A	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	14,20	0,00	14,20
E	K	V	A	A			0,0%	5,4%	0,0%	94,6%	0,0%	0,00	0,52	0,00	9,01	0,00	9,53
E	K	V	A			R	2,5%	4,9%	3,4%	892%	0,0%	1,23	2,44	1,69	44,10	0,00	49,46
E	K	V		G	R		0,0%	5,2%	0,0%	94,8%	0,0%	0,00	0,18	0,00	3,27	0,00	3,45
E	K	V	A	A			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	4,69	0,00	4,69
E	K	V			R		1,5%	3,7%	2,6%	922%	0,0%	0,67	1,69	1,19	42,20	0,00	45,75
E	K	V			R		0,3%	5,3%	6,1%	882%	0,0%	0,03	0,50	0,57	8,23	0,00	9,33
E	K	V				R	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	19,70	0,00	19,70
E	K	V					0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	12,70	0,00	12,70
E	K	T	A	A	R		3,5%	8,3%	11,9%	76,3%	0,0%	1,31	3,16	4,52	28,90	0,00	37,89
E	K	T	A	A	R		3,5%	8,3%	11,9%	76,3%	0,0%	1,31	3,16	4,52	28,90	0,00	37,89
E	K	T	A	A	R		3,5%	8,3%	11,9%	76,3%	0,0%	1,31	3,16	4,52	28,90	0,00	37,89
E	K	Q	A	A	R		5,9%	12,1%	11,4%	67,4%	3,2%	5,51	11,30	10,60	62,80	2,97	93,18
E	K	Q	A	A	R		5,9%	12,1%	11,4%	67,4%	3,2%	5,51	11,30	10,60	62,80	2,97	93,18
E	K	Q	A	A	R		5,3%	11,8%	13,4%	66,9%	2,5%	4,65	10,40	11,80	58,70	2,23	87,78
E	K	Q	A	A	R		5,3%	11,8%	13,4%	66,9%	2,5%	4,65	10,40	11,80	58,70	2,23	87,78
E	K	A	A	A	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	19,50	0,00	19,50
E	K	A	A	A	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	19,00	0,00	19,00
E	K	A	A	A		R	0,0%	2,5%	0,0%	97,5%	0,0%	0,00	0,21	0,00	8,16	0,00	8,37
E	K	A		G	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	3,28	0,00	3,28
E	K	A		A			2,6%	6,4%	6,1%	84,9%	0,0%	0,67	1,64	1,57	21,90	0,00	25,78
E	K	A		A			0,0%	6,0%	3,2%	90,7%	0,0%	0,00	0,77	0,41	11,50	0,00	12,67
E	K	A				R	0,0%	6,5%	4,6%	88,9%	0,0%	0,00	1,19	0,85	16,30	0,00	18,34
E	K	A				R	0,0%	7,8%	2,8%	89,4%	0,0%	0,00	1,04	0,37	11,90	0,00	13,31
E	K	A				R	0,0%	2,0%	2,0%	96,0%	0,0%	0,00	0,43	0,45	21,10	0,00	21,98
E	K	A				R	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	17,10	0,00	17,10
E	K		A	G		R		Bajo	Bajo	Alto	Bajo	0,00	0,00	0,00	Alto	0,00	0,00
E	K		A	A	R		0,0%	11,8%	7,3%	76,8%	4,0%	0,01	4,44	2,77	29,00	1,52	37,74
E	K		A	A	R		0,0%	11,8%	7,3%	76,8%	4,0%	0,01	4,44	2,77	29,00	1,52	37,74

Figura 8-13

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Selección primaria											
							Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)						
							Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linoleico	Oleico
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos	8,0%	12,6%	16,2%	63,2%	0,0%	5,42	8,48	10,90	42,60	0,00	67,40
E	K		A	A			K12M	4,4%	7,9%	15,9%	71,7%	0,0%	2,56	4,55	-9,20	41,40	0,02	57,73
E	K		A	A				K12M	4,4%	7,9%	15,9%	71,7%	0,0%	2,56	4,55	9,20	41,40	0,02
E	K		A				W17L	11,2%	7,5%	19,3%	55,6%	6,4%	3,04	2,03	5,25	15,10	1,74	27,16
E	K		A			R		3,0%	11,9%	11,7%	73,3%	0,0%	1,17	4,60	4,52	28,30	0,00	38,59
E	K		A			R		3,0%	11,9%	11,7%	73,3%	0,0%	1,17	4,60	4,52	28,30	0,00	38,59
E	K				R			3,9%	7,7%	6,3%	76,5%	5,5%	2,19	4,34	3,54	43,00	3,11	56,18
E	E	V	A	A		R		2,4%	3,9%	3,2%	90,5%	0,0%	0,46	0,77	0,63	17,70	0,00	19,56
E	E	V	A	A				1,1%	2,7%	2,6%	93,6%	0,0%	0,16	0,38	0,37	13,30	0,00	14,21
E	E	V	A		R			1,2%	2,6%	2,6%	93,6%	0,0%	0,14	0,29	0,30	10,70	0,00	11,43
E	E	V	A				A52S	1,1%	6,3%	4,6%	88,0%	0,0%	0,09	0,53	0,39	7,40	0,00	8,41
E	E	V	A				A52S	7,1%	11,2%	24,7%	56,6%	0,5%	3,04	4,83	10,60	24,30	0,19	42,96
E	E	V	A		R			2,3%	8,2%	3,9%	83,8%	1,8%	0,24	0,88	0,42	8,95	0,19	10,67
E	E	V	A					2,2%	2,1%	3,0%	91,7%	1,1%	0,36	0,35	0,50	15,30	0,18	16,68
E	E	V	A			R		0,0%	2,9%	0,0%	97,1%	0,0%	0,00	0,32	0,00	10,80	0,00	11,12
E	E	V		G				0,2%	12,9%	5,0%	82,0%	0,0%	0,01	0,53	0,21	3,39	0,00	4,14
E	E	V			R			1,4%	4,4%	2,8%	91,0%	0,4%	0,19	0,60	0,38	12,50	0,06	13,73
E	E	V						1,2%	7,9%	3,8%	87,2%	0,0%	0,07	0,45	0,22	5,00	0,00	5,74
E	E	V	A		R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,73	0,00	0,73
E	E	V		G				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	2,00	0,00	2,00
E	E	V		A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	5,98	0,00	5,98
E	E	V		A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	5,83	0,00	5,83
E	E	V			R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	12,50	0,00	12,50
E	E	V			R			0,0%	6,9%	0,9%	92,2%	0,0%	0,00	0,23	0,03	3,04	0,00	3,30
E	E	V				R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	15,00	0,00	15,00
E	E	T			R			3,6%	6,8%	4,2%	85,4%	0,0%	0,82	1,54	0,95	19,30	0,00	22,60
E	E	Q	A	G				0,0%	17,5%	8,2%	74,3%	0,0%	0,00	1,17	0,55	4,98	0,00	6,70
E	E	Q	A	G				0,0%	17,5%	8,2%	74,3%	0,0%	0,00	1,17	0,55	4,98	0,00	6,70
E	E	A	A	G				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,01

Figura 8-14

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Selección primaria											
							Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)						
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total
E	E	A	A	A	G			0,0%	8,5%	0,0%	91,5%	0,0%	0,00	0,38	0,00	4,09	0,00	4,47
E	E	A	A	A	R			1,3%	3,5%	3,5%	91,8%	0,0%	0,34	0,93	0,93	24,60	0,00	26,80
E	E	A	A	A	R			0,0%	3,0%	0,0%	97,0%	0,0%	0,00	0,41	0,00	13,20	0,00	13,61
E	E	A	A	A				1,4%	4,9%	4,0%	87,4%	2,3%	0,31	1,11	0,91	19,90	0,53	22,76
E	E	A	A	A	R			3,2%	4,1%	3,7%	88,9%	0,0%	122	1,56	1,41	33,70	0,00	37,89
E	E	A	A					0,1%	5,5%	5,9%	88,4%	0,0%	0,02	0,76	0,82	12,30	0,00	13,91
E	E	A	A					0,0%	0,0%	1,5%	98,5%	0,0%	0,00	0,00	0,29	18,50	0,00	18,79
E	E	A	A			R		0,0%	0,3%	0,0%	99,7%	0,0%	0,00	0,02	0,00	6,23	0,00	6,25
E	E	A		A		R		11,1%	54,2%	26,3%	Alto	8,4%	0,99	4,81	2,33	Alto	0,74	8,87
E	E	A		A				0,0%	6,3%	4,6%	89,1%	0,0%	0,00	0,78	0,57	11,00	0,00	12,35
E	E	A		A		R		0,0%	5,7%	4,5%	89,9%	0,0%	0,00	0,85	0,67	13,40	0,00	14,91
E	E	A			R			0,0%	1,4%	0,0%	98,6%	0,0%	0,00	0,16	0,00	11,40	0,00	11,56
E	E	A			R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	8,61	0,00	8,61
E	E	A			R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	28,30	0,00	28,30
E	E		A	G				5,6%	18,7%	11,5%	61,3%	2,8%	2,86	9,52	5,86	31,20	1,44	50,88
E	E		A	G				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,94	0,00	0,94
E	E		A	A	R			0,3%	10,6%	12,8%	76,2%	0,0%	0,06	1,90	2,29	13,60	0,00	17,85
E	E		A	A	R		P18S,A21V	2,2%	7,7%	3,3%	83,7%	3,2%	0,24	0,87	0,37	9,43	0,36	11,26
E	E		A	A	R			0,3%	10,6%	12,8%	76,2%	0,0%	0,06	1,90	2,29	13,60	0,00	17,85
E	E		A	A	R			0,3%	10,6%	12,8%	76,2%	0,0%	0,06	1,90	2,29	13,60	0,00	17,85
E	E		A	A	R			0,1%	12,0%	4,3%	83,6%	0,0%	0,02	2,74	0,99	19,10	0,00	22,85
E	E		A	A	R			0,1%	12,0%	4,3%	83,6%	0,0%	0,02	2,74	0,99	19,10	0,00	22,85
E	E		A		R		K12M	3,0%	10,0%	12,4%	71,8%	2,7%	0,82	2,69	3,36	19,40	0,73	27,00
E	E		A		R		K12M	3,0%	10,0%	12,4%	71,8%	2,7%	0,82	2,69	3,36	19,40	0,73	27,00
E	E			G	R			0,0%	18,2%	5,5%	76,4%	0,0%	0,00	1,47	0,44	6,18	0,00	8,09
E	E			G		R		12,8%	9,1%	15,4%	60,3%	2,4%	4,47	3,19	5,40	21,10	0,84	35,00
E	E			A	R			0,2%	10,5%	10,0%	79,4%	0,0%	0,05	3,53	3,35	26,70	0,00	33,63
E	E			G	R		F65V	0,0%	0,0%	2,1%	84,0%	13,9%	0,00	0,00	0,51	20,40	3,37	24,28
E	E			G	R		F65V	0,0%	0,0%	2,1%	84,0%	13,9%	0,00	0,00	0,51	20,40	3,37	24,28

Figura 8-15

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Otros cambios de aminoácidos	Selección primaria									
								Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)				
61	72	116	133	151	163	164	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total
E		V	A	G	R		1,8%	9,3%	4,3%	83,8%	0,9%	0,11	0,57	0,26	5,13	0,05	6,12
E		V	V	A	G		1,4%	12,3%	5,4%	80,9%	0,0%	0,07	0,64	0,28	4,18	0,00	5,17
E		V	V	A	A	R	2,6%	5,9%	5,8%	85,7%	0,0%	0,56	1,25	124	18,30	0,00	21,35
E		V	V	A	A	R	0,0%	1,6%	0,0%	98,4%	0,0%	0,00	0,09	0,00	5,58	0,00	5,67
E		V	V	A	A	R	2,9%	6,4%	3,8%	85,8%	1,1%	0,80	1,76	1,04	23,70	0,31	27,62
E		V	V	A	A	R	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	9,14	0,00	9,14
E		V	V	A	A		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	9,13	0,00	9,13
E		V	V	A		R											
E		V	V	A		R	2,3%	4,8%	3,5%	88,3%	1,0%	0,36	0,73	0,55	13,60	0,16	15,40
E		V	V	A		R	1,9%	4,0%	3,1%	90,9%	0,0%	0,84	1,77	1,37	39,90	0,00	43,88
E		V	V	A			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	8,55	0,00	8,55
E		V		A	R		0,0%	25%	0,0%	97,5%	0,0%	0,00	0,33	0,00	12,60	0,00	12,93
E		V			R		18,2%	39,1%	29,5%	Alto	13,2%	0,47	1,01	0,76	Alto	0,34	2,58
E		V				R	0,0%	2,9%	0,0%	97,1%	0,0%	0,00	0,24	0,00	7,89	0,00	8,13
E		Q					6,4%	8,1%	14,7%	70,6%	0,2%	257	3,28	5,92	28,40	0,08	40,25
E		Q	A			R	8,9%	5,3%	25,6%	57,2%	2,9%	1,92	1,15	5,51	12,30	0,63	21,51
E		Q		A	R		1,4%	7,1%	5,8%	85,7%	0,0%	0,32	1,63	1,33	19,60	0,00	22,88
E		A	A	G	R		0,0%	0,9%	0,0%	99,1%	0,0%	0,00	0,08	0,00	8,13	0,00	8,21
E		A	A	A			0,0%	11,4%	1,3%	87,3%	0,0%	0,00	0,31	0,04	2,36	0,00	2,70
E		A	A				0,0%	3,2%	5,2%	91,5%	0,0%	0,00	0,75	1,21	21,10	0,00	23,06
E		A		A	R		0,0%	13,2%	0,0%	86,8%	0,0%	0,00	0,22	0,00	1,45	0,00	1,67
E		A		A	R		2,7%	6,1%	4,5%	86,0%	0,6%	1,90	4,28	3,17	60,20	0,42	69,97
E		A		A			0,0%	7,5%	4,3%	88,3%	0,0%	0,00	0,75	0,43	8,86	0,00	10,04
E		A		A			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	11,80	0,00	11,80
E		A			R		2,5%	5,1%	3,9%	88,4%	0,0%	0,06	0,12	0,09	2,00	0,00	2,26
E		A				R	0,0%	9,1%	5,5%	84,8%	0,6%	0,00	1,44	0,87	13,40	0,09	15,80
E				G	R		9,4%	24,0%	20,5%	40,6%	5,5%	6,69	17,00	14,50	28,80	3,89	70,88
E				G		R	9,4%	24,0%	20,5%	40,6%	5,5%	6,69	17,00	14,50	28,80	3,89	70,88
E				A			8,5%	15,4%	18,9%	53,7%	3,5%	9,98	18,00	2210	62,70	4,03	116,81

Figura 8-16

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Otros cambios de aminoácidos	Selección primaria											
								Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)						
61	72	116	133	151	163	164	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total		
E			A	A	R														
E	Q	Q			R		2,3%	6,6%	6,7%	82,3%	2,1%	2,29	6,75	6,81	83,60	2,09	101,54		
E	Q	Q			R		2,3%	6,6%	6,7%	82,3%	2,1%	2,29	6,75	6,81	83,60	2,09	101,54		
E	Q	Q	A	G		R	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Bajo	0,00	0,00	0,00	Alto	0,00	0,00		
E	Q	Q	A	G		R	Bajo	Bajo	Bajo	Alto	Bajo	0,00	0,00	0,00	Alto	0,00	0,00		
E					R		3,7%	8,4%	8,2%	79,7%	0,0%	3,20	7,17	6,97	68,00	0,00	85,34		
E					R		3,7%	8,4%	8,2%	79,7%	0,0%	3,20	7,17	6,97	68,00	0,00	85,34		
E			A			R	4,9%	8,6%	9,9%	76,5%	0,0%	2,92	5,12	5,91	45,50	0,00	59,45		
E			A			R	4,9%	8,6%	9,9%	76,5%	0,0%	2,92	5,12	5,91	45,50	0,00	59,45		
E			A		R		4,5%	9,7%	10,7%	72,9%	2,2%	6,00	12,90	14,30	97,00	2,89	133,09		
E			A		R		4,5%	9,7%	10,7%	72,9%	2,2%	6,00	12,90	14,30	97,00	2,89	133,09		
A	K	V	A	A	R		0,3%	6,6%	3,1%	90,0%	0,0%	0,02	0,39	0,18	5,33	0,00	5,92		
A	K	V	A	A	R		0,0%	1,5%	0,0%	98,5%	0,0%	0,00	0,12	0,00	7,53	0,00	7,65		
A	K	V	A	A															
A	K	V	A	A			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	8,48	0,00	8,48		
A	K	V	A	A			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	5,67	0,00	5,67		
A	K	V	A	A			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	8,05	0,00	8,05		
A	K	V	A			R	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	12,70	0,00	12,70		
A	K	V		A	R		1,7%	4,7%	4,4%	87,5%	1,7%	0,44	1,19	1,12	22,30	0,43	25,48		
A	K	V		A	R		0,0%	0,7%	0,0%	99,3%	0,0%	0,00	0,07	0,00	9,38	0,00	9,45		
A	K	V				R	1,6%	7,2%	3,5%	87,7%	0,0%	0,15	0,68	0,33	8,21	0,00	9,37		
A	K	V				R	2,4%	7,7%	4,1%	84,8%	0,9%	0,35	1,16	0,62	12,70	0,14	14,97		
A	K	V					3,9%	9,5%	5,3%	80,5%	0,8%	0,60	1,44	0,80	12,20	0,12	15,16		
A	K	V					0,0%	2,2%	0,0%	97,8%	0,0%	0,00	0,17	0,00	7,70	0,00	7,87		
A	K	T	A	A			4,8%	8,0%	12,9%	74,4%	0,0%	1,02	1,69	2,74	15,80	0,00	21,25		
A	K	T	A	A			4,8%	8,0%	12,9%	74,4%	0,0%	1,02	1,69	2,74	15,80	0,00	21,25		
A	K	T	A		R		1,6%	11,9%	6,6%	79,9%	0,0%	0,47	3,49	1,92	23,40	0,00	29,28		
A	K	T	A		R		1,6%	11,9%	6,6%	79,9%	0,0%	0,47	3,49	1,92	23,40	0,00	29,28		
A	K	Q	A	G			A48S												

Figura 8-17

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición											Selección primaria										
											Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)					
											Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos				1,3%	4,5%	42%	89,9%	0,0%	0,69	2,43	2,27	48,20	0,00	FA total
A	K	Q		G	R						1,3%	4,5%	4,2%	89,9%	0,0%	0,69	2,43	2,27	48,20	0,00	53,59
A	K	Q		G	R						1,3%	4,5%	4,2%	89,9%	0,0%	0,69	2,43	2,27	48,20	0,00	53,59
A	K	A	A		R						2,4%	6,6%	3,2%	87,8%	0,0%	1,22	3,27	1,61	43,80	0,00	49,90
A	K	A	A		R						1,6%	3,7%	2,3%	92,3%	0,0%	0,94	2,20	1,38	54,40	0,00	58,92
A	K	A	A		R						1,6%	7,6%	5,1%	85,7%	0,0%	0,14	0,68	0,46	7,62	0,00	8,90
A	K	A		A	R						0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	14,90	0,00	14,90
A	K	A		A							3,3%	8,2%	7,1%	80,5%	0,9%	0,38	0,95	0,83	9,36	0,11	11,62
A	K	A			R						2,0%	7,9%	5,6%	84,6%	0,0%	0,21	0,81	0,57	8,70	0,00	10,29
A	K	A				R					0,0%	6,7%	3,7%	89,6%	0,0%	0,00	1,09	0,59	14,50	0,00	16,18
A	K		A	G		R					5,0%	4,7%	17,5%	72,8%	0,0%	1,44	1,35	5,05	21,00	0,00	28,84
A	K		A	G		R					5,0%	4,7%	17,5%	72,8%	0,0%	1,44	1,35	5,05	21,00	0,00	28,84
A	K		A	A	R						0,3%	12,7%	9,3%	77,6%	0,0%	0,09	3,63	2,66	22,10	0,00	28,48
A	K		A	A	R						0,3%	12,7%	9,3%	77,6%	0,0%	0,09	3,63	2,66	22,10	0,00	28,48
A	K		A	A	R					A48S	0,3%	12,7%	9,3%	77,6%	0,0%	0,09	3,63	2,66	22,10	0,00	28,48
A	K		A	A	R					A48S	0,3%	12,7%	9,3%	77,6%	0,0%	0,09	3,63	2,66	22,10	0,00	28,48
A	K		A		R						3,4%	8,7%	11,8%	76,1%	0,0%	1,28	3,29	4,49	28,90	0,00	37,96
A	K		A		R						3,4%	8,7%	11,8%	76,1%	0,0%	1,28	3,29	4,49	28,90	0,00	37,96
A	K			A	R						1,8%	10,0%	3,7%	83,8%	0,6%	0,19	1,04	0,39	8,70	0,06	10,38
A	K				R					K12M	13,4%	5,3%	21,4%	51,1%	8,8%	3,70	1,46	5,90	14,10	2,42	27,58
A	K										9,0%	16,7%	17,4%	51,6%	5,3%	3,74	6,92	7,21	21,40	2,21	41,48
A	K			A	R						0,0%	10,0%	7,6%	82,4%	0,0%	0,00	1,82	1,38	15,00	0,00	18,20
A	K			A	R						0,0%	10,0%	7,6%	82,4%	0,0%	0,00	1,82	1,38	15,00	0,00	18,20
A	K			A	R						1,6%	3,9%	18,7%	75,8%	0,0%	0,59	1,42	6,76	27,40	0,00	36,17
A	K			A	R						1,6%	3,9%	18,7%	75,8%	0,0%	0,59	1,42	6,76	27,40	0,00	36,17
A	E	V	A	G		R				G99C	2,5%	5,6%	4,6%	87,0%	0,4%	0,57	1,29	1,06	20,20	0,09	23,21
A	E	V	A	A	R						0,6%	2,3%	3,1%	94,0%	0,0%	0,12	0,43	0,59	17,80	0,00	18,94
A	E	V	A	A							0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	7,03	0,00	7,03
A	E	V	A		R						1,7%	4,4%	2,8%	90,9%	0,3%	0,20	0,52	0,34	10,90	0,03	12,00
A	E	V	A		R						0,1%	1,0%	1,0%	98,0%	0,0%	0,01	0,15	0,14	14,10	0,00	14,39

Figura 8-18

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Otros cambios de aminoácidos	Selección primaria													
							Porcentaje de ácidos grasos liberados							Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)							
61	72	116	133	151	163	164	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total
A	E	V	A		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0	0,0	0,0	0,62	0,00	0,00	0,00	0,62	0,00	0,62
A	E	V	A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0	0,0	0,0	3,97	0,00	0,00	0,00	3,97	0,00	3,97
A	E	V		G			0,0%	11,2%	2,6%	86,1%	0,0%	0,0	0,46	0,11	3,56	0,00	0,46	0,11	3,56	0,00	4,13
A	E	V		A	R		0,5%	0,0%	0,0%	99,5%	0,0%	0,04	0,00	0,00	9,40	0,00	0,00	0,00	9,40	0,00	9,44
A	E	V		A	R		0,1%	0,0%	15%	98,7%	0,0%	0,02	0,00	0,12	10,10	0,00	0,00	0,12	10,10	0,00	10,23
A	E	V		A	R		1,2%	2,2%	1,1%	95,5%	0,0%	0,20	0,35	0,17	15,20	0,00	0,35	0,17	15,20	0,00	15,92
A	E	V		A	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	9,77	0,00	0,00	0,00	9,77	0,00	9,77
A	E	V		A		R	2,9%	9,7%	5,3%	82,1%	0,0%	0,31	1,04	0,57	8,80	0,00	1,04	0,57	8,80	0,00	10,72
A	E	V		A		R	0,0%	1,3%	0,0%	98,7%	0,0%	0,00	0,09	0,00	6,64	0,00	0,09	0,00	6,64	0,00	6,73
A	E	V			R		1,5%	4,6%	3,3%	89,2%	1,4%	0,59	1,87	1,32	36,10	0,58	1,87	1,32	36,10	0,58	40,46
A	E	V					0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	10,90	0,00	0,00	0,00	10,90	0,00	10,90
A	E	Q	A	A	R		1,4%	8,5%	3,0%	87,2%	0,0%	0,21	1,28	0,45	13,20	0,00	1,28	0,45	13,20	0,00	15,14
A	E	Q		G																	
A	E	Q		G																	
A	E	A	A	G		R	4,2%	1,2%	94,6%	0,0%	94,6%	0,10	0,03	2,27	0,00	2,40	0,03	2,27	0,00	2,40	
A	E	A	A		R		1,1%	1,9%	2,5%	92,2%	2,3%	0,44	0,70	0,96	34,90	0,86	0,70	0,96	34,90	0,86	37,86
A	E	A	A		R		1,4%	8,1%	5,4%	85,0%	0,0%	0,11	0,62	0,42	6,53	0,00	0,62	0,42	6,53	0,00	7,68
A	E	A	A				0,0%	1,6%	1,3%	97,1%	0,0%	0,00	0,35	0,29	21,20	0,00	0,35	0,29	21,20	0,00	21,84
A	E	A	A			R	0,0%	7,1%	4,6%	88,3%	0,0%	0,00	1,02	0,66	12,70	0,00	1,02	0,66	12,70	0,00	14,38
A	E	A		G		R	0,0%	3,4%	0,0%	96,6%	0,0%	0,00	0,03	0,00	0,73	0,00	0,03	0,00	0,73	0,00	0,76
A	E	A		A	R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	11,40	0,00	0,00	0,00	11,40	0,00	11,40
A	E	A		A		R	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	8,22	0,00	0,00	0,00	8,22	0,00	8,22
A	E	A		A			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	12,00	0,00	0,00	0,00	12,00	0,00	12,00
A	E						10,3%	7,0%	23,5%	58,2%	0,9%	2,56	1,73	5,82	14,40	0,23	1,73	5,82	14,40	0,23	24,74
A	E				R		3,9%	10,4%	7,6%	77,1%	1,0%	1,09	2,92	2,12	21,60	0,28	2,92	2,12	21,60	0,28	28,01
A	E				R		3,9%	10,4%	7,6%	77,1%	1,0%	1,09	2,92	2,12	21,60	0,28	2,92	2,12	21,60	0,28	28,01
A	E			A	R		4,4%	5,5%	9,5%	80,6%	0,0%	1,83	2,31	4,00	33,90	0,00	2,31	4,00	33,90	0,00	42,04
A	E			A	R		4,4%	5,5%	9,5%	80,6%	0,0%	1,83	2,31	4,00	33,90	0,00	2,31	4,00	33,90	0,00	42,04
A		V	A	A	R		1,4%	0,9%	2,4%	95,3%	0,0%	0,27	0,19	0,48	18,90	0,00	0,19	0,48	18,90	0,00	19,83

Figura 8-19

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Selección primaria											
							Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)						
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total
A		V	A	A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	9,82	0,00	9,82
A		V	A	A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	11,30	0,00	11,30
A		V	A		R			3,1%	5,4%	2,9%	87,4%	1,2%	0,38	0,65	0,35	10,60	0,15	12,13
A		V	A		R			3,1%	5,1%	4,0%	87,8%	0,0%	1,41	2,34	1,85	40,40	0,00	46,00
A		V	A		R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	8,05	0,00	8,05
A		V	A			R		3,3%	6,7%	5,0%	85,0%	0,0%	0,98	1,98	1,50	25,30	0,00	29,76
A		V	A			R		0,0%	5,3%	2,0%	92,7%	0,0%	0,00	0,74	0,28	12,80	0,00	13,81
A		V	A			R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	13,90	0,00	13,90
A		V	A			R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	22,80	0,00	22,80
A		V	A			R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	5,39	0,00	5,39
A		V		G	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,21	0,00	1,21
A		V		A		R		2,8%	9,6%	6,2%	81,4%	0,0%	0,29	0,98	0,64	8,31	0,00	10,21
A		V				R		2,5%	5,4%	5,2%	86,5%	0,4%	1,16	2,48	2,39	39,80	0,21	46,04
A		V				R		0,0%	6,2%	0,7%	93,2%	0,0%	0,00	0,82	0,09	12,40	0,00	13,31
A		V						0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	8,62	0,00	8,62
A		V				R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	15,40	0,00	15,40
A		V						0,0%	0,8%	0,0%	99,2%	0,0%	0,00	0,06	0,00	7,27	0,00	7,33
A		V				R	V22D	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,85	0,00	0,85
A		T					D138E,K213E	18,1%	44,5%	28,1%	Alto	9,3%	0,42	1,04	0,66	Alto	0,22	2,34
A		Q	A	A	R			3,9%	8,9%	6,2%	77,1%	4,0%	3,33	7,59	5,26	65,70	3,38	85,26
A		A	A	G		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	3,72	0,00	3,72
A		A	A		R		K146N	16,4%	41,1%	28,3%	Alto	14,2%	0,56	1,39	0,96	Alto	0,48	3,38
A		A	A					0,0%	0,0%	3,1%	96,9%	0,0%	0,00	0,00	0,57	17,70	0,00	18,27
A		A	A	A	R			13,9%	39,1%	35,5%	Alto	11,4%	0,62	1,75	1,59	Alto	0,51	4,47
A		A		A				0,0%	7,7%	5,6%	86,6%	0,0%	0,00	0,98	0,71	10,90	0,00	12,58
A		A			R			0,0%	2,5%	0,8%	96,7%	0,0%	0,00	0,43	0,14	16,50	0,00	17,07
A			A	G	R			10,3%	8,7%	14,8%	58,5%	7,7%	2,66	2,25	3,83	15,10	1,99	25,83
A		A	A		R		S54L	4,1%	11,2%	11,3%	70,6%	2,8%	1,96	5,43	5,45	34,10	1,35	48,29

Figura 8-20

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Selección primaria												
							Porcentaje de ácidos grasos liberados							Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)					
							Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos	4,1%	11,2%	11,3%	70,6%	2,8%	1,96	5,43	5,45	34,10	1,35	48,29	
A		A		A	R		S54L	2,2%	13,6%	12,0%	72,1%	0,0%	0,42	2,57	2,27	13,60	0,00	18,86	
A		A		A	R		K12M	2,2%	13,6%	12,0%	72,1%	0,0%	0,42	2,57	2,27	13,60	0,00	18,86	
	K	V	A	G				2,9%	5,8%	4,1%	87,2%	0,0%	1,23	2,44	1,70	36,50	0,00	41,87	
	K	V	A	G				Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	K	V	A	A	R														
	K	V	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	4,18	0,00	4,18	
	K	V	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	4,07	0,00	4,07	
	K	V	A	A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	4,64	0,00	4,64	
	K	V	A	A	R		A141T	1,2%	6,0%	3,8%	89,0%	0,0%	0,11	0,53	0,33	7,76	0,00	8,72	
	K	V	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	7,10	0,00	7,10	
	K	V	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	23,50	0,00	23,50	
	K	V	A	A	R		V62F	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	6,40	0,00	6,40	
	K	V	A	A			P162S	2,2%	6,7%	3,8%	87,3%	0,0%	1,00	3,03	1,71	39,30	0,00	45,04	
	K	V		G		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,52	0,00	0,52	
	K	V		A	R			1,3%	4,9%	3,0%	89,5%	1,4%	0,16	0,63	0,38	11,40	0,17	12,74	
	K	V		A	R			1,2%	5,5%	2,0%	91,3%	0,0%	0,29	1,31	0,47	21,60	0,00	23,67	
	K	V		A				1,7%	4,4%	3,5%	90,4%	0,0%	0,36	0,92	0,72	18,80	0,00	20,80	
	K	V		A		R		0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	5,77	0,00	5,77	
	K	V		A				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	9,05	0,00	9,05	
	K	V			R			0,6%	7,2%	3,1%	89,2%	0,0%	0,06	0,79	0,34	9,83	0,00	11,02	
	K	V			R		A35V	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	21,10	0,00	21,10	
	K	V			R			0,2%	6,1%	1,6%	92,2%	0,0%	0,01	0,31	0,08	4,72	0,00	5,12	
	K	V						3,4%	6,2%	4,6%	85,8%	0,0%	1,33	2,44	1,80	33,60	0,00	39,17	
	K	V						0,0%	7,4%	0,1%	92,6%	0,0%	0,00	0,99	0,01	12,40	0,00	13,40	
	K	T	A	G				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,75	0,00	0,75	
	K	Q	A		R			2,3%	8,6%	4,1%	84,9%	0,0%	1,25	4,56	2,20	45,20	0,00	53,21	
	K	Q	A		R			0,6%	5,1%	3,6%	90,4%	0,3%	0,16	1,30	0,90	22,90	0,07	25,33	
	K	A	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	29,70	0,00	29,70	

Figura 8-21

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición							Selección primaria												
							Porcentaje de ácidos grasos liberados							Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)					
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	FA total	
	K	A	A	A				2,8%	5,4%	5,9%	84,0%	1,9%	0,66	1,27	1,40	19,80	0,46	23,58	
	K	A	A		R			1,8%	5,3%	3,0%	89,5%	0,4%	1,71	4,92	2,78	83,70	0,39	93,50	
	K	A	A					0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	15,30	0,00	15,30	
	K	A		G				0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,65	0,00	0,65	
	K	A			R			0,0%	1,6%	0,0%	98,4%	0,0%	0,00	0,21	0,00	12,90	0,00	13,11	
	K	A			R			1,7%	8,6%	4,0%	85,8%	0,0%	0,14	0,70	0,33	6,98	0,00	8,14	
	K	A			R			0,9%	8,9%	5,8%	84,4%	0,0%	0,06	0,61	0,40	5,80	0,00	6,88	
	K	A				R		0,0%	5,4%	0,7%	93,9%	0,0%	0,00	0,57	0,08	9,83	0,00	10,47	
	K	A						0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	20,50	0,00	20,50	
	E	V	A	G	R			0,0%	2,4%	0,0%	97,6%	0,0%	0,00	0,07	0,00	2,98	0,00	3,05	
	E	V	A	A	R			0,5%	5,9%	1,3%	92,2%	0,0%	0,04	0,43	0,10	6,67	0,00	7,23	
	E	V	A	A				1,5%	0,0%	0,8%	97,8%	0,0%	0,09	0,00	0,05	5,83	0,00	5,96	
	E	V	A		R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	5,40	0,00	5,40	
	E	V	A			R		0,0%	2,2%	0,0%	97,8%	0,0%	0,00	0,19	0,00	8,28	0,00	8,47	
	E	V		G				0,0%	12,8%	3,1%	84,1%	0,0%	0,00	0,98	0,24	6,40	0,00	7,61	
	E	V		G				Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
	E	V		A	R			0,6%	10,7%	2,7%	86,1%	0,0%	0,03	0,54	0,14	4,38	0,00	5,09	
	E	V			R			2,2%	0,0%	1,9%	95,9%	0,0%	0,35	0,00	0,30	15,40	0,00	16,06	
	E	V			R			0,0%	2,7%	0,0%	97,3%	0,0%	0,00	0,20	0,00	7,30	0,00	7,50	
	E	V			R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	12,00	0,00	12,00	
	E	V			R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	7,92	0,00	7,92	
	E	V						2,6%	6,8%	3,7%	84,4%	2,5%	0,24	0,64	0,35	7,84	0,23	9,29	
	E	V				R		0,0%	6,0%	0,0%	94,0%	0,0%	0,00	0,58	0,00	9,15	0,00	9,73	
	E	V						0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	12,20	0,00	12,20	
	E	T	A	G	R		N55M	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	0,42	0,00	0,42	
	E	Q	A	A	R			0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	1,98	0,00	1,98
	E	Q		G		R		0,0%	9,6%	3,8%	86,7%	0,0%	0,0%	0,44	0,17	4,02	0,00	4,64	
	E	A	A	G	R			0,0%	5,9%	2,8%	91,3%	0,0%	0,00	0,63	0,30	9,74	0,00	10,67	
	E	A	A	G	R														

Figura 8-22

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición										Selección primaria									
										Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)				
										Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos												
	E	A	A	G			Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	E	A	A	A	R		0,00	5,20	3,20	91,50	0,00	0,00	1,36	0,86	24,10	0,01	0,01	26,33	
	E	A	A	A			0,00	6,60	1,10	92,20	0,00	0,00	0,66	0,11	9,16	0,00	0,00	9,93	
	E	A	A			R	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	12,30	0,00	0,00	12,30	
	E	A		G	R		Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	E	A		G	R		18,10	44,50	28,10	Alto	9,30	0,42	1,04	0,66	Alto	0,22	0,22	2,34	
	E	A		G	R		0,00	10,50	0,00	89,50	0,00	0,00	0,82	0,00	7,01	0,00	0,00	7,83	
	E	A				R	0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	10,20	0,00	0,00	10,20	
	E	A					0,00	0,00	1,00	99,00	0,00	0,00	0,00	0,19	18,40	0,00	0,00	18,59	
	E		A			R	3,60	6,70	14,90	70,40	4,40	2,83	5,18	11,60	54,60	3,39	3,39	77,60	
	E					R	11,40	15,90	11,90	57,20	3,60	3,76	5,22	3,91	18,80	1,19	1,19	32,88	
	E		A		R		3,70	10,10	6,10	79,90	0,20	1,20	3,24	1,94	25,60	0,06	0,06	32,04	
	E				R		3,80	7,30	5,60	79,50	3,70	3,99	7,64	5,80	82,70	3,83	3,83	103,96	
	E						3,70	8,40	8,20	79,70	0,00	3,20	7,17	6,97	68,00	0,00	0,00	85,34	
		V	A	A	R		2,70	1,80	2,80	92,70	0,00	0,56	0,37	0,59	19,30	0,00	0,00	20,82	
		V	A	A	R		0,00	1,90	0,00	98,10	0,00	0,00	0,18	0,00	8,93	0,00	0,00	9,11	
		V	A	A	R		0,00	6,10	0,00	93,90	0,00	0,00	0,15	0,00	2,30	0,00	0,00	2,45	
		V	A		R		3,20	6,70	3,90	85,10	1,10	0,67	1,39	0,80	17,60	0,23	0,23	20,69	
		V	A				2,90	3,00	5,40	87,40	1,30	0,59	0,61	1,10	17,70	0,26	0,26	20,26	
		V		G			0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,75	0,00	0,00	1,75	
		V				R	3,30	8,20	6,40	80,90	1,20	0,49	1,21	0,96	12,00	0,18	0,18	14,83	
		V					0,00	0,00	100,00	Alto	0,00	0,00	0,00	0,09	Alto	0,00	0,00	0,09	
		V					1,40	5,60	4,10	88,40	0,60	0,11	0,43	0,32	6,85	0,05	0,05	7,75	
		A	A	A	R		0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	18,30	0,00	0,00	18,30	
		A	A		R		1,90	5,60	3,80	87,80	0,90	0,29	0,87	0,59	13,60	0,13	0,13	15,49	
		A	A		R		2,40	5,20	4,20	88,20	0,00	0,92	2,00	1,64	34,20	0,00	0,00	38,76	
		A	A		R		0,00	0,00	0,00	100,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,70	0,00	0,00	20,70	
		A	A				0,00	0,30	2,90	96,80	0,00	0,00	0,06	0,56	18,90	0,00	0,00	19,52	
		A	A			R	0,00	5,20	0,00	94,80	0,00	0,00	0,38	0,00	6,88	0,00	0,00	7,26	

Número de posición del residuo de aminoácido y aminoácido en esa posición										Selección primaria										
										Porcentaje de ácidos grasos liberados					Cantidad de ácidos grasos liberados (ug)					
										Linolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Lindolénico	Linoleico	Oleico	Palmitico	Estearico	Linoico
61	72	116	133	151	163	164	Otros cambios de aminoácidos			2,2%	5,7%	4,4%	86,7%	1,0%	0,47	1,20	0,94	18,40	0,22	21,22
		A		A	R				1,8%	4,4%	4,6%	89,2%	0,0%	0,45	1,09	1,14	22,10	0,00	24,78	
		A			R				18,4%	42,4%	32,4%	Alto	6,8%	0,69	1,60	1,22	Alto	0,26	3,77	
		A			R				13,9%	38,8%	40,0%	Alto	7,2%	1,63	4,56	4,70	Alto	0,85	11,74	
		A				R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	13,30	0,00	13,30	
		A				R			0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,00	0,00	0,00	4,28	0,00	4,28	
							peso mixto													
									3,2%	7,2%	5,9%	78,5%	5,2%	1,82	4,04	3,30	44,00	2,89	56,05	
	K	T		A	R				1,8%	7,3%	6,6%	84,3%	0,0%	0,52	2,16	1,94	24,90	0,00	29,52	
	K	T		A	R				1,8%	7,3%	6,6%	84,3%	0,0%	0,52	2,16	1,94	24,90	0,00	29,52	
	K	Q	A	A					4,7%	6,2%	9,4%	79,7%	0,0%	2,94	3,83	5,83	49,60	0,00	62,20	
	K	Q	A	A					4,7%	6,2%	9,4%	79,7%	0,0%	2,94	3,83	5,83	49,60	0,00	62,20	
	K	Q	A	G	R				0,0%	8,0%	10,6%	81,4%	0,0%	0,00	1,30	1,72	13,20	0,00	16,22	
	K	Q	A	G	R				0,0%	8,0%	10,6%	81,4%	0,0%	0,00	1,30	1,72	13,20	0,00	16,22	
	K		A		R				0,2%	8,8%	8,4%	82,6%	0,0%	0,05	1,79	1,71	16,90	0,00	20,45	
	K		A		R				0,2%	8,8%	8,4%	82,6%	0,0%	0,05	1,79	1,71	16,90	0,00	20,45	
	E		A	A	R				5,5%	11,2%	8,5%	74,8%	0,0%	6,91	14,20	10,80	94,70	0,00	126,61	
	E		A	A	R				5,5%	11,2%	8,5%	74,8%	0,0%	6,91	14,20	10,80	94,70	0,00	126,61	
	E			G		R			4,0%	7,2%	11,8%	77,0%	0,0%	1,95	3,48	5,70	37,20	0,00	48,33	
	E			G		R			4,0%	7,2%	11,8%	77,0%	0,0%	1,95	3,48	5,70	37,20	0,00	48,33	
	E			A		R			4,5%	9,7%	10,7%	72,9%	2,2%	6,00	12,90	14,30	97,00	2,89	133,09	
	E			A		R			4,5%	9,7%	10,7%	72,9%	2,2%	6,00	12,90	14,30	97,00	2,89	133,09	
		Q		A	R			A97V	1,4%	4,2%	8,4%	86,0%	0,0%	0,52	1,59	3,16	32,30	0,00	37,57	
		Q		A	R			A97V	1,4%	4,2%	8,4%	86,0%	0,0%	0,52	1,59	3,16	32,30	0,00	37,57	
			A		R				5,3%	9,1%	7,4%	76,9%	1,4%	4,69	8,02	6,56	68,10	1,21	88,58	

Figura 8-24