

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 014 686**

51 Int. Cl.:

**A21D 8/04** (2006.01)

**A21D 10/00** (2006.01)

**C12N 9/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.02.2018 PCT/EP2018/054015**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.08.2018 WO18150021**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2018 E 18709277 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.12.2024 EP 3582619**

54 Título: **Enzima lipolítica para su uso en el horneado**

30 Prioridad:

**20.02.2017 EP 17156925**

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

**24.04.2025**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (50.00%)  
Krogshoejvej 36  
2880 Bagsvaerd, DK y  
PURATOS NV/SA (50.00%)**

72 Inventor/es:

**OESTDAL, HENRIK;  
LANDVIK, SARA, MARIA;  
OLINSKI, ROBERT, PIOTR;  
AGACHE, EVELIEN;  
VAN WINCKEL, BRUNO y  
ARNAUT, FILIP**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

**ES 3 014 686 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**

Enzima lipolítica para su uso en el horneado

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevas enzimas lipolíticas; especialmente a enzimas lipolíticas con propiedades mejoradas para su uso en masa, donde estas, p. ej., pueden sustituir a emulsionantes usados normalmente en el horneado.

**Antecedentes de la invención**

10 La miga blanca y una estructura de miga fina son características importantes para la preferencia de los consumidores por el pan; especialmente por el pan envasado industrialmente tal como el pan de molde. Normalmente se consigue una estructura de miga fina añadiendo un emulsionante a la masa durante la elaboración del pan.

Hoy en día, los consumidores tienden a evitar consumir productos de panadería que contengan emulsionantes.

El uso de enzimas lipolíticas en el horneado se conoce desde hace muchos años.

15 El documento de patente WO 98/26057 divulga una lipasa/fosfolipasa de *Fusarium oxysporum* y su uso en el horneado.

Los documentos de patente WO 2004/099400, WO 2014/147219, US 2013/122144, US 2011/091601, US 6.110.508, WO 02/094123 y US 6.140.094 todos divulgan varias enzimas lipolíticas y su uso en el horneado para la reducción de la pegajosidad de la masa, para mejorar el color de la miga o para mejorar la estructura de la miga.

20 El documento de patente US 2008/118965 divulga métodos de producción de varias enzimas lipolíticas en una célula fúngica filamentosa.

El documento de patente WO 1999/053769 divulga el uso de alfa-amilasa maltogénica y fosfolipasa para mejorar la esponjosidad del producto horneado en el periodo inicial después del horneado.

El uso de enzimas lipolíticas en el horneado puede proporcionar un sabor desagradable no deseado debido a la formación de ácidos grasos de cadena libre.

25 La presente invención se refiere a nuevas enzimas lipolíticas capaces de proporcionar una miga blanca y una estructura de miga fina sin inducir sabor desagradable.

**Sumario de la invención**

30 Los inventores han descubierto una nueva enzima lipolítica que proporciona sorprendentemente una miga blanca y una estructura de miga muy fina, y al mismo tiempo la enzima lipolítica no proporciona sabor desagradable cuando se usa en el horneado, así que los presentes inventores reivindican:

Un polipéptido que tiene actividad de enzima lipolítica, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75 % respecto a los aminoácidos 21 a 309 de SEQ ID NO: 1; y

35 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75 % respecto a la secuencia codificante del polipéptido de SEQ ID NO: 2.

En una realización, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % respecto a los aminoácidos 21 a 309 de SEQ ID NO: 1.

40 En una realización, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención comprende un segmento catalítico de la secuencia de aminoácidos G-H-S-L-G.

En una realización, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención tiene actividad de lipasa, fosfolipasa y/o galactolipasa; especialmente la enzima lipolítica tiene actividad de lipasa y fosfolipasa.

45 En una realización, los presentes inventores reivindican un polinucleótido aislado que codifica la enzima lipolítica de acuerdo con la invención.

En una realización, los presentes inventores reivindican una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende el polinucleótido que codifica la enzima lipolítica de acuerdo con la invención unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un hospedador de expresión.

5 En una realización, los presentes inventores reivindican una célula hospedadora recombinante que comprende el polinucleótido que codifica la enzima lipolítica de acuerdo con la invención unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.

En una realización, los presentes inventores reivindican un método de producción de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención que comprende cultivar una célula hospedadora en condiciones propicias para la producción del polipéptido.

10 En una realización, los presentes inventores reivindican un granulado o un líquido estabilizado que comprende la enzima lipolítica de acuerdo con la invención.

15 En una realización, los presentes inventores reivindican una composición que comprende la enzima lipolítica de acuerdo con la invención y una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en aminopeptidasa, amilasa, alfa-amilasa, alfa-amilasa maltogénica, beta-amilasa, carboxipeptidasa, catalasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, galactanasa, glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa, glucanasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, mananasa, manosidasa, oxidasa, enzimas pectinolíticas, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fosfolipasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa y xilanasas; en particular una composición que comprende la enzima lipolítica de acuerdo con la invención y una o más enzimas seleccionadas del grupo que  
20 consiste en alfa-amilasa maltogénica, beta-amilasa y glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa; especialmente una composición que comprende la enzima lipolítica de acuerdo con la invención y una alfa-amilasa maltogénica.

En una realización, los presentes inventores reivindican un método de preparación de un producto horneado, que comprende la etapa de añadir a la masa, antes de hornear, una enzima lipolítica de acuerdo con la invención, un granulado o un líquido estabilizado de acuerdo con la invención, o una composición de acuerdo con la invención.

25 En una realización, la cantidad de enzima lipolítica de acuerdo con la invención es entre 0,01 y 100 mg, preferentemente entre 0,05 y 50 mg, más preferentemente entre 0,1 y 25 mg, incluso más preferentemente entre 0,1 y 15 mg de proteína enzimática por kg de harina en la masa o en la mezcla batida.

En una realización, los presentes inventores reivindican el uso de una enzima lipolítica de acuerdo con la invención en aplicaciones de panadería y/o pastelería.

30 En una realización, los presentes inventores reivindican el uso de un granulado o un líquido estabilizado que comprende la enzima lipolítica de acuerdo con la invención en aplicaciones de panadería y/o pastelería.

En una realización, los presentes inventores reivindican el uso de una composición que comprende la enzima lipolítica de acuerdo con la invención y una o más enzimas adicionales en aplicaciones de panadería y pastelería.

35 En una realización, los presentes inventores reivindican el uso de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención en mejoradores del pan y/o en mezclas o premezclas de pastelería.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

40 **Enzima lipolítica:** El término "una enzima lipolítica" comprende una enzima (EC 3.1.1) que tiene actividad de lipasa, fosfolipasa y/o galactolipasa; especialmente una enzima que tiene actividad de lipasa y fosfolipasa. La enzima lipolítica también puede tener otras actividades. El término "enzima lipolítica" se usa de forma intercambiable con el término "polipéptidos que tienen actividad de enzima lipolítica".

De acuerdo con la presente invención, la actividad de lipasa se puede medir mediante el siguiente método:

45 La actividad de lipasa se puede determinar usando tributirina como sustrato. Este método se basa en la hidrólisis de tributirina por parte de la enzima, y se registra el consumo de álcali para mantener el pH constante durante la hidrólisis como una función del tiempo.

Una unidad de lipasa (UL) se define como la cantidad de enzima que, en condiciones normales (es decir, a 30 °C; pH 7,0; con goma arábiga al 0,1 % p/v como emulsionante y tributirina 0,16 M como sustrato), libera 1 micromol de ácido butírico titulable por minuto.

Un protocolo útil para identificar la actividad de lipasa es el siguiente que usa placas de tributirina:

Mezcla de sustrato de tributirina:

15 ml de tributirato de glicerina (tributirina)

2 g de goma arábica.

285 ml de H<sub>2</sub>O

5 Para 2 placas usar:

- 5 ml de mezcla de tributirina, añadir 50 ml de tampón Universal 0,02 M a pH 7,0
- Precalentar hasta 60 °C
- Homogeneizar con Ultra Turrax durante 60 segundos para obtener una emulsión uniforme

Preparar una disolución de agarosa al 2 %:

- 10
- 2 g para 100 ml de H<sub>2</sub>O
  - Hervir y llevar la disolución hasta 60 °C (usar un baño de agua)

15 Mezclar 50 ml de solución de tributirina/tampón con 50 ml de agarosa al 2 %, añadir 250 microlitros de cristal violeta al 4 %. Verter 50 ml para cada placa de pocillo individual OmniTray con n.º de cat. 242811 y Nunc TSP 96 con n.º de cat. 445497. Se pueden aplicar muestras de 10 microlitros. Las placas se pueden incubar a 30 °C durante aprox. 1 hora y 3 horas. La actividad se puede fotografiar.

**Actividad de lipasa:** Actividad de triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3), es decir, actividad hidrolítica para enlaces de tipo éster carboxílico en triglicéridos, p. ej., tributirina.

**Actividad de fosfolipasa:** Actividad de fosfolipasa (A1 o A2, EC 3.1.1.32 o 3.1.1.4), es decir, actividad hidrolítica hacia uno o ambos enlaces de tipo éster carboxílico en fosfolípidos tales como la lecitina.

20 **Actividad de galactolipasa:** Actividad de galactolipasa (EC 3.1.1.26), es decir, actividad hidrolítica sobre enlaces de tipo éster carboxílico en galactolípidos tales como DGDG (digalactosil diglicérido).

25 **Secuencia codificante:** El término "secuencia codificante" significa un polinucleótido, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de un polipéptido. Los límites de la secuencia codificante generalmente están determinados por un marco abierto de lectura, que comienza con un codón de iniciación tal como ATG, GTG o TTG y termina con un codón de terminación tal como TAA, TAG o TGA. La secuencia codificante puede ser un ADN genómico, ADNc, ADN sintético o una combinación de estos.

**Fragmento:** El término "fragmento" significa un polipéptido que tiene uno o más (p. ej., varios) aminoácidos ausentes del extremo amino y/o carboxilo de un polipéptido o dominio maduro; en donde el fragmento tiene actividad de enzima lipolítica.

30 **Célula hospedadora:** El término "célula hospedadora" significa cualquier tipo de célula que es susceptible de transformación, transfección, transducción o similar con una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende un polinucleótido de la presente invención.

35 **Aislada:** El término "aislada" significa una sustancia en una forma o entorno en que no se encuentra en la naturaleza. Los ejemplos no limitantes de sustancias aisladas incluyen (1) cualquier sustancia que no tiene un origen natural, (2) cualquier sustancia que incluye, pero no se limita a, cualquier enzima, ácido nucleico, proteína, péptido o cofactor, que se haya separado, al menos en parte, de uno o más o de todos los constituyentes de origen natural con los cuales está asociada en la naturaleza; (3) cualquier sustancia modificada por la intervención humana con respecto a la sustancia que se encuentra en la naturaleza; o (4) cualquier sustancia modificada incrementando la cantidad de la sustancia con respecto a otros componentes con los cuales está asociada de manera natural (p. ej., copias múltiples de un gen que codifica la sustancia; el uso de un promotor más potente que el promotor asociado de manera natural con el gen que codifica la sustancia). Una sustancia aislada puede estar presente en una muestra de caldo de fermentación.

40 **Polipéptido maduro:** El término "polipéptido maduro" significa un polipéptido en su forma final después de la traducción y cualesquiera modificaciones postraduccionales, tales como el procesamiento aminoterminal, truncamiento carboxiterminal, glucosilación, fosforilación, etc.

45 **Secuencia codificante de polipéptido maduro:** El término "secuencia codificante de polipéptido maduro" significa un polinucleótido que codifica un polipéptido maduro que tiene actividad de enzima lipolítica.

**Identidad de secuencia:** La vinculación entre dos secuencias de aminoácidos se describe por el parámetro "identidad de secuencia". A efectos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferentemente la versión 5.0.0 o posteriores. Los parámetros usados son una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62). El resultado de Needle denominado "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como porcentaje de identidad y se calcula como se indica a continuación:

$$(Residuos idénticos \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de huecos en el alineamiento}).$$

Un polipéptido que tiene actividad de enzima lipolítica de acuerdo con la invención puede comprender una alteración, es decir, una sustitución, inserción y/o deleción, en una o más posiciones (p. ej., varias) posiciones. Una sustitución significa el remplazo del aminoácido que ocupa una posición por un aminoácido diferente; una deleción significa la eliminación del aminoácido que ocupa una posición; y una inserción significa la adición de un aminoácido adyacente a y justo después del aminoácido que ocupa una posición.

A efectos de la presente invención, la identidad de secuencia entre dos secuencias de desoxirribonucleótidos se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, mencionado anteriormente) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, mencionado anteriormente), preferentemente la versión 5.0.0 o posteriores. Los parámetros usados son una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EDNAFULL (versión EMBOSS de NCBI NUC4.4). El resultado de Needle denominado "identidad más larga" (obtenido usando la opción -nobrief) se usa como porcentaje de identidad y se calcula como se indica a continuación:

$$(\text{Desoxirribonucleótidos idénticos} \times 100) / (\text{Longitud del alineamiento} - \text{Número total de huecos en el alineamiento}).$$

**Propiedad mejorada:** Cuando se incorpora en la masa en cantidades eficaces, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención puede mejorar una o más propiedades de la masa o del producto horneado obtenido a partir de esta.

El término "propiedad mejorada" se define en el presente documento como cualquier propiedad de una masa y/o un producto obtenido a partir de la masa, particularmente un producto horneado, que se mejora por acción de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención con relación a la masa o el producto obtenido a partir de la masa en que no se incorpora la enzima lipolítica de acuerdo con la invención.

La propiedad mejorada puede incluir, pero no se limita a, blancura mejorada de la miga del producto horneado, estructura de miga mejorada del producto horneado, esponjosidad de miga mejorada del producto horneado, sabor mejorado del producto horneado y/o propiedades antienviejecimiento del producto horneado.

La propiedad mejorada se puede determinar mediante la comparación de masas y/o productos horneados preparados con y sin adición de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención.

Las cualidades organolépticas se pueden evaluar usando procedimientos bien consolidados en la industria de la panadería y pueden incluir, por ejemplo, el uso de un grupo de degustadores.

**Estructura de miga mejorada del producto horneado:** El término "estructura de miga mejorada del producto horneado" se define en el presente documento como un producto horneado con una miga más fina. La finura de miga mejorada se asocia con alveolos más pequeños y/o paredes de alveolo más delgadas en la miga y/o una distribución más uniforme/homogénea de alveolos en la miga, y suele ser evaluada visualmente por el grupo de panaderos/degustadores, o mediante el análisis de imágenes digitales tal como se sabe en la técnica (p. ej., C-cell, Calibre Control International Ltd, Warrington, Reino Unido, tal como se muestra en los Ejemplos 2-3 de la presente invención).

**Blancura mejorada de la miga:** La finura de miga se suele evaluar midiendo la blancura de la miga de pan, porque una estructura de miga más fina refleja la luz de una manera que hace que la miga se vea más blanca. La blancura de la miga se puede medir tal como se sabe en la técnica, p. ej., usando el valor L de HunterLab medido con un escáner de color.

**Esponjosidad de miga mejorada del producto horneado:** El término "esponjosidad de miga mejorada del producto horneado" es lo opuesto a "firmeza" y se define en el presente documento como la propiedad de un producto horneado que se comprime más fácilmente y es evaluada empíricamente por el grupo de panaderos/degustadores o se mide mediante el uso de un analizador de la textura (p. ej., TAXT2 o TA-XT Plus de Stable Micro Systems Ltd, Surrey, Reino Unido) tal como se sabe en la técnica.

**Sabor mejorado del producto horneado:** El término "sabor mejorado del producto horneado" es evaluado por un grupo de prueba con la formación adecuada y/o análisis químico (p. ej., análisis de GC-MS de espacio de cabeza). El sabor mejorado del producto horneado comprende la reducción de sabor(es) desagradable(s) del producto horneado.

5 **Antienvejecimiento mejorado del producto horneado:** El término "antienvejecimiento mejorado del producto horneado" se define en el presente documento como las propiedades de un producto horneado que tienen una velocidad reducida de deterioro de parámetros de calidad, p. ej., esponjosidad y/o elasticidad, durante su almacenamiento.

10 **Volumen del producto horneado:** El término "volumen del producto horneado" se mide como el volumen de una barra de pan dada. Puede determinarse el volumen mediante el método de desplazamiento de semillas de colza.

**Sabor desagradable:** El término si un producto horneado tiene o no sabor desagradable es evaluado por un grupo de prueba con la formación adecuada/análisis químico tal como se sabe en la técnica.

### Enzimas lipolíticas de acuerdo con la invención

15 Las enzimas lipolíticas que son adecuadas para su uso en la presente invención incluyen un polipéptido que tiene actividad de enzima lipolítica, seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75 % respecto a los aminoácidos 21 a 309 de SEQ ID NO: 1; y

(b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75 % respecto a la secuencia codificante del polipéptido de SEQ ID NO: 2.

20 A efectos de la presente invención, el polipéptido maduro divulgado en SEQ ID NO: 1 se usa para determinar el residuo aminoacídico correspondiente en otra enzima lipolítica.

25 La secuencia de aminoácidos de otra enzima lipolítica se alinea con el polipéptido maduro divulgado en SEQ ID NO: 1 y, basándose en el alineamiento, el número de la posición aminoacídica correspondiente a cualquier residuo aminoacídico en el polipéptido maduro divulgado en SEQ ID NO: 1 se determina usando el algoritmo de Needleman-Wunsch (Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443-453) según se implementa en el programa Needle del paquete EMBOSS (EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, Trends Genet. 16: 276-277), preferentemente la versión 5.0.0 o posteriores. Los parámetros usados son una penalización por apertura de hueco de 10, una penalización por extensión de hueco de 0,5 y la matriz de sustitución EBLOSUM62 (versión EMBOSS de BLOSUM62).

30 En una realización, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % respecto a los aminoácidos 21 a 309 de SEQ ID NO: 1.

35 En una realización, la enzima lipolítica de acuerdo con la invención comprende una tríada catalítica de la secuencia de aminoácidos G-H-S-L-G.

Una enzima lipolítica de la presente invención comprende o consiste preferentemente en los aminoácidos 21 a 309 de SEQ ID NO: 1.

40 También se divulga un polipéptido aislado que tiene actividad de enzima lipolítica codificado por un polinucleótido que se hibrida en condiciones de rigurosidad muy baja, condiciones de rigurosidad baja, condiciones de rigurosidad media, condiciones de rigurosidad media-alta, condiciones de rigurosidad alta o condiciones de rigurosidad muy alta con la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, (Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2.<sup>a</sup> edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

45 El polinucleótido de SEQ ID NO: 2 o una subsecuencia de este, así como el polipéptido de SEQ ID NO: 1 o un fragmento de este, se pueden usar para diseñar sondas de ácido nucleico con el fin de identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos que tienen actividad de enzima lipolítica a partir de cepas de diferentes géneros o especies de acuerdo con métodos muy conocidos en la técnica. En particular, dichas sondas se pueden usar para la hibridación con el ADN genómico o ADNc de una célula de interés, siguiendo procedimientos estándar de transferencia de Southern, con el fin de identificar y aislar el gen correspondiente en este. Dichas sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia completa, pero deben tener una longitud de al menos 15, p. ej., al menos 25, al menos 35 o al menos 70 nucleótidos. Preferentemente, la sonda de ácido nucleico tiene una longitud de al menos 100 nucleótidos, p. ej., una longitud de al menos 200 nucleótidos, al menos 300 nucleótidos, al menos 400 nucleótidos, al menos 500 nucleótidos, al menos 600 nucleótidos, al menos 700 nucleótidos, al menos 800

nucleótidos o al menos 900 nucleótidos. Se pueden usar sondas tanto de ADN como de ARN. Las sondas normalmente se marcan para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con  $^{32}\text{P}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{35}\text{S}$ , biotina o avidina). La presente invención abarca dichas sondas.

5 Se puede cribar una genoteca de ADN genómico o ADNc preparada a partir de estas otras cepas para encontrar ADN que se hibride con las sondas descritas anteriormente y codifique un polipéptido con actividad de enzima lipolítica. El ADN genómico u otro ADN de dichas otras cepas se puede separar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o agarosa, o mediante otras técnicas de separación. El ADN de las genotecas o el ADN separado se puede transferir a e inmovilizar sobre nitrocelulosa u otro material portador adecuado. Con el fin de identificar un clon o ADN que se hibride con SEQ ID NO: 2 o una subsecuencia de esta, el material portador se puede usar en una transferencia de Southern.

10 A efectos de la presente invención, la hibridación indica que el polinucleótido se hibrida con una sonda de ácido nucleico marcada correspondiente a (i) SEQ ID NO: 2; (ii) la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2; (iii) la complementaria completa de esta; o (iv) una subsecuencia de esta; en condiciones de rigurosidad de muy baja a muy alta. Las moléculas con las que se hibrida la sonda de ácido nucleico en estas condiciones se pueden detectar usando, por ejemplo, una película de rayos X o cualquier otro medio de detección conocido en la técnica.

15 En otra realización, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que tiene actividad de enzima lipolítica codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia respecto a la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2 de al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o un 100 %.

20 En otra realización, la presente invención se refiere a variantes del polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 que comprenden una sustitución, delección y/o inserción en una o más (por ejemplo, varias) posiciones. En una realización, el número de sustituciones, delecciones y/o inserciones de aminoácidos introducidas en el polipéptido maduro de SEQ ID NO: 1 no es mayor de 20, p. ej., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 o 19. Los cambios de los aminoácidos pueden ser poco relevantes, es decir, sustituciones o inserciones de aminoácidos conservadoras que no afectan significativamente al plegamiento y/o la actividad de la proteína; delecciones pequeñas, normalmente de 1-30 aminoácidos; prolongaciones aminoterminales o carboxiterminales pequeñas, tales como un residuo de metionina aminoterminal; un péptido conector pequeño de hasta 20-25 residuos; o una prolongación pequeña que facilita la purificación al cambiar la carga neta u otra función, tal como un tramo de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

25 Son ejemplos de sustituciones conservadoras las que se producen dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina). En la técnica se conocen sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica y estas se describen, por ejemplo, en H. Neurath y R.L. Hill, 1979, en *The Proteins*, Academic Press, Nueva York. Sustituciones comunes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

30 Como alternativa, los cambios de los aminoácidos son de una naturaleza tal que se alteran las propiedades fisicoquímicas de los polipéptidos. Por ejemplo, los cambios de los aminoácidos pueden mejorar la estabilidad térmica del polipéptido, alterar la especificidad por el sustrato, cambiar el pH óptimo y similares.

35 Los aminoácidos esenciales de un polipéptido se pueden identificar de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica tales como la mutagénesis dirigida a un sitio o la mutagénesis por barrido de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085). En esta última técnica, se introducen mutaciones de una única alanina en cada residuo de la molécula y las moléculas mutadas resultantes se evalúan para determinar su actividad de enzima lipolítica con el fin de identificar los residuos aminoácidos que son cruciales para la actividad de la molécula. Véase también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708.

40 El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica también se puede determinar por análisis físico de la estructura, según se determina mediante técnicas tales como la resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcaje por fotoafinidad, junto con la mutación de aminoácidos del posible sitio de contacto. Véanse, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309: 59-64. La identidad de los aminoácidos esenciales también puede deducirse a partir de un alineamiento con un polipéptido relacionado.

45 Se pueden realizar y evaluar sustituciones, delecciones y/o inserciones de uno o múltiples aminoácidos usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o reordenamiento, seguido de un procedimiento de cribado relevante, tal como los que se divulgan en Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, *Science* 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; el documento de patente WO 95/17413; o el documento de patente WO 95/22625. Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR propensa a errores, presentación en fagos (p. ej., Lowman et al., 1991, Biochemistry 30: 10832-10837; patente de EE. UU. n.º 5.223.409; documento WO 92/06204) y mutagénesis dirigida a una región (Derbyshire et al., 1986, Gene 46: 145; Ner et al., 1988, DNA 7: 127).

- 5 Los métodos de mutagénesis/reordenamiento se pueden combinar con métodos de cribado automáticos y ultrarrápidos para detectar la actividad de polipéptidos mutagenizados, clonados expresados por células hospedadoras (Ness *et al.*, 1999, Nature Biotechnology 17: 893-896). Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar a partir de las células hospedadoras y secuenciar rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten determinar rápidamente la importancia de los  
10 residuos aminoacídicos individuales en un polipéptido.

El polipéptido puede ser un polipéptido híbrido en el que se fusiona una región de un polipéptido en el extremo N o el extremo C con una región de otro polipéptido.

- 15 El polipéptido puede ser un polipéptido de fusión o un polipéptido de fusión escindible en el que otro polipéptido se fusiona en el extremo N o el extremo C del polipéptido de la presente invención. Un polipéptido de fusión se produce fusionando un polinucleótido que codifica otro polipéptido con un polinucleótido de la presente invención. Las técnicas para producir polipéptidos de fusión son conocidas en la técnica, e incluyen el ligamiento de las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén en marco y que la expresión del polipéptido de fusión esté bajo el control del (de los) mismo(s) promotor(es) y terminador. También se pueden construir polipéptidos de fusión usando la tecnología de inteínas en la que los polipéptidos de fusión se crean después de la traducción  
20 (Cooper *et al.*, 1993, EMBO J. 12: 2575-2583; Dawson et al., 1994, Science 266: 776-779).

- Un polipéptido de fusión puede comprender además un sitio de escisión entre los dos polipéptidos. Tras la secreción de la proteína de fusión, el sitio se escinde lo cual hace que se liberen los dos polipéptidos. Los ejemplos de sitios de escisión incluyen, pero no se limitan a, los sitios que se dan a conocer en Martín et al., 2003, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 3: 568-576; Svetina et al., 2000, J. Biotechnol. 76: 245-251; Rasmussen-Wilson et al., 1997, Appl. Environ. Microbiol. 63: 3488-3493; Ward et al., 1995, Biotechnology 13: 498-503; y Contreras et al., 1991, Biotechnology 9: 378-381; Eaton et al., 1986, Biochemistry 25: 505-512; Collins-Racie et al., 1995, Biotechnology 13: 982-987; Carter et al., 1989, Proteins: Structure, Function, and Genetics 6: 240-248; y Stevens, 2003, Drug Discovery World 4: 35-48.  
25

#### Fuentes de polipéptidos que tienen actividad de enzima lipolítica

- 30 Un polipéptido que tiene actividad de enzima lipolítica de la presente invención se puede obtener a partir de microorganismos de cualquier género. A los efectos de la presente invención, el término "obtenido a partir de", tal como se usa en el presente documento en relación con una fuente dada, significará que el polipéptido codificado por un polinucleótido es producido por la fuente o por una cepa en la que se ha insertado el polinucleótido de la fuente. En un aspecto, el polipéptido obtenido a partir de una fuente dada se secreta extracelularmente.

- 35 En un aspecto, el polipéptido se obtiene a partir de *Valsaria*, tal como, pero sin limitarse a, *Valsaria rubricosa*.

El público puede acceder fácilmente a cepas de estas especies en diversas colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).

- 40 El polipéptido se puede identificar y obtener a partir de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza (p. ej., tierra, compost, agua, etc.) o muestras de ADN obtenidas directamente a partir de materiales naturales (p. ej., tierra, compost, agua, etc.) usando las sondas mencionadas anteriormente. Las técnicas para aislar microorganismos y ADN directamente a partir de hábitats naturales son muy conocidas en la técnica. Entonces, un polinucleótido que codifica el polipéptido se puede obtener cribando de manera similar una genoteca de ADN genómico o ADNc de otro microorganismo o una muestra de una mezcla de ADN. Una vez que se ha detectado un polinucleótido que codifica un polipéptido con la(s) sonda(s), el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son conocidas por los expertos en la técnica.  
45

#### Polinucleótidos

- 50 La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido, de la presente invención, tal como se describe en el presente documento.

Las técnicas usadas para aislar o clonar un polinucleótido son conocidas en la técnica e incluyen el aislamiento a partir de ADN genómico o ADNc, o una combinación de estos. La clonación de los polinucleótidos a partir de ADN genómico se puede efectuar, p. ej., usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o el cribado con anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonados con características estructurales

compartidas. Véase, p. ej., Innis *et al.*, 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Se pueden usar otros procedimientos para la amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de la ligasa (LCR), la transcripción activada por ligamiento (LAT) y la amplificación basada en polinucleótidos (NASBA). Los polinucleótidos se pueden clonar a partir de una cepa de *Valsaria*, p. ej., *Valsaria rubricosa*, o un organismo relacionado.

Puede ser necesaria la modificación de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención para sintetizar polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido. El término "sustancialmente similar" al polipéptido se refiere a formas naturales del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir en cierto modo modificado del polipéptido aislado a partir de su fuente nativa, p. ej., variantes que difieren en la actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo o similares. Las variantes se pueden construir basándose en el polinucleótido presentado como la secuencia codificante de polipéptido maduro de SEQ ID NO: 2, p. ej., una subsecuencia de esta, y/o mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que no provocan un cambio en la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pero que corresponden al uso de codones del organismo hospedador destinado a producir la enzima, o mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente. Para una descripción general de una sustitución de nucleótidos, véase, p. ej., Ford *et al.*, 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

### Construcciones de ácido nucleico

La presente invención también se refiere a construcciones de ácido nucleico que comprenden un polinucleótido de la presente invención unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula hospedadora adecuada en condiciones compatibles con las secuencias de control.

El polinucleótido se puede manipular de diferentes maneras para hacer posible la expresión del polipéptido. Puede ser deseable o necesaria la manipulación del polinucleótido antes de su inserción en un vector dependiendo del vector de expresión. Las técnicas para modificar polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante son muy conocidas en la técnica.

La secuencia de control puede ser un promotor, un polinucleótido que es reconocido por una célula hospedadora para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención. El promotor contiene secuencias de control de la transcripción que median en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier polinucleótido que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora, incluidos promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir de genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares, ya sean homólogos o heterólogos respecto a la célula hospedadora.

### Vectores de expresión

La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor, y señales de terminación de la transcripción y la traducción. Las diversas secuencias de nucleótidos y de control pueden unirse para producir un vector de expresión recombinante que puede incluir uno o más sitios de restricción convenientes a fin de permitir la inserción o la sustitución del polinucleótido que codifica el polipéptido en dichos sitios. Como alternativa, el polinucleótido se puede expresar insertando el polinucleótido o una construcción de ácido nucleico que comprende el polinucleótido en un vector apropiado para la expresión. Al crear el vector de expresión, la secuencia codificante se sitúa en el vector, de modo que la secuencia codificante esté unida operativamente con las secuencias de control apropiadas para la expresión.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (p. ej., un plásmido o virus) que pueda someterse convenientemente a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión del polinucleótido. La elección del vector dependerá normalmente de la compatibilidad del vector con la célula hospedadora en la que se ha de introducir el vector. El vector puede ser un plásmido lineal o circular cerrado.

El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, p. ej., un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. El vector puede contener cualquier medio para garantizar la autorreplicación. Como alternativa, el vector puede ser uno que, cuando se introduce en la célula hospedadora, se integra en el genoma y se replica junto con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado. Además, se puede usar un único vector o plásmido o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que se va a introducir en el genoma de la célula hospedadora, o un transposón.

El vector contiene preferentemente uno o más marcadores de selección que permiten una selección sencilla de las células transformadas, transfectadas, transducidas o similares. Un marcador de selección es un gen cuyo producto proporciona resistencia a virus o biocidas, resistencia a metales pesados, prototrofia a los auxótrofos y propiedades similares.

**Células hospedadoras**

- La presente invención también se refiere a células hospedadoras recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción de un polipéptido de la presente invención. Una construcción o vector que comprende un polinucleótido se introduce en una célula hospedadora de modo que la construcción o vector se mantenga como un integrante cromosómico o como un vector extracromosómico autorreplicante tal como se ha descrito anteriormente. El término "célula hospedadora" abarca cualquier descendencia de una célula progenitora que no es idéntica a la célula progenitora debido a mutaciones que se producen durante la replicación. La elección de una célula hospedadora dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.
- La célula hospedadora puede ser cualquier célula útil en la producción recombinante de un polipéptido de la presente invención, p. ej., una procarionta o una eucariota.
- La célula hospedadora procarionta puede ser cualquier bacteria grampositiva o gramnegativa. Las bacterias grampositivas incluyen, pero no se limitan a, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Geobacillus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Oceanobacillus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Streptomyces*. Las bacterias gramnegativas incluyen, pero no se limitan a, *Campylobacter*, *E. coli*, *Flavobacterium*, *Fusobacterium*, *Helicobacter*, *Ilyobacter*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Salmonella* y *Ureaplasma*.
- La célula hospedadora bacteriana puede ser cualquier célula de *Bacillus* que incluye, pero no se limita a, células de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*.
- La célula hospedadora bacteriana también puede ser cualquier célula de *Streptococcus* que incluye, pero no se limita a, células de *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus uberis* y *Streptococcus equi* subespecie *Zooepidemicus*.
- La célula hospedadora bacteriana puede ser cualquier célula de *Streptomyces* que incluye, pero no se limita a, células de *Streptomyces achromogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces coelicolor*, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces lividans*.
- La célula hospedadora también puede ser una eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta o fúngica.
- La célula hospedadora puede ser una célula fúngica. "Hongos", tal como se usa en el presente documento, incluye los filos de ascomicetos, basidiomicetos, quitridiomicetos y zigomicetos, así como los oomicetos y todos los hongos mitospóricos (como se definen en Hawksworth et al., en Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8.<sup>a</sup> edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido).
- La célula hospedadora fúngica puede ser una célula de levadura. "Levadura", tal como se usa en el presente documento, incluye levaduras ascospóricas (endomicetales), levaduras basidiosporógenas y levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos (blastomicetos). Dado que la clasificación de las levaduras puede cambiar en el futuro, a efectos de esta invención, la levadura se definirá tal como se describe en Biology and Activities of Yeast (Skinner, Passmore y Davenport, editores, Soc. App. Bacteriol. Symposium Series N.º 9, 1980).
- La célula hospedadora de levadura puede ser una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*, tal como una célula de *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, *Saccharomyces oviformis* o *Yarrowia lipolytica*.
- La célula hospedadora fúngica puede ser una célula fúngica filamentosa. Los "hongos filamentosos" incluyen todas las formas filamentosas de la subdivisión de los eumicetos y oomicetos (tal como se definen en Hawksworth et al., 1995, mencionado anteriormente). Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta de quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos. El crecimiento vegetativo tiene lugar mediante la elongación de la hifa y el catabolismo del carbono es estrictamente aerobio. Por el contrario, el crecimiento vegetativo en levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* tiene lugar mediante gemación de un talo unicelular y el catabolismo del carbono puede ser fermentativo.
- La célula hospedadora fúngica filamentosa puede ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis*, *Chrysosporium*, *Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filibasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

Por ejemplo, la célula hospedadora fúngica filamentosa puede ser una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Chrysosporium inops*,  
 5 *Chrysosporium keratinophilum*, *Chrysosporium lucknowense*, *Chrysosporium merdarium*, *Chrysosporium pannicola*, *Chrysosporium queenslandicum*, *Chrysosporium tropicum*, *Chrysosporium zonatum*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*,  
 10 *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*; en particular una célula de *Aspergillus oryzae*.

15 Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica la formación de protoplastos, la transformación de los protoplastos y la regeneración de la pared celular de una manera en sí conocida. Se describen procedimientos adecuados para la transformación de células hospedadoras de *Aspergillus* y *Trichoderma* en el documento de patente EP 238023, Yelton *et al.*, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 1470-1474 y Christensen *et al.*, 1988, BioTechnology 6: 1419-1422. Se describen métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* en  
 20 Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156 y el documento de patente WO 96/00787. Las levaduras se pueden transformar usando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, en Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, Volumen 194, págs. 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *et al.*, 1983, J. Bacteriol. 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 1920.

## 25 **Métodos de producción**

La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula, que en su forma natural produce el polipéptido, en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y, opcionalmente, (b) recuperar el polipéptido.

30 La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula hospedadora recombinante de la presente invención en condiciones propicias para la producción del polipéptido; y, opcionalmente, (b) recuperar el polipéptido.

Las células hospedadoras se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción del polipéptido usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden cultivar mediante cultivo en un matraz agitado, o fermentación a pequeña escala o gran escala (que incluye las fermentaciones continua, discontinua, semicontinua  
 35 o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales en un medio adecuado y en condiciones que permiten que el polipéptido se exprese y/o se aísle. El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de carbono y nitrógeno y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Se pueden adquirir medios adecuados de proveedores comerciales o se pueden preparar de acuerdo con composiciones publicadas (p. ej., en los catálogos de la American Type Culture Collection). Si el polipéptido se secreta al medio nutritivo, el polipéptido puede recuperarse directamente a partir del medio. Si el polipéptido no se secreta, puede recuperarse a partir de lisados celulares.

40 El polipéptido se puede detectar usando métodos conocidos en la técnica que son específicos para enzimas lipolíticas. Estos métodos de detección incluyen, pero no se limitan a, el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático. Por ejemplo, se puede usar un ensayo enzimático para determinar la actividad del polipéptido.

45 El polipéptido se puede recuperar usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar a partir del medio nutritivo mediante procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, recolección, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación. En un aspecto, se recupera un caldo de fermentación que comprende el polipéptido.

50 El polipéptido se puede purificar mediante una diversidad de procedimientos conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (p. ej., de intercambio iónico, afinidad, interacción hidrofóbica, cromatografía de exclusión por tamaño), procedimientos electroforéticos (p. ej., enfoque isoeléctrico preparativo), solubilidad diferencial (p. ej., precipitación con sulfato de amonio), SDS-PAGE o extracción (véase, p. ej., Protein Purification, Janson y Ryden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989) para obtener polipéptidos sustancialmente puros.

55 En un aspecto alternativo, el polipéptido no se recupera, sino que en su lugar se usa una célula hospedadora de la presente invención que expresa el polipéptido como fuente del polipéptido.

**Plantas**

La presente invención también se refiere a plantas aisladas, p. ej., una planta transgénica, parte de una planta o una célula vegetal, que comprende un polinucleótido de la presente invención para expresar y producir así un polipéptido o dominio en cantidades recuperables. El polipéptido o dominio se puede recuperar a partir de la planta o parte de la planta. Como alternativa, la planta o parte de la planta que contiene el polipéptido o dominio se puede usar tal cual para mejorar la calidad de un alimento o pienso, p. ej., mejorando el valor nutritivo, la palatabilidad y las propiedades reológicas, o para destruir un factor antinutritivo.

La planta transgénica puede ser una dicotiledónea (una dicot) o monocotiledónea (una monocot). Son ejemplos de plantas monocotiledóneas las gramíneas, tales como la espiguilla (pasto azul, *Poa*), pasto forrajero tal como *Festuca*, *Lolium*, pasto de zonas templadas, tal como *Agrostis*, y cereales, p. ej., trigo, avena, centeno, cebada, arroz, sorgo y maíz.

La presente invención también se refiere a métodos de producción de un polipéptido o dominio de la presente invención que comprenden (a) cultivar una planta transgénica o una célula vegetal que comprende un polinucleótido que codifica el polipéptido o dominio en condiciones propicias para la producción del polipéptido o dominio; y (b) recuperar el polipéptido o dominio.

**Formulaciones de caldo de fermentación o composiciones celulares**

La presente invención también se refiere a una formulación de caldo de fermentación o una composición celular que comprende un polipéptido de la presente invención. El producto de tipo caldo de fermentación comprende además ingredientes adicionales usados en el proceso de fermentación, tales como, por ejemplo, células (que incluyen, las células hospedadoras que contienen el gen que codifica el polipéptido de la presente invención que se usan para producir el polipéptido de interés), desechos celulares, biomasa, medios de fermentación y/o productos de fermentación. En algunas realizaciones, la composición es un caldo entero de células muertas que contiene ácido(s) orgánico(s), células muertas y/o desechos celulares, y medio de cultivo.

El término "caldo de fermentación", tal como se usa en la presente, se refiere a un preparado producido mediante fermentación celular que se somete a una mínima o ninguna recuperación y/o purificación. Por ejemplo, se producen caldos de fermentación cuando se cultivan cultivos microbianos hasta la saturación, incubados en condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas (p. ej., la expresión de enzimas por parte de células hospedadoras) y la secreción al medio de cultivo celular. El caldo de fermentación puede contener contenidos fraccionados o no fraccionados de los materiales de fermentación obtenidos al final de la fermentación. Normalmente, el caldo de fermentación no está fraccionado y comprende el medio de cultivo empleado y los desechos celulares presentes después de que se hayan eliminado las células microbianas (p. ej., células fúngicas filamentosas), p. ej., mediante centrifugación. En algunas realizaciones, el caldo de fermentación contiene medio de cultivo celular empleado, enzimas extracelulares y células microbianas viables y/o no viables.

En una realización, la formulación de caldo de fermentación y las composiciones celulares comprenden un primer componente de tipo ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 1-5 carbonos y/o una sal de este, y un segundo componente de tipo ácido orgánico que comprende al menos un ácido orgánico de 6 o más carbonos y/o una sal de este. En una realización específica, el primer componente de tipo ácido orgánico es el ácido acético, ácido fórmico, ácido propiónico, una sal de estos, o una mezcla de dos o más de los anteriores, y el segundo componente de tipo ácido orgánico es el ácido benzoico, ácido ciclohexanocarboxílico, ácido 4-metilvalérico, ácido fenilacético, una sal de estos, o una mezcla de dos o más de los anteriores.

En un aspecto, la composición contiene uno o más ácidos orgánicos y opcionalmente contiene además células muertas y/o desechos celulares. En una realización, las células muertas y/o desechos celulares se eliminan de un caldo entero de células muertas para proporcionar una composición que esté libre de estos componentes.

Las formulaciones de caldo de fermentación o composiciones celulares pueden comprender además un agente conservante y/o antimicrobiano (p. ej., bacteriostático), que incluye, pero no se limita a, sorbitol, cloruro de sodio, sorbato de potasio y otros conocidos en la técnica.

El caldo entero de células muertas o la composición puede contener los contenidos no fraccionados de los materiales de fermentación obtenidos al final de la fermentación. Normalmente, el caldo entero de células muertas o la composición contiene el medio de cultivo empleado y los desechos celulares presentes después de que las células microbianas (p. ej., células fúngicas filamentosas) se hayan cultivado hasta la saturación, incubadas en condiciones limitantes de carbono para permitir la síntesis de proteínas. En algunas realizaciones, el caldo entero de células muertas o la composición contiene el medio de cultivo celular empleado, enzimas extracelulares y células fúngicas filamentosas muertas. En algunas realizaciones, las células microbianas presentes en el caldo entero de células muertas o la composición se pueden permeabilizar y/o lisar usando métodos conocidos en la técnica.

Un caldo entero o composición celular, como los que se describen en la presente, normalmente es un líquido, pero puede contener componentes insolubles, tales como células muertas, desechos celulares, componentes de los medios de cultivo y/o una o más enzimas insolubles. En algunas realizaciones, se pueden eliminar los componentes insolubles para proporcionar una composición líquida clarificada.

- 5 Las formulaciones de caldo entero y las composiciones celulares de la presente invención se pueden producir mediante un método descrito en los documentos de patente WO 90/15861 o WO 2010/096673.

### Composiciones que comprenden una enzima lipolítica de acuerdo con la invención

La presente invención se refiere a composiciones que comprenden una enzima lipolítica de acuerdo con la invención.

- 10 La composición puede comprender además una o más enzimas adicionales, en particular una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en aminopeptidasa, amilasa, alfa-amilasa, alfa-amilasa maltogénica, beta-amilasa, carboxipeptidasa, catalasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, galactanasa, glucanasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, mananasa, manosidasa, oxidasa, enzimas pectinolíticas, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fosfolipasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa y xilanasa; especialmente una alfa-amilasa maltogénica.

- 15 Las composiciones se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica y pueden tener cualquier aspecto físico tal como líquido, pasta o sólido. Por ejemplo, la composición se puede formular usando métodos conocidos en la técnica de formulación de enzimas y/o productos farmacéuticos, p. ej., en forma de gránulos o microgránulos recubiertos o no recubiertos.

- 20 La enzima lipolítica de acuerdo con la invención y opcionalmente cualesquiera enzimas adicionales que se vayan a incluir en la composición se pueden estabilizar de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, p. ej., estabilizando el polipéptido en la composición mediante la adición de un antioxidante o agente reductor para limitar la oxidación del polipéptido, o se puede estabilizar añadiendo polímeros tales como PVP, PVA, PEG u otros polímeros adecuados que se sabe que son beneficios para la estabilidad de polipéptidos en composiciones sólidas o líquidas.

25 Cuando se formula la enzima lipolítica de acuerdo con la invención como un granulado o un polvo aglomerado, las partículas normalmente tienen una distribución granulométrica con más del 95 % (en peso) de las partículas en el intervalo de 25 a 500 micrómetros.

- 30 Se pueden preparar granulados y polvos aglomerados mediante métodos convencionales, p. ej., pulverizando la enzima lipolítica sobre un portador en un granulador de lecho fluido. El portador puede estar constituido por núcleos particulados con un tamaño de partícula adecuado. El portador puede ser soluble o insoluble, p. ej., una sal (tal como NaCl o sulfato de sodio), un azúcar (tal como sacarosa o lactosa), un alcohol de azúcar (tal como sorbitol), almidón, arroz, sémolas de maíz o soja. La composición está preferentemente en forma de un polvo seco o un granulado, en particular un granulado no pulverulento.

- 35 Por ende, la invención también proporciona un granulado o un líquido estabilizado que comprende una enzima lipolítica de acuerdo con la invención.

### Enzimas adicionales

- 40 Opcionalmente, se pueden usar una o más enzimas adicionales tales como aminopeptidasa, amilasa, alfa-amilasa, alfa-amilasa maltogénica, beta-amilasa, carboxipeptidasa, catalasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, galactanasa, glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa, glucanasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, mananasa, manosidasa, oxidasa, enzimas pectinolíticas, peptidoglutaminasa, peroxidasa, fosfolipasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa y/o xilanasa junto con la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención.

- 45 La glucoamilasa para su uso en la presente invención incluye glucoamilasas que tienen una identidad de secuencia de al menos un 50 %, al menos un 60 %, al menos un 65 %, al menos un 70 %, al menos un 75 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % respecto a la secuencia de aminoácidos de la glucoamilasa G1 o G2 de *A. niger* (Boel et al. (1984), EMBO J. 3 (5), págs. 1097-1102), la glucoamilasa de *A. awamori* que se divulga en el documento de patente WO 84/02921 o la glucoamilasa de *A. oryzae* (Agric. Biol. Chem. (1991), 55 (4), págs. 941-949).

- 50 La amilasa puede ser fúngica o bacteriana, p. ej., una alfa-amilasa maltogénica de *B. stearothermophilus* o una alfa-amilasa de *Bacillus*, p. ej., *B. licheniformis* o *B. amyloliquefaciens*, una beta-amilasa, p. ej., de una planta (p. ej., soja) o de fuentes microbianas (p. ej., *Bacillus*) o una alfa-amilasa fúngica, p. ej., de *A. oryzae*.

La alfa-amilasa maltogénica también puede ser una alfa-amilasa maltogénica como las que se divulgan en, p. ej., los documentos de patente WO1999/043794; WO2006/032281; o WO2008/148845.

5 Las alfa-amilasas maltogénicas comerciales adecuadas incluyen NOVAMYL, OPTICAKE 50 BG y OPTICAKE 3D (disponibles de Novozymes A/S). Las composiciones de alfa-amilasa fúngica comerciales adecuadas incluyen, p. ej., BAKEZYME P 300 (disponible de DSM) y FUNGAMYL 2500 SG, FUNGAMYL 4000 BG, FUNGAMYL 800 L, FUNGAMYL ULTRA BG y FUNGAMYL ULTRA SG (disponibles de Novozymes A/S).

Una amilasa antienviejamiento también puede ser una amilasa (glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60)) de, p. ej., *Pseudomonas*, tal como cualquiera de las amilasas que se divulgan en los documentos de patente WO1999/050399, WO2004/111217 o WO2005/003339.

10 La glucosa oxidasa puede ser una glucosa oxidasa fúngica, en particular una glucosa oxidasa de *Aspergillus niger* (tal como GLUZYME™, disponible de Novozymes A/S).

15 La hemicelulasa puede ser una pentosanasa, p. ej., una xilanasa que puede ser de origen microbiano, p. ej., derivada de una bacteria u hongo, tal como una cepa de *Aspergillus*, en particular de *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. awamori* o *A. tubigensis*, de una cepa de *Trichoderma*, p. ej., *T. reesei*, o de una cepa de *Humicola*, p. ej., *H. insolens*.

Los preparados de xilanasa comercializados adecuados para su uso en la presente invención incluyen PANZEA BG, PENTOPAN MONO BG y PENTOPAN 500 BG (disponibles de Novozymes A/S), GRINDAMYL POWERBAKE (disponible de DuPont) y BAKEZYME BXP 5000 y BAKEZYME BXP 5001 (disponibles de DSM).

La proteasa puede ser de *Bacillus*, p. ej., *B. amyloliquefaciens* o de *Thermus aquaticus*.

## 20 Masa

En un aspecto, la invención divulga un método de preparación de una masa o un producto horneado preparado a partir de la masa, método que comprende incorporar en la masa una enzima lipolítica de acuerdo con la invención.

En otro aspecto, la invención proporciona masa que comprende harina, agua y una cantidad eficaz de una composición para hornear o una premezcla que comprende la enzima lipolítica de acuerdo con la invención.

25 La presente invención también se refiere a métodos de preparación de una masa o un producto horneado que comprenden incorporar en la masa una cantidad eficaz de una composición para hornear de la presente invención que mejora una o más propiedades de la masa o el producto horneado obtenido a partir de la masa con respecto a una masa o un producto horneado en el que no se incorpora la enzima lipolítica.

30 La frase "incorporar en la masa" se define en el presente documento como la adición de la composición para hornear de acuerdo con la invención a la masa, a cualquier ingrediente a partir del cual se va a preparar la masa y/o a cualquier mezcla de ingredientes de la masa a partir de los cuales se va a preparar la masa. Dicho de otro modo, la composición para hornear de la invención se puede añadir en cualquier etapa de la preparación de la masa y se puede añadir en una, dos o más etapas. La composición se añade a los ingredientes de la masa que se pueden amasar y hornear para preparar el producto horneado usando métodos bien conocidos en la técnica.

35 El término "cantidad eficaz" se define en el presente documento como una cantidad de composición para hornear de acuerdo con la invención que es suficiente para proporcionar un efecto mensurable sobre al menos una propiedad de interés de la masa y/o producto horneado.

40 El término "masa" se define en el presente documento como una mezcla de harina y otros ingredientes suficientemente firme para amasar o enrollar. En el contexto de la presente invención, las mezclas batidas están abarcadas en el término "masa".

La masa de la invención puede comprender harina derivada de cualquier grano de cereal u otras fuentes, que incluyen trigo, trigo duro, espelta, escanda menor, cebada, centeno, avena, maíz, sorgo, arroz, mijo, amaranto, quinoa y mandioca.

45 La masa también puede comprender otros ingredientes de masa convencionales, p. ej., proteínas, tales como leche en polvo, gluten y soja; huevos (ya sean huevos enteros, yemas de huevo o claras de huevo); un oxidante tal como ácido ascórbico, bromato de potasio, yodato de potasio, azodicarbonamida (ADA) o persulfato de amonio; un aminoácido tal como L-cisteína; un azúcar; una sal tal como cloruro de sodio, acetato de calcio, sulfato de sodio o sulfato de calcio, y/o un emulsionante.

La masa puede comprender grasa (triglicéridos) tal como grasa granulada o manteca.

50 La masa de la invención puede ser fresca, estar congelada o parcialmente horneada (prehorneada).

La masa de la invención es normalmente masa leudada o masa que se va a someter a leudado.

La masa se puede leudar de varias maneras, tales como añadiendo agentes leudantes químicos, p. ej., levadura química, bicarbonato de sodio, o añadiendo un fermento (masa de fermentación), pero se prefiere leudar la masa añadiendo un cultivo de levadura adecuado, tal como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadería), p. ej., una cepa disponible de *S. cerevisiae*.

La enzima lipolítica de acuerdo con la invención puede no cambiar el volumen de producto horneado, en particular el volumen del pan, significativamente; normalmente el volumen se puede incrementar o disminuir un 0-5 %.

La cantidad de enzima lipolítica de acuerdo con la invención puede ser de entre 0,01-100 mg de proteína enzimática por kg de harina en la masa, en particular 0,05-50 mg de proteína enzimática por kg de harina, en particular 0,1-25 mg de proteína enzimática por kg de harina, en particular 0,1-15 mg de proteína enzimática por kg de harina en la masa.

### Emulsionantes

Para algunas aplicaciones, no se necesita un emulsionante; para algunas aplicaciones se puede necesitar un emulsionante.

Un emulsionante adecuado para su uso en la presente invención es preferentemente un emulsionante seleccionado del grupo constituido por ésteres diacetiltartáricos de monoglicéridos (DATEM), estearoilactilato de sodio (SSL), estearoilactilato de calcio (CSL), mono- y diglicéridos etoxilados (EMG), monoglicéridos destilados (DMG), polisorbatos (PS) y monoglicéridos succinilados (SMG).

En algunas aplicaciones, la enzima lipolítica de acuerdo con la presente invención reemplaza todo el(los) emulsionante(s) que suelen estar presentes en la receta de la masa.

### Mejoradores de pan y mezclas o premezclas de pastelería

La enzima lipolítica de la presente invención puede formar parte ventajosamente de un mejorador de pan, o una mezcla o premezcla de pastelería.

Normalmente se añaden a la masa "mejoradores de pan" (a los que se hace referencia también como "acondicionadores de masa" o "mejoradores masa" o "agentes mejoradores" o "agentes de tratamiento de harina") con el fin de mejorar la textura, estructura, volumen, sabor o frescura del producto horneado, así como para mejorar la trabajabilidad y estabilidad de la masa.

Normalmente, un mejorador de pan comprende o consiste en: una o más enzimas (tales como, p. ej., amilasas (alfa-amilasas, beta-amilasas, glucoamilasas, amilasas que degradan almidón crudo), xilanasas (hemicelulasas), celulasas, pectinasas, proteasas, pectato liasas, oxidasas (peroxidasas, glucosa oxidasa, piranosa oxidasas, hexosa oxidasas, L-aminoácido oxidasas, carbohidrato oxidasas, sulfurhidrido oxidasas), lipoxigenasas, deshidrogenasas, lacasas, transglutaminasas, aciltransferasas, disulfuro de proteína isomerasas), uno o más agentes oxidantes o reductores (tales como, p. ej., ácido ascórbico, glutatona, cisteína), uno o más emulsionantes (tales como, p. ej., ésteres diacetiltartáricos de monoglicéridos (DATEM), estearoilactilato de sodio (SSL), estearoilactilato de calcio (CSL), monoestearato de glicerol (GMS), ramnolípidos, lecitinas, sucroésteres, sales biliares), uno o más materiales lipídicos (tales como, p. ej., manteca, aceite, grasa alimentaria), uno o más azúcares, una o más harinas o fracciones de harina, una o más vitaminas (tales como, p. ej., ácido pantoténico y vitamina E), una o más gomas, y/o una o más fuentes de fibra (tales como, p. ej., fibra de avena).

Las mezclas de torta (pastelería) normalmente comprenden todos los ingredientes de una receta de tarta con la excepción de agua, grasa (aceite, mantequilla, margarina) y huevos. Se pueden añadir huevos en una mezcla de tarta (pastelería) en forma de polvo. Las premezclas de tarta (pastelería) son normalmente mezclas de tarta donde se ha eliminado toda o parte de la harina y el azúcar.

### Producto horneado

El proceso de la invención se puede usar para cualquier tipo de producto horneado preparado a partir de masa, en particular de carácter blando, ya sea de tipo blanco, claro u oscuro. Son ejemplo de pan (en particular pan blanco, integral o de centeno), normalmente en forma de hogazas o panecillos, pan, pan de pita, tortillas, tartas, tortitas, panecillos, gofres, galletas, bases de pastel, pan al vapor, pizza y similares.

La presente invención se describe además mediante los siguientes ejemplos que no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención.

**Ejemplos**

**Ejemplo 1**

**Clonación, expresión y fermentación de la enzima lipolítica de acuerdo con la invención**

5 Se extrajo ADN genómico de una cepa de *Valsaria rubricosa*, usando el kit Fast DNA Spin para tierra (n.º de cat. 6560-200 de MP Biochemicals) siguiendo el protocolo del proveedor.

La cepa *Valsaria rubricosa* se aisló a partir de tierra en Hunan, China, en 2002.

Tal como se sabe en la técnica, las SEQ ID NO. 1 y 2 se amplificaron mediante PCR a partir del ADN genómico usando un cebador directo e inverso (SEQ ID NO. 3 y 4).

**SEQ ID NO. 1 (péptido señal: 1-20):**

MKSASILLRVAALLLPAVSALPLERRAISADLLAFSLFEQFAAAAYCPDNNDSPTKLTCSVGNCPIVE  
 ADPTSTVTEFENSLETDVVTGYVATDSTRELI VVAFRGSSSIRNWIADIDFPFTDIDLCDGCGAASGFWTS  
 WTEARTGVLA AVASAAAANFSYTVAVTGHSLGGAVAALAAGALRNAGYTVALYSFGAPRVGDETLSEYIT  
 AQAGGNYRITHLNDFVFKLFPLLLGYRHLISPEYYISSGNVTVTADDVEEYTGFINLSGNTGDLTFDIDA  
 10 HSWYFNEIGACDDGEALEWKKRGVEVQWV

**SEQ ID NO. 2:**

ATGAAGTCCGCTTCGATCTTACTCAGGGTAGCTGCCCTCCTCCTCCCTGCTGTATCTGCACTGCCACTTGAAAGAAG  
 AGGTATGGACGAACCTATCCTAGCGATCAGTGTGTCTATTTTGCCTAACCTAGCAAAGCTATATCCGCGGATCTCCTG  
 GCAACCTTCAGCCTCTTCGAGCAGTTCGCAGCCGACGATATTTGTCGGGATAACAACGACAGTCCCGACACCAAGCT  
 TACTTGCTCTGTCCGAAACTGCCCGCTTGTGCGAAGCTGACACGACCAGCAGCGTCACTGAATTCGAAAAGTACATCT  
 TACACGACCCCGTTACCTACAGACAAAGTCCCAGCTAACGTCACCTCTATCTCTGTCCCTTTAGCTCGCTCGAAA  
 CCGACGTCCTGGCTACGTCGCGACTGACAGCACACGAGAGCTCATCGTTGTTGGCATTCCGCGGGAGTTCCTCGATC  
 CGGAACTGGATCGCCGACATCGACTTTCCTTCACCGACACCGACCTCTCGGATGGCTGCCAGGCAGCTCGGGCTT  
 CTGGACGTCCTGGACGGAGGCACGGACAGGGGTGCTGGCCGCGGTGGCGAGCGCTGCCGCGGCCAACCCTCCTATA  
 CCGTTGCCGCTGACGGGCCACAGCCTCGGCGGGGCCGTGGCCGCGCTGGCCGCTGGCGCCCTCCGGAAACGGGGCTAC  
 ACGGTCGCGCTATACAGCTTCGGAGCGCCTCGGTTGGGTGACGAGACCTCAGCGAGTACATCACTGCCGAGSCGGG  
 TGGAAACTACCGCATCACGCACCTCAACGACCCAGTGCCGAAGCTGCCCCCGCTGCTCCTGGGGTATCGCCACATCA  
 GCCCCGAATACTACATCAGCAGCGGGAACAACSTGACCGTGACGGCGGATGACGTGGAGGAGTACACCGGCACGATC  
 AACCTGAGTGGGAACACGGGCGATCTGACGTTGCGACAGGATGCGCACAGTTGGTACTTCAACGAGATCGGGGCATG  
 CGATGATGGTGAGGCTTTGGAGTGAAGAAGCGGGGGGTAGAAGTTCAGTGGGTTTAA

**SEQ ID NO: 3 (Cebador):**

5' ACACAACCTGGGGATCCACCATGAAGTCCGCTTCGATCTTACTCAGG -3'

15 **SEQ ID NO: 4 (Cebador):**

5' AGATCTCGAGAAGCTTAAACCCACTGAACTTCTACCCCC -3'

20 El producto de PCR se purificó usando un kit de purificación de bandas de gel y ADN para PCR GFX® (GE Healthcare, Hillerød, Dinamarca) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El producto de PCR purificado, correspondiente a SEQ ID NO:2, se clonó en el vector de expresión pDAu109 (documento de patente WO 2005/042735) previamente linealizado con *Bam* HI y *Hind* III, usando un kit de clonación para PCR IN-FUSION™ (BD Biosciences, Palo Alto, CA, EE. UU.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se usó un volumen de 1 µl de la mezcla de ligamiento sin diluir para transformar células quimiocompetentes Multi shot TOP 10, n.º de pieza 44-0091 de Invitrogen. Se seleccionó una colonia en una placa de agar LB que contenía 100 µg de ampicilina por ml y se cultivó durante la noche en 2 ml de medio LB suplementado con 100 µg de

ampicilina por ml. Se purificó ADN plasmídico usando un kit Jetquick Plasmid Miniprep Spin (Genomed GmbH, Lohne, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuencia SEQ ID NO:2 se verificó mediante la secuenciación de Sanger antes de la expresión heteróloga. Se seleccionó un plásmido (que contenía el gen de SEQ ID NO: 2) para la expresión heteróloga en células hospedadoras de *Aspergillus oryzae*.

- 5 La célula hospedadora de *A. oryzae* es un gen *amdS* (acetamidasa) desactivado derivado de JaL355 de *Aspergillus oryzae* (documento de patente WO 2002/40694) en el que se restauró la auxotrofia de *pyrG* desactivando el gen de la acetamidasa (*amdS*) de *A. oryzae* con el gen *pyrG*. Se prepararon protoplastos de *Aspergillus oryzae* de acuerdo con el documento de patente WO 95/002043.

- 10 Se mezclaron cien µl de protoplastos de *Aspergillus oryzae* con 1-2 µg del vector de expresión de *Aspergillus* con el gen de SEQ ID: 2 clonado, y se mezclaron cuidadosamente 250 µl de PEG 4000 al 60 % (Applichem, Darmstadt, Alemania) (polietilenglicol, peso molecular de 4000), CaCl<sub>2</sub> 10 mM y Tris-HCl 10 mM pH 7,5. Después de 30 min de incubación a 37 °C, se añadieron 4 ml de agar blando (temp. 40 °C) y los protoplastos se dispersaron sobre placas COVE para su selección. Tras la incubación durante 4-7 días a 37 °C, se inocularon esporas de cuatro transformantes en 0,5 ml de medio DAP-4C-01 en placas de 96 pocillos profundos. Después de 4-5 días de cultivo a 30 °C, los caldos de cultivo se analizaron mediante SDS-PAGE para identificar los transformantes que producían la mayor cantidad de proteína recombinante a partir de *Valsaria rubricosa*.

Las esporas del mejor transformante con el gen de SEQ ID NO:2 se dispensaron sobre placas COVE que contenían TRITON® X-100 al 0,01 % con el fin de aislar colonias individuales. La dispersión se repitió una vez más antes de la conservación de los clones.

20 **Fermentación para la purificación**

Se fermentó un transformante de *Aspergillus oryzae* construido tal como se ha descrito anteriormente en 150 ml de medio DAP-4C-01 en matraces agitadores estriados de 500 ml incubados a 30 °C en un incubador de plataforma oscilante que rotaba a 150 RPM durante 3-5 días y se usaron además para ensayos como los que se describen a continuación.

25 **Medios usados**

Las placas LB estaban compuestas por 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio, 15 g de bacto-agar y agua desionizada hasta un 1 litro.

El medio LB estaba compuesto por 10 g de bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de cloruro de sodio y agua desionizada hasta 1 litro.

30 **DAP-4C-1**

11 g de MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O

1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

2 g de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>.H<sub>2</sub>O

20 g de dextrosa

- 35 10 g de maltosa

5,2 g de K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O

0,5 g de extracto de levadura

0,5 ml de disol. de metal traza KU6 (AMG) (MSA-SUB-FS-0042)

Mezclar hasta que se disuelvan por completo

- 40 Se añade 1 ml de Dowfax 63N10

Ajustar el volumen con agua Milli-Q hasta 1000 ml

Comprimido de CaCO<sub>3</sub> de 0,5 g (añadir 1 comprimido/200 ml)

Antes de la inoculación, a cada matraz agitador de 150 ml se añaden 3,5 ml de hidrogenofosfato de diamonio (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> al 50 % y 5,0 ml de ácido láctico al 20 %.

**Disol. de metal traza KU6 (AMG) (MSA-SUB-FS-0042)**6,8 g de ZnCl<sub>2</sub>2,5 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O

0,13 g de cloruro de níquel anhidro

5 13,9 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O8,45 g de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O3 g de C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O

Agua con iones intercambiados hasta 1000 ml

10 Las placas de sacarosa COVE estaban compuestas por 342 g de sacarosa, 20 g de agar en polvo, 20 ml de solución salina COVE y agua desionizada hasta 1 litro. El medio se esterilizó con un autoclave a 103,4 kPa (15 psi) durante 15 minutos (Bacteriological Analytical Manual, 8.<sup>a</sup> edición, Revisión A, 1998). El medio se enfrió hasta 60 °C y se añadieron acetamida 10 mM, Triton X-100 (50 µl/500 ml).

La solución salina COVE estuvo compuesta por 26 g de MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 26 g de KCl, 26 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 ml de disolución de metal traza COVE y agua desionizada hasta 1 litro.

15 La disolución de metal traza COVE estaba compuesta por 0,04 g de Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 0,4 g de CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 1,2 g de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,7 g de MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,8 g de Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 g de ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y agua desionizada hasta 1 litro.

Características de SEQ ID NO:1:

20 La enzima lipolítica (SEQ ID NO:1) posee una caja de enzima lipolítica típica con tríada catalítica expuesta en el pentapéptido: G-H-S-L-G.

La enzima lipolítica (SEQ ID NO:1) de acuerdo con la invención mostró actividad sobre tributirina, MGDG (monogalactosildiacilglicerol), DGDG (digalactosildiacilglicerol), APE (N-acilfosfatidiletanolamina) y ALPE (N-acilfosfatidiletanolamina), lo cual muestra que la enzima tiene actividad de lipasa (tributirina), actividad de fosfolipasa (APE/ALPE) y actividad de galactolipasa (MGDG/DGDG).

25 Perfil de actividad frente al pH de SEQ ID NO:1:

Se diluyó SEQ ID NO:1 purificada a 0,5, 0,125, 0,031 y 0,0078 mg de proteína enzimática/ml con Triton X-100 al 0,01 %.

30 Se mezclaron 20 µl de las muestras de enzima diluidas con 40 µl de tampón de pH (acetato de sodio 0,1 M, fosfato de sodio 0,1 M, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, ajustado a pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 usando NaOH/HCl) y 40 µl de disolución de sustrato de aceite de oliva (12,5 mg/ml de aceite de oliva, goma arábica al 0,1 %, CaCl<sub>2</sub> 1,5 mM, homogenizados mediante Ultra Turrax) en los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos.

Tras la incubación a 37 °C durante 30 min en un termomezclador Eppendorf, la reacción se detuvo añadiendo 10 µl de reactivo de parada (ácido fosfórico 1 M, Triton X-100 al 10 %) y mezclando.

35 La concentración de ácidos grasos libres liberados a partir del sustrato de aceite de oliva se cuantificó entonces utilizando un kit NEFA (Wako Diagnostics): Se mezclaron 100 µl de reactivo del kit R1 (Wako NEFA-HR (2) R1 SET, 434-91795) con un volumen de reacción de 25 µl y se leyó la absorbancia a 546 nm en un lector de placas SpectraMax Plus. A continuación, se añadieron 50 µl de reactivo del kit R2 (Wako NEFA-HR (2) R2 SET, 436-91995) y después de 20 min de incubación a temperatura ambiente (con agitación), se leyó de nuevo la absorbancia a 546 nm. A partir de la diferencia entre las dos lecturas, se calculó la concentración de ácido graso libre usando resultados con una curva estándar de ácido oleico (ácido oleico 1, 0,5, 0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125 y 0 mM). Se usaron concentraciones de lipasa que daban respuestas dentro del intervalo lineal para calcular la actividad a cada pH. En la Tabla A, se proporcionan actividades relativas a la actividad a pH 4 (pH óptimo).

40

# ES 3 014 686 T3

Tabla A: perfil de actividad frente al pH de SEQ ID NO:1

pH	Actividad de SEQ ID NO:1 relativa a la actividad a pH 4 (%)
2	0,8
3	9,4
4	100
5	60,6
6	4,7
7	0,3
8	0,0
9	0,1

## Ejemplo 2

5 Se prepararon muestras de pan de acuerdo con una receta de masa directa estándar mezclando los siguientes ingredientes (se incrementó la escala de la cantidad de masa para ajustarse al requisito de ensayo de horneado):

Harina de trigo (harina Crousti, Dossche Mills, Deinze, Bélgica)	1000 g
Agua corriente	570 g
Sacarosa	60 g
Levadura	30 g
Aceite de colza	20 g
Sal	19 g
Propionato de calcio	5 g
Ácido ascórbico	40 ppm
Novamyl 10.000BG™ (Novozymes A/S)	40 ppm
Panzea Dual™ (Novozymes A/S)	25 ppm

Se prepararon las siguientes muestras de masa y se prepararon tres muestras de pan a partir de cada masa. Soft'r Silk es un producto DMG comercial de Puratos NV (Groot-Bijgaarden, Bélgica) y se usó como referencia para el efecto de productos DMG comerciales. Soft'r Silk se dosificó en relación con el contenido de harina.

Tabla 1: Dosificación de enzima:

Muestra	Dosificación de enzima lipolítica (mg de PE/kg de harina)
Control	-
Soft'r Silk al 1 %	-
SEQ ID NO: 1	0,4
SEQ ID NO: 1	1,0

5 Se preparó una masa mezclando los ingredientes en una mezcladora espiral (Diosna SP12, Dierks & Söhne, Osnabrück, Alemania) durante 2 min a velocidad baja (17 rpm) y 7 min a velocidad alta (35 rpm). Después del mezclado, la masa se evaluó antes de ajustar la escala (600 g). La masa a escala ajustada se dejó reposar durante otros 15 min antes de laminar la masa. La masa laminada se introdujo en recipientes de acero de 2200 ml abiertos (medidas máximas: 260 mm (L) × 125 mm (W) × 80 mm (H)) y se fermentó durante 90 min a 35 °C, con una humedad relativa del 86 %.

10 Tras fermentar, la masa se horneó en un horno de pisos (Wachtel Piccolo, Wachtel GmbH, Hilden, Alemania) durante 25 min a 230 °C. El horno empleó una ráfaga corta de vapor al principio de la etapa de horneado. El pan horneado se retiró de los recipientes y se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 2 horas. El volumen de las muestras de pan se determinó usando un escáner láser Volscan Profiler 600 (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido). Posteriormente, se envasaron muestras de pan con nitrógeno en bolsas de plástico selladas (PA/PE, 90 µm).

15 Después de dos días de almacenamiento a temperatura ambiente, se cortaron dos rebanadas del medio de cada pan con un rebanador eléctrico (Graef Master M182 Slicer, Graef & Co GmbH, Arnsberg, Alemania). Cada rebanada se midió una vez usando el instrumento C-cell empleando el programa informático C-Cell Image Analysis System, Versión 2.0 (Calibre Control International Ltd, Warrington, Reino Unido).

20 El C-cell usa el registro de imágenes de alta definición y la iluminación controlada de la muestra para garantizar una calidad de imagen óptima. Se analizó la rebanada entera para proporcionar 48 valores de datos y 5 imágenes procesadas que mostraban características particulares de la muestra. La blancura de miga se puede evaluar usando el parámetro "brillo de la rebanada". La medición del brillo es el nivel de gris promedio de todos los píxeles en la rebanada.

Una estructura de miga más fina proporcionará un valor de "brillo de rebanada" más alto.

Tabla 2: Datos de volumen del pan

Muestra	Dosificación de enzima lipolítica (mg de PE/kg de harina)	Volumen del pan (ml/g)
Control	-	5,45
Soft'r Silk al 1 %		5,18
SEQ ID NO:1	0,4	5,64
SEQ ID NO:1	1,0	5,28

25 Tabla 3: Valores de "brillo de la rebanada" para las muestras evaluadas.

Muestra	Dosificación de enzima lipolítica (mg de PE/kg de harina)	Parámetro de C-cell "brillo de la rebanada"
Control	-	144
Soft'r Silk al 1 %		148,6
SEQ ID NO:1	0,4	147,4
SEQ ID NO:1	1,0	149,7

Se puede observar a partir de la Tabla 3 que, usando la enzima lipolítica de acuerdo con la invención, el brillo de la rebanada es mejor que el control, y también mejor que Soft'r Silk al 1 % cuando se usa 1 mg de enzima lipolítica por kg de harina.

30 **Ejemplo 3**

Se prepararon muestras de pan idénticas al Ejemplo 2, salvo que se utilizó harina King Midas Special (Ardent Mills Corp. Denver, CO, EE. UU.) en lugar de harina Crousti, y se añadieron 600 g de agua en lugar de los 570 g de agua añadidos en el Ejemplo 2. Además, este ensayo no incluía un Control, sino solamente la referencia con Soft'r Silk al 1 %.

Tabla 4: Dosificación de enzima

Muestra	Dosificación de enzima lipolítica (mg de PE/kg de harina)
Soft'r Silk al 1 %	-
SEQ ID NO:1	0,4
SEQ ID NO:1	1,0

Tabla 5: Datos de volumen del pan

Muestra	Dosificación de enzima lipolítica (mg de PE/kg de harina)	Volumen del pan (ml/g)
Soft'r Silk al 1 %		5,42
SEQ ID NO:1	0,4	5,27
SEQ ID NO:1	1,0	5,68

5

Tabla 6: Valores de "brillo de la rebanada" para las muestras evaluadas.

Muestra	Dosificación de enzima lipolítica (mg de PE/kg de harina)	Parámetro de C-cell "brillo de la rebanada"
Soft'r Silk al 1 %	-	151,1
SEQ ID NO:1	0,4	152,0
SEQ ID NO:1	1,0	153,6

Se puede observar a partir de la Tabla 6 que, usando la enzima lipolítica de acuerdo con la invención, el brillo de la rebanada es mejor que Soft'r Silk al 1 % (tanto con 0,4 como 1,0 mg de enzima lipolítica por kg de harina).

**Ejemplo 4**

10

Construcción de variantes

Se construyeron SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9 del siguiente modo: Se realizó un alineamiento con SEQ ID NO:1 respecto a las 100 lipasas más homólogas. Basándose en el alineamiento se eligieron varias posiciones, donde SEQ ID NO:1 se desviaba del promedio de las otras lipasas. Una posición dada se mutó a los aminoácidos que se encuentran con mayor frecuencia en las otras lipasas. Se diseñaron cuatro genes sintéticos que codificaban las variantes de lipasa y los genes se expresaron en *Aspergillus oryzae*.

15

**SEQ ID NO: 6** (péptido señal: 1-20, 13 mutaciones en comparación con SEQ ID NO: 1 en la secuencia madura):

MKSASILLRVAALLLPVVSALPLERRAISADLLATFSLFEQFAAAAYCPNNNNSPDTKLTCSQGNCPLEA  
 ATTSTVTEFENSLSTDVTGYVAVDSTRELIVVAFRGSSSIRNWIADIDFPFTDIDLCDGCQAASGFWQS  
 WTEARTGVTAASAAAQNPSTVVTGHSLLGGAVAALAAGALRNQGYTVALYSFGAPRVGNLSEY  
 ITAQAGGNRITHLNDPVPKLPPLLLGYRHISPEYYISSGNNTVTANDVEEYTGTLNSGNTGDLTFD  
 AHSWYFNEIGACDDGEALEWKKRGVEVQWW

**SEQ ID NO: 7** (péptido señal: 1-20, 27 mutaciones en comparación con SEQ ID NO:1 en la secuencia madura):

MKSASILLRVAALLLPAVSALPLERRAISADLLATFSLFEQFAAAAYCPNNNNSPGKLTCSQGNCPLVEA  
ATTNTVTEFENSLSTDVTGYVAVDSTNELIVVSFRGSSSIRNWIADIDFPFTDIDLCDGCQAASGFWQS  
WTEARTTVAAVAQAAAQNPYSYQVVVTGHSLGGAIAALAAGALRNQGYTVDLYSFGAPRVGNETLSEYI  
TNQAGGNYRITHLNDPVPKLPPLLMGYRHISPEYYISSGNNVTVTANDVQEYTGTLNQGNTGDLTFDID  
AHSWYFNEIGACDDGEALEWKKRGVEVQWW

**SEQ ID NO: 8** (péptido señal: 1-20, 41 mutaciones en comparación con SEQ ID NO:1 en la secuencia madura):

MKSASILLRVAALLLPAVSALPLERRAISADLLATFQFFEQYAAAAYCPNNNNSPGKLTCSQGNCPLVQ  
AATTNTVYEFENSLSTDVTGYVAVDSTNKLIVVSFRGSSSIRNWIADIDFPFTDIDLCDGCQAASGFWQS  
WLEARTTVPVAQAQAQNPDYQVVVTGHSLGGAIAALAAGDLRNQGYTVDLYTFGAPRVGNETLSEY  
ITNQAGGNYRITHWNDPVPKLPPLLMGYVHISPEYYISSGNNVTVTANDVQEYTGTLNQGNTGDLTFDI  
DAHSWYFNEIGACDDGEALEWKKRGVEVQWW

5 **SEQ ID NO: 9** (péptido señal: 1-20, 56 mutaciones en comparación con SEQ ID 1 en la secuencia madura):

MKSASILLRVAALLLPAVSALPLERRAISADLLDTFQFFEQYAAAAYCPNNNNSPGKLTCSQGNCPLVQ  
AADTNTVYEFENSLSTDVTGYVAVDHTNKLIVVSFRGSSSIRNWIADIDFPFTDIDLCDGCQAASGFWQ  
SWLEARDTVPVAVYQARAQKPDYQVVVTGHSLGGAIAALAAGDLRNQGYTVDLYTFGAPRVGNSTLSE  
YITNQPGGNYRVTHWNDPVPKLPPLLMGYVHISPEYYISSPNNVTVTANDVQVYEGVINLQGNEDLTT  
DIDAHSWYFNEIGACDDGEALEWKKRGVEVQWW

**Ejemplo 5**

Horneado de tostada americana con varias enzimas lipolíticas

Se preparó pan tal como se describe en el Ejemplo 2.

10 Las enzimas lipolíticas de SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7 se añadieron a la masa en una cantidad de 0,4, 1 y 2 mg de proteína enzimática (PE)/kg de harina. Las enzimas lipolíticas se produjeron tal como se describe en el Ejemplo 4.

Se midieron el volumen del pan y el parámetro de C-cell "brillo de la rebanada".

Se obtuvieron los siguientes resultados -

Tabla 7:

Muestra	Dosificación de enzima lipolítica (mg de PE/kg de harina)	Volumen del pan (ml/g)	Parámetro de C-cell "brillo de la rebanada"
Control		5,08	138,2
Soft'r Silk al 1 %		4,85	149,5
SEQ ID NO:6	0,4	4,24	145,7
SEQ ID NO:6	1	5,09	144,8
SEQ ID NO:6	2	5,11	139,8
SEQ ID NO:7	0,4	5,07	141,0
SEQ ID NO:7	1	5,23	147,5
SEQ ID NO:7	2	5,10	148,3

Se puede observar a partir de la Tabla 7 que usando las enzimas lipolíticas (SEQ ID NO:6 y SEQ ID NO:7) de acuerdo con la invención, el brillo de la rebanada es mayor que el control y SEQ ID NO:7 está casi a la par con Soft'r Silk al 1 %.

**Ejemplo 6**

5 Horneado de tostada americana con varias enzimas lipolíticas

Se preparó pan tal como se describe en el Ejemplo 2.

Las enzimas lipolíticas de SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9 se añadieron a la masa en una cantidad de 0,4, 1 y 2 mg de proteína enzimática (PE)/kg de harina (SEQ ID NO:8) y 0,4 mg de proteína enzimática (PE)/kg de harina (SEQ ID NO:9). Las enzimas lipolíticas se produjeron tal como se describe en el Ejemplo 4.

10 Se midieron el volumen del pan, el valor L de HunterLab y el parámetro C-cell "brillo de la rebanada".

HunterLab es un método espectrofotométrico colorimétrico que usa una fuente de luz para iluminar la muestra, midiendo la cantidad de luz a longitudes de ondas diferentes. La luz reflejada por la muestra pasa por una rejilla que la divide en sus componentes espectrales. El espacio de color de Hunter Lab es un espacio de color rectangular tridimensional, donde en el eje L (luminosidad): 0 es negro y 100 es blanco. El valor numérico se correlaciona con lo que ves.

15

Se usaron 2 rebanadas de cada pan y cada rebanada se midió una vez utilizando el HunterLab.

Se obtuvieron los siguientes resultados -

Tabla 8:

Muestra	Dosificación de enzima lipolítica (mg de PE/kg de harina)	Volumen del pan (ml/g)	Valor L de HunterLab	Parámetro de C-cell "brillo de la rebanada"
Control		5,17	79,6	134,7
Soft'r Silk al 1 %		5,15	82,3	145,8
SEQ ID NO:8	0,4	5,36	80,2	140,6
SEQ ID NO:8	1	5,25	81,3	143,2
SEQ ID NO:8	2	5,24	80,3	140,6
SEQ ID NO:9	0,4	5,38	81,3	141,1

20 Se puede observar a partir de la Tabla 8 que usando las enzimas lipolíticas (SEQ ID NO:8 y SEQ ID NO:9) de acuerdo con la invención, el brillo de la rebanada y los valores L de HunterLab son más altos que el control. En conclusión, tanto SEQ ID NO:8 como SEQ ID NO:9 introdujeron blancura de miga.

**Ejemplo 7**

Galletas sin sabor desagradable

25 Se prepararon galletas usando los ingredientes de la Tabla 9.

Tabla 9: ingredientes de las galletas

Receta (g)	A	B	C
Tegral Patacrout* (Puratos, Bélgica)	400	400	400
Huevos	40	40	40
Manteca	160	160	160
Lipopan 50 (Novozymes A/S)		0,04	
SEQ ID NO:1 (mg de PE)**			0,92
* Contiene harina de trigo, azúcar, gluten de trigo, agente leudante (difosfato disódico)			
** Se añadieron 0,92 mg (proteína enzimática de SEQ ID NO:1) por 400 g de Tegral Patacrout			

Proceso:

5 Los ingredientes se mezclaron en un mezclador Hobart durante 2 min a la velocidad 1. La masa se envasó en una película de plástico y se dejó reposar durante la noche a 25 °C.

Al día siguiente, la masa se extendió entre 2 láminas de papel de horno hasta un grosor de 2 mm. Se recortaron trozos de un diámetro de 6,5 cm.

Los trozos de masa se hornearon en un horno Miwe Condo durante 11 min a 180 °C. No se añadió vapor durante el horneado.

10 Análisis de las galletas:

Se determinaron los volátiles de una muestra usando una técnica de HS-SPME-GC-MS. Se utilizó una fibra de divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) para la extracción de los componentes volátiles.

Las muestras se precalentaron en primer lugar durante 10 min a 80 °C con una velocidad de mezclado de 250 rpm y a continuación la extracción se llevó a cabo durante 30 min a 80 °C a la misma velocidad de mezclado.

15 Los análisis GC/MS se llevaron a cabo con un cromatógrafo de gases 5890A de Agilent equipado con un espectrómetro de masas 5975C MSD inerte con detector de triple eje y un automuestreador Gerstel MPS configurado para el análisis SPME automático. La separación de los analitos se llevó a cabo en una columna capilar RESTEK Stabilwax, 30 m x 0,25 mm x 0,50 µm de grosor de película. El horno de la columna se programó como sigue: temperatura inicial de 80 °C durante 10 min, que se sometió a una rampa de 16 °C/min hasta 220 °C, que se mantuvo a 220 °C durante 8 min. Se usó helio como gas portador con una velocidad de flujo constante de 1 ml/min.

20 Se identificaron los compuestos volátiles por comparación con los espectros de masas de la colección NIST MS Search 2.0.

25 Los componentes volátiles: ácidos butanoico, hexanoico, octanoico y decanoico, son responsables de un sabor desagradable fuerte. La Tabla 8 muestra las concentraciones de los ácidos butanoico, hexanoico, octanoico y decanoico.

Tabla 10: Concentración relativa (área de pico) de componentes volátiles identificados en las muestras de galletas

	A	B	C
Ácido butanoico	151.000.000	1191.000.000	243.000.000
Ácido hexanoico	398.000.000	2050.000.000	580.000.000
Ácido octanoico	210.000.000	2650.000.000	200.000.000
Ácido decanoico	No detectable	989.000.000	28.100.000

La Tabla 10 muestra que las galletas preparadas con una lipasa comercial tienen un contenido mucho más alto de los ácidos butanoico, hexanoico, octanoico y decanoico en comparación con las galletas preparadas con la enzima lipolítica de acuerdo con la invención.

5 Adicionalmente, el personal de horneado formado no pudo percibir ningún sabor desagradable en las galletas preparadas con la enzima de acuerdo con la invención, pero pudieron percibir un fuerte sabor desagradable en las galletas preparadas con la lipasa comercial.

**Ejemplo 8**

Brioche sin sabor desagradable

Se prepararon brioches usando los ingredientes de la Tabla 11.

10 Tabla 11: ingredientes de los brioches

Receta (g)	D	E	F
Harina (harina Crousti, Dossche Mills, Deinze, Bélgica) a 7 °C	1500	1500	1500
Agua a 4 °C	450	450	450
Levadura (levadura instantánea de Bruggeman Brown)	30	30	30
Sal	24	24	24
Azúcar S1	270	270	270
Manteca	225	225	225
Huevos	300	300	300
Brioche AML (Puratos, Bélgica)*	30	30	30
Lipopan 50 (Novozymes A/S)		1,15	
SEQ ID NO:1 (mg de PE)**			3,47
* Contiene harina de trigo, gluten de trigo hidrolizado, antioxidante (ácido ascórbico) y enzimas.			
** Se añadieron 3,47 mg (proteína enzimática de SEQ ID NO:1) por 1500 g de harina			

Proceso:

Se utilizó el siguiente proceso:

15 Mezclar los diferentes ingredientes en un Diosna SP24 durante 6 min a baja velocidad y durante 11 min a alta velocidad (solo añadir la grasa después de 4 min de mezclado rápido). La temperatura final de la masa es de aproximadamente 27 °C.

Realizar una fermentación global durante 10 min a una temperatura ambiente de 25 °C.

Aumentar la escala a 500 g de masa.

Moldear manualmente el pan.

20 Aplicar un tiempo de fermentación intermedio de 20 min a 25 °C.

Moldear en un Jac Unic con R4.5 y L16.

Fermentar durante 165 min a 28 °C y una HR del 95 % en una cámara de fermentación Koma.

Hornear durante 30 minutos a 200 °C en un horno Miwe Condo.

Dejar enfriar los brioches durante 90 minutos y envasar el pan en bolsas de plástico.

25 Análisis de los brioches:

## ES 3 014 686 T3

El análisis de los volátiles (los mismos volátiles que se han descrito en el Ejemplo 4) se llevó a cabo en los brioches. La Tabla 12 muestra las concentraciones de los ácidos butanoico, hexanoico, octanoico y decanoico.

Tabla 12: Concentración relativa (área de pico) de componentes volátiles identificados en las muestras de brioches

	D	E	F
Ácido butanoico	69.700.000	74.800.000	65.400.000
Ácido hexanoico	101.000.000	513.000.000	187.000.000
Ácido octanoico	93.800.000	625.000.000	151.000.000
Ácido decanoico	No detectable	140.000.000	No detectable

- 5 La Tabla 12 muestra que los brioches preparados con una lipasa comercial tienen un contenido más alto de los ácidos butanoico, hexanoico, octanoico y decanoico en comparación con los brioches preparados con la enzima lipolítica de acuerdo con la invención.

Adicionalmente, el personal de horneado formado no pudo percibir ningún sabor desagradable en los brioches preparados con la enzima de acuerdo con la invención, pero pudieron percibir un fuerte sabor desagradable en los brioches preparados con la lipasa comercial.

Se ha de tener en cuenta que los brioches preparados con las enzimas (E y F) proporcionaron una miga más fina que los brioches con mantequilla sola (juzgado por el personal de horneado formado).

### Ejemplo 9

#### Pan producido con la enzima de acuerdo con la invención

- 15 Se preparó pan usando los ingredientes de la Tabla 13.

Tabla 13: Ingredientes del pan

Receta (g)	G	H	I	J
Harina (harina Crousti, Dossche Mills, Deinze, Bélgica) a 7 °C	1500	1500	1500	1500
Agua a 12 °C	810	810	810	810
Levadura fresca	45	45	45	45
Sal	28,5	28,5	28,5	28,5
Azúcar (sacarosa)	90	90	90	90
Aceite de colza	30	30	30	30
Propionato de calcio	7,5	7,5	7,5	7,5
Mejorador de pan (Puratos, Bélgica)*	15	15	15	15
SEQ ID NO:1 (mg de PE)**		3,47		
Bakezyme L80000 (DSM, los Países Bajos) (mg)			4,2	
Amanolipasa DF15 (Amano, Japón) (mg)				22,5
* Contiene harina de trigo, antioxidante (ácido ascórbico) y enzimas (amilasa, xilanas).				
** Se añadieron 3,47 mg (proteína enzimática de SEQ ID NO:1) por 1500 g de harina				

Proceso:

Se usó el siguiente proceso:

Mezclar los diferentes ingredientes en un Diosna SP24 durante 2 min a baja velocidad y durante 7 min a alta velocidad. La temperatura final de la masa es de aproximadamente 26 °C.

Realizar una fermentación global durante 5 min a una temperatura ambiente de 25 °C.

5 Aumentar la escala a 600 g de masa.

Moldear manualmente el pan.

Aplicar un tiempo de fermentación intermedio de 15 min a 25 °C.

Moldear en un Jac Unic con R4.5 y L15.

Fermentar durante 110 min a 35 °C y una HR del 95 % en una cámara de fermentación Koma.

10 Hornear durante 25 minutos a 220/230 °C (por encima/por debajo) en un horno Miwe Condo.

Dejar enfriar el pan durante 120 minutos y envasar el pan en bolsas de plástico.

Medición de la textura del pan:

15 Para la medición de la dureza, se usó un TA.XT de Stable Micro Systems (TA.XT plus). Se midieron 10 repeticiones (pan diferente) con una sonda de diámetro 25 mm con una velocidad de 2 mm/s y se comprimieron con una fuerza del 25 % de la altura total en la miga de pan.

Las mediciones de dureza se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Mediciones de dureza en muestras de pan, medidas el día 2

	G	H	I	J
Dureza (promedio) (g)	211	161	200	195
desv. est.	21	14	12	15

20 Los resultados muestran que el pan preparado con la enzima de acuerdo con la invención es significativamente más blando que el de referencia. Los panes preparados con lipasas comerciales son similares en esponjosidad al de referencia.

Aumentar la escala a 600 g de masa.

Moldear manualmente el pan.

Aplicar un tiempo de fermentación intermedio de 15 min a 25 °C.

25 Moldear en un Jac Unic con R4.5 y L15.

Fermentar durante 110 min a 35 °C y una HR del 95 % en una cámara de fermentación Koma.

Hornear durante 25 minutos a 220/230 °C (por encima/por debajo) en un horno Miwe Condo.

Dejar enfriar el pan durante 120 minutos y envasar el pan en bolsas de plástico.

Medición de la textura del pan:

30 Para la medición de la dureza, se usó un TA.XT de Stable Micro Systems (TA.XT plus). Se midieron 10 repeticiones (pan diferente) con una sonda de diámetro 25 mm con una velocidad de 2 mm/s y se comprimieron con una fuerza del 25 % de la altura total en la miga de pan.

Las mediciones de dureza se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14: Mediciones de dureza en muestras de pan, medidas el día 2

	G	H	I	J
Dureza (promedio) (g)	211	161	200	195
desv. est.	21	14	12	15

Los resultados muestran que el pan preparado con la enzima de acuerdo con la invención es significativamente más blando que el de referencia. Los panes preparados con lipasas comerciales son similares en esponjosidad al de referencia.

5

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido que tiene actividad de enzima lipolítica, seleccionado del grupo que consiste en:
  - (a) un polipéptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75 % respecto a los aminoácidos 21 a 309 de SEQ ID NO: 1; y
  - 5 (b) un polipéptido codificado por un polinucleótido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 75 % respecto a la secuencia codificante del polipéptido de SEQ ID NO: 2.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o el 100 % respecto a los aminoácidos 21 a 10 309 de SEQ ID NO: 1.
3. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende un segmento catalítico de la secuencia de aminoácidos G-H-S-L-G.
4. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el polipéptido tiene actividad de lipasa y fosfolipasa.
- 15 5. Un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Una construcción de ácido nucleico o vector de expresión que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5 unido operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un hospedador de expresión.
7. Una célula hospedadora recombinante que comprende el polinucleótido de la reivindicación 5 unido 20 operativamente a una o más secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido.
8. Un método de producción del polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende cultivar una célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 7 en condiciones propicias para la producción del polipéptido.
9. Un granulado o un líquido estabilizado que comprende el polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 25 10. Una composición que comprende la enzima lipolítica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en aminopeptidasa, amilasa, alfa-amilasa, alfa-amilasa maltogénica, beta-amilasa, carboxipeptidasa, catalasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, galactanasa, glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa, glucanasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, mananasa, manosidasa, oxidasa, enzimas pectinolíticas, peptidoglutaminasa, peroxidasa, enzima fosfolipolítica, fitasa, 30 polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa y xilanas.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la una o más enzimas se seleccionan del grupo constituido por alfa-amilasa maltogénica, beta-amilasa y glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa.
12. Un método de preparación de un producto horneado, que comprende la etapa de añadir a la masa, antes de 35 hornear, una enzima lipolítica de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, un granulado o un líquido estabilizado de acuerdo con la reivindicación 9, o una composición de acuerdo con las reivindicaciones 10-11.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la cantidad de enzima lipolítica es entre 0,01 y 100 mg, preferentemente entre 0,05 y 50 mg, más preferentemente entre 0,1 y 25 mg, incluso más preferentemente entre 0,1 y 15 mg de proteína enzimática por kg de harina en la masa o en la mezcla batida.
- 40 14. Uso de una enzima lipolítica de acuerdo con las reivindicaciones 1-4, un granulado o un líquido estabilizado de acuerdo con la reivindicación 9, o una composición de acuerdo con las reivindicaciones 10-11 en aplicaciones de panadería y/o pastelería.
15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 en mejoradores de pan y/o en mezclas o premezclas de pastelería.