

MÉTODO PARA AUMENTAR LOS RENDIMIENTOS DEL ACEITE DE PALMA CRUDOCAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para el
5 tratamiento del fruto de la palma o una porción de este o un
extracto del fruto de la palma (o un extracto del fruto de la
palma prensado conocido, además, en la industria como “líquido
prensado” o “aceite prensado”) con una enzima que degrada un
fosfolípido presente en el extracto del fruto de la palma. El
10 método da como resultado la desemulsificación del extracto del
fruto de la palma (p. ej., extracto del fruto de la palma
prensado) y la separación significativamente mejorada del
aceite del líquido de palma prensado, lo que reduce, por lo
tanto, la cantidad de aceite en la corriente de desechos.

15

ANTECEDENTES

El aceite de palma que se obtiene a partir de la palma
de aceite (*Elaeis guineensis*) es un aceite comestible
comercialmente importante. El aceite de palma ha sido un
20 recurso prominente de grasa y aceite para la industria
alimentaria debido a varias propiedades ventajosas, tales
como productividad alta, precio bajo, plasticidad alta y
estabilidad térmica y oxidativa a temperatura ambiente.

Además, en comparación con otros aceites vegetales, el aceite de palma es una fuente rica de la vitamina E antioxidante.

En 2012, la producción mundial de aceite de palma fue de 45 Gg/año (50 millones de toneladas/año), que en cantidad lo hace el aceite vegetal más importante producido. Se estima que 4-8 % de aceite de palma se pierde durante el procesamiento. Esta pérdida puede dividirse de la siguiente manera: 0,8-1 % se pierde en la fibra del mesocarpio de la palma, 1,5-2,7 % se pierde del racimo de fruta vacío (EFB, por sus siglas en inglés); y más de aproximadamente 1 % se pierde en el efluente del molino de aceite (Ho et al JOACS, Vol. 69, núm. 3, marzo de 1992). El cálculo del porcentaje se basa en racimos de fruta fresca.

El procesamiento de aceite de palma es complicado y extenso. La Figura 1 muestra un diagrama de flujo para el procesamiento de aceite de palma. La producción de aceite de palma crudo se realiza mediante una serie de operaciones unitarias que comienza con una esterilización del racimo de fruta fresca (FFB, por sus siglas en inglés).

Después de la esterilización, los frutos se separan del racimo y se digieren. Durante la digestión, el fruto de la palma se desintegra y el aceite se libera de la fibra. Después de la digestión, el aceite crudo se separa de la fibra al prensar los frutos digeridos.

El aceite de palma prensado que se obtiene de esta manera es una mezcla de aceite y agua, y la fase oleosa se aísla mediante separación en un tanque de clarificación.

El aceite de palma crudo que se descarga de las prensas
5 es altamente viscoso. Por lo tanto, la separación del aceite del sólido y el agua es difícil sin la adición de agua de dilución. Por lo tanto, se añade agua caliente al líquido prensado para diluirlo antes de o durante la clarificación. Típicamente, esto se produce a temperaturas de 80-90 °C. La
10 dilución proporciona una barrera que provoca que el sólido pesado se sedimente en el fondo del tanque de clarificación mientras que las gotitas de aceite más livianas se elevan a través de la fase de lodo a la parte superior cuando se aplica calor. En la práctica se ha descubierto que la
15 dilución con agua, de manera que 38 % a 40 % de la mezcla sea aceite crudo, es lo mejor para una buena separación en el tanque de clarificación. Cualquier aceite disponible restante después de la clarificación se elimina mediante centrifugación. El lodo centrifugado es un líquido viscoso
20 que contiene agua, aproximadamente 0,5-1,5 % de aceite y 5-10 % de sólidos sin aceite. Para cada tonelada de aceite producido, se produce 10-15 kN (1-1,5 toneladas) de lodo centrifugado. El lodo centrifugado presenta, por lo tanto, una pérdida sustancial de aceite.

Durante estas etapas iniciales de procesamiento se obtiene 90-92 % de la cantidad teórica de aceite de palma, pero existe una pérdida significativa de aceite con respecto a la fibra (p. ej., la torta de prensa) durante el procesamiento, así como una pérdida de aceite durante el procesamiento corriente abajo.

Se conoce el uso de enzimas en el procesamiento de aceites vegetales. Las enzimas, tales como fosfolipasas o lípido aciltransferasas se han usado para aumentar el rendimiento de aceite en el desgomado de aceite con agua y/o enzimático con un alto contenido de fosfolípidos (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos núm. 6.001.640, las patentes núm. WO2006/008508, WO2009/081094).

En estas reacciones se añade la enzima a aceites comestibles desgomados con agua, aceites comestibles crudos o aceites comestibles semicrudos que comprenden cantidades relativamente altas de un fósforo no hidratable que varía de aproximadamente 50 a aproximadamente 3000 ppm. En el diagrama de flujo que se muestra en la presente descripción en la Figura 1, el tipo de aceite que se habría usado en tales procesos se designa "aceite de palma crudo". En cualquier caso, el desgomado del aceite de palma no es, frecuentemente, esencial ya que el nivel de fósforo no hidratable puede ser naturalmente bajo en este producto, especialmente, en comparación con otros aceites vegetales. Por ejemplo, el contenido de fósforo del

aceite de palma es aproximadamente 15-30 ppm lo cual es muy bajo en comparación con, por ejemplo, aceite de maíz (250-800 ppm), semilla de algodón (400-1000 ppm), semilla de colza (200-1400 ppm), soja (400-1200 ppm) o girasol (200-500 ppm).

5 Tradicionalmente, el aceite de palma se produce al prensar el aceite fuera del mesocarpio de la palma sin el uso de solventes orgánicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

10 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona un método para mejorar los rendimientos del aceite de palma crudo o mejorar la separación del aceite de palma crudo o una combinación de estos en el procesamiento del fruto de la palma; el método comprende:

- 15 a. mezclar un fruto de la palma o una porción de este o un extracto del fruto de la palma y una enzima, la enzima degrada un fosfolípido presente en el fruto de la palma o una porción de este o en el extracto del fruto de la palma, y
- 20 b. incubar la mezcla en aproximadamente 45 °C a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 6 horas.

De acuerdo con un segundo aspecto, la presente invención proporciona el uso de una enzima, la enzima
25 degrada un fosfolípido presente en el fruto de la palma o

una porción de este o en un extracto del fruto de la palma para mejorar los rendimientos del aceite de palma crudo en el procesamiento del fruto de la palma o mejorar la separación del aceite de palma crudo (p. ej., en el clarificador) o una combinación de estos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Las modalidades de la invención se describirán ahora, solamente como ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas, en donde:

La **Figura 1** muestra un diagrama de flujo para el procesamiento de aceite de palma.

La **Figura 2** muestra los sitios de escisión en un fosfolípido para diferentes fosfolipasas.

La **Figura 3** muestra la secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa madura mutante de *Aeromonas salmonicida* (GCAT) con una mutación de Asn80Asp (particularmente, el aminoácido 80 se encuentra en la secuencia madura) (sec. con núm. de ident. 16);

la **Figura 4** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 1) de una lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC núm. 7965);

la **Figura 5** muestra una secuencia consenso pfam00657 de la base de datos versión 6 (sec. con núm. de ident. 2);

la **Figura 6** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 3) obtenida del organismo *Aeromonas hydrophila* (P10480; GI:121051);

la **Figura 7** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 4) obtenida del organismo *Aeromonas salmonicida* (AAG098404; GI:9964017);

la **Figura 8** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 5) obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acceso de GenBank NP_631558);

la **Figura 9** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 6) obtenida del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acceso de GenBank: CAC42140);

la **Figura 10** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 7) obtenida del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso de GenBank P41734);

la **Figura 11** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 8) obtenida del organismo *Ralstonia* (número de acceso de GenBank: AL646052);

la **Figura 12** muestra la sec. con núm. de ident. 9. Proteína hipotética conservada Sco1 con código de acceso de proteína NCBI CAB39707.1 GI:4539178 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

la **Figura 13** muestra un aminoácido que se muestra como la sec. con núm. de ident. 10. Proteína hipotética

conservada Scoe2 con código de acceso de proteína NCBI CAC01477.1 GI:9716139 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

la **Figura 14** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 11) proteína secretada putativa Scoe3 con
5 código de acceso de proteína NCBI CABS8833.1 GI:7635996 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

la **Figura 15** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 12) proteína secretada putativa Scoe4 con
código de acceso de proteína NCBI CAB89450.1 GI:7672261
10 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

la **Figura 16** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 13) lipoproteína putativa Scoe5 con código de acceso de proteína NCBI CAB62724.1 GI:6562793
[*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

15 la **Figura 17** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 14) GDSL-lipasa Srim1 con código de acceso de proteína NCBI AAK84028.1 GI:15082088 [*Streptomyces rimosus*];

la **Figura 18** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 15) de una lípido aciltransferasa de
20 *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* (ATCC núm. 14174);

la **Figura 19** muestra la sec. con núm. de ident. 19. Proteína hipotética conservada Scoe1 con código de acceso de proteína NCBI CAB39707.1 GI:4539178 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

la **Figura 20** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 25) del constructo de fusión que se usa para la mutagénesis del gen de la lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila*. Los aminoácidos subrayados son un
 5 péptido señal de xilanasa;

la **Figura 21** muestra una secuencia de polipéptidos de una enzima lípido aciltransferasa de *Streptomyces* (sec. con núm. de ident. 26);

la **Figura 22** muestra una secuencia de polipéptidos de
 10 una enzima lípido aciltransferasa de *Thermobifida* (sec. con núm. de ident. 27);

la **Figura 23** muestra una secuencia de polipéptidos de una enzima lípido aciltransferasa de *Thermobifida* (sec. con núm. de ident. 28);

15 la **Figura 24** muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de aminoácido GDSx 300 de *Corynebacterium efficiens* (sec. con núm. de ident. 29);

la **Figura 25** muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de aminoácido GDSx 284 de *Novosphingobium aromaticivorans* (sec. con núm. de ident. 30);
 20

la **Figura 26** muestra un polipéptido de una enzima lípido aciltransferasa de aminoácido GDSx 269 de *Streptomyces coelicolor* (sec. con núm. de ident. 31);

la **Figura 27** muestra un polipéptido de una enzima
lípidico aciltransferasa de aminoácido de *Streptomyces*
avermitilis \ GDSx 269 (sec. con núm. de ident. 32);

la **Figura 28** muestra un polipéptido de una enzima lípidico
5 aciltransferasa de *Streptomyces* (sec. con núm. de ident. 33);

la **Figura 29** muestra una secuencia de aminoácidos (sec.
con núm. de ident. 34) obtenida del organismo *Aeromonas*
hydrophila (P10480; GI:121051) (particularmente, esta es la
secuencia madura);

10 la **Figura 30** muestra la secuencia de aminoácidos (sec. con
núm. de ident. 35) de una lípidico aciltransferasa madura de
Aeromonas salmonicida (GCAT) (particularmente, esta es la
secuencia madura);

la **Figura 31** muestra una secuencia de nucleótidos (sec.
15 con núm. de ident. 36) de *Streptomyces thermosacchari*;

la **Figura 32** muestra una secuencia de aminoácidos (sec.
con núm. de ident. 37) de *Streptomyces thermosacchari*;

la **Figura 33** muestra una secuencia de aminoácidos (sec.
con núm. de ident. 38) de *Thermobifida fusca*/aminoácido GDSx
20 548;

la **Figura 34** muestra una secuencia de nucleótidos (sec.
con núm. de ident. 39) de *Thermobifida fusca*;

la **Figura 35** muestra una secuencia de aminoácidos (sec.
con núm. de ident. 40) de *Thermobifida fusca*/GDSx;

la **Figura 36** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 41) de *Corynebacterium efficiens*/aminoácido GDSx 300;

la **Figura 37** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 42) de *Corynebacterium efficiens*;

la **Figura 38** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 43) de *S. coelicolor*/ aminoácido GDSx 268;

la **Figura 39** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 44) de *S. coelicolor*;

la **Figura 40** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 45) de *S. avermitilis*;

la **Figura 41** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 46) de *S. avermitilis*;

la **Figura 42** muestra una secuencia de aminoácidos (sec. con núm. de ident. 47) de *Thermobifida fusca*/GDSx;

la **Figura 43** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 48) de *Thermobifida fusca*/GDSx;

la **Figura 44** muestra un alineamiento de L131 y los homólogos de *S. avermitilis* y *T. fusca* que ilustra la conservación del motivo GDSx (GDSY en L131 y *S. avermitilis* y *T. fusca*), la caja GANDY, que es GGND A o GGND L, y el bloque HPT (considerado como la histidina catalítica conservada). Estos tres bloques conservados aparecen resaltados;

la **Figura 45** muestra la sec. con núm. de ident. 17 que es la secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;

la **Figura 46** muestra la sec. con núm. de ident. 18 que
5 es la secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa de *Candida parapsilosis*;

la **Figura 47** muestra la secuencia del inserto XhoI que contiene el gen precursor LAT-KLM3', las cajas -35 y -10 aparecen subrayadas;

10 la **Figura 48** muestra una secuencia de nucleótidos de *Aeromonas salmonicida* (sec. con núm. de ident. 49) que incluye la secuencia señal (preLAT, posiciones 1 a 87);

la **Figura 49** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 50) que codifica una lípido
15 aciltransferasa de acuerdo con la presente invención que se obtiene del organismo *Aeromonas hydrophila*;

la **Figura 50** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 51) que codifica una lípido
20 aciltransferasa de acuerdo con la presente invención que se obtiene del organismo *Aeromonas salmonicida*;

la **Figura 51** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 52) que codifica una lípido
25 aciltransferasa de acuerdo con la presente invención que se obtiene del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acceso de GenBank NC_003888.1:8327480..8328367);

la **Figura 52** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 53) que codifica una lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención que se obtiene del organismo *Streptomyces coelicolor* A3(2) (número de acceso de GenBank AL939131.1:265480..266367);

la **Figura 53** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 54) que codifica una lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención que se obtiene del organismo *Saccharomyces cerevisiae* (número de acceso de GenBank Z75034);

la **Figura 54** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 55) que codifica una lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención que se obtiene del organismo *Ralstonia*;

la **Figura 55** muestra una secuencia de nucleótidos que se muestra como sec. con núm. de ident. 56 que codifica una proteína hipotética conservada con código de acceso de proteína del NCBI CAB39707.1 GI:4539178 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

la **Figura 56** muestra una secuencia de nucleótidos que se muestra como sec. con núm. de ident. 57 que codifica una proteína hipotética conservada Scoe2 con código de acceso de proteína del NCBI CAC01477.1 GI:9716139 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

la **Figura 57** muestra una secuencia de nucleótidos que se muestra como sec. con núm. de ident. 58 que codifica una

proteína secretada putativa Scoe3 con código de acceso de proteína del NCBI CAB88833.1 GI:7635996. [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

la **Figura 58** muestra una secuencia de nucleótidos que se muestra como sec. con núm. de ident. 59 que codifica una proteína secretada putativa Scoe4 con código de acceso de proteína del NCBI CAB89450.1 GI:7672261. [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

la **Figura 59** muestra una secuencia de nucleótidos que se muestra como sec. con núm. de ident. 60 que codifica una lipoproteína putativa Scoe5 con código de acceso de proteína del NCBI CAB62724.1 GI:6562793 [*Streptomyces coelicolor* A3(2)];

la **Figura 60** muestra una secuencia de nucleótidos que se muestra como sec. con núm. de ident. 61 que codifica una GDSL-lipasa Srim1 con código de acceso de proteína del NCBI AAK84028.1 GI:15082088 [*Streptomyces rimosus*];

la **Figura 61** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 62) que codifica una lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* (ATCC núm. 7965);

la **Figura 62** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 63) que codifica una lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* subsp. *Salmonicida* (ATCC núm. 14174);

la **Figura 63** muestra la secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa madura mutante de *Aeromonas salmonicida* (GCAT) con una mutación de Asn80Asp

(particularmente, el aminoácido 80 se encuentra en la secuencia madura), que se muestra en la presente descripción como sec. con núm. de ident. 16 y después de experimentar una modificación postraslacional como la sec. con núm. de ident. 68, los residuos de aminoácidos 235 y 236 de la sec. con núm. de ident. 68 no se unen covalentemente después de la modificación postraslacional. Los dos péptidos formados se mantienen unidos por uno o más puentes S-S. El aminoácido 236 en la sec. con núm. de ident. 68 corresponde con el residuo de aminoácidos número 274 en la sec. con núm. de ident. 16 que se muestra en la presente descripción;

la **Figura 64** muestra una secuencia de nucleótidos (sec. con núm. de ident. 120) que codifica una lípido aciltransferasa de *A. salmonicida*;

la **Figura 65** muestra la secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa madura mutante de *Aeromonas salmonicida* (GCAT) con una mutación de Asn80Asp (particularmente, el aminoácido 80 se encuentra en la secuencia madura), que se muestra en la presente descripción como sec. con núm. de ident. 16 y después de experimentar una modificación postraslacional como la sec. con núm. de ident. 121, los residuos de aminoácidos 235 y 236 de la sec. con núm. de ident. 121 no se unen covalentemente después de la modificación postraslacional; los dos péptidos formados se mantienen unidos por uno o más puentes S-S; el aminoácido

236 en la sec. con núm. de ident. 121 corresponde con el residuo de aminoácidos número 275 en la sec. con núm. de ident. 16 que se muestra en la presente descripción;

la **Figura 66** muestra la secuencia de aminoácidos de una
5 lípido aciltransferasa madura mutante de *Aeromonas salmonicida* (GCAT) con una mutación de Asn80Asp (particularmente, el aminoácido 80 se encuentra en la secuencia madura), que se muestra en la presente descripción como sec. con núm. de ident. 16 y después de experimentar
10 una modificación postraslacional como la sec. con núm. de ident. 122, los residuos de aminoácidos 235 y 236 de la sec. con núm. de ident. 122 no se unen covalentemente después de la modificación postraslacional; los dos péptidos formados se mantienen unidos por uno o más puentes S-S; el aminoácido
15 236 en la sec. con núm. de ident. 122 corresponde con el residuo de aminoácidos número 276 en la sec. con núm. de ident. 16 que se muestra en la presente descripción; y

la **Figura 67** muestra la secuencia de aminoácidos de una
20 lípido aciltransferasa madura mutante de *Aeromonas salmonicida* (GCAT) con una mutación de Asn80Asp (particularmente, el aminoácido 80 se encuentra en la secuencia madura), que se muestra en la presente descripción como sec. con núm. de ident. 16 y después de experimentar una modificación postraslacional como la sec. con núm. de
25 ident. 123, los residuos de aminoácidos 235 y 236 de la sec.

con núm. de ident. 123 no se unen covalentemente después de la modificación postraslacional; los dos péptidos formados se mantienen unidos por uno o más puentes S-S; el aminoácido 236 en la sec. con núm. de ident. 123 corresponde con el
5 residuo de aminoácidos número 277 en la sec. con núm. de ident. 16 que se muestra en la presente descripción.

La **Figura 68** muestra la separación de aceite después del tratamiento enzimático y la inactivación de la enzima.

La **Figura 69** muestra la separación de aceite después
10 del tratamiento enzimático y la inactivación de la enzima (ver la Tabla 4)

La **Figura 70** muestra aceite prensado tratado con Lecitase Ultra después de la inactivación térmica.

La **Figura 71** muestra muestras de aceite después de la
15 inactivación térmica.

La **Figura 72** muestra muestras de aceite después del tratamiento enzimático y la inactivación térmica.

La **Figura 73** muestra aceite prensado tratado con LysoMax Oil después de la inactivación térmica.

20 La **Figura 74** muestra las muestras (ver la Tabla 13) después de la centrifugación a 48 rcf durante 5 minutos a 60 °C.

La **Figura 75** muestra las muestras (ver la Tabla 13) después de la centrifugación a 3050 rcf durante 10 minutos a
25 60 °C.

La **Figura 76** muestra una secuencia (sec. con núm. de ident. 124) que es la secuencia de GL541 PLA2.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Un descubrimiento fundamental de la presente invención es que el tratamiento del extracto del fruto de la palma (p. ej., extracto del fruto de la palma prensado conocido, además, en la industria como “líquido prensado” o “aceite prensado”) con una enzima que degrada un fosfolípido en el extracto del fruto de la palma da como resultado la desemulsificación del extracto del fruto de la palma y rendimientos del aceite de palma significativamente mejorados.

En base a estos descubrimientos, se proporciona un método para mejorar los rendimientos del aceite de palma crudo o mejorar la separación del aceite de palma crudo (p. ej., durante la clarificación) o una combinación de estos en el procesamiento del fruto de la palma; el método comprende:

- a. mezclar un fruto de la palma o una porción de este o un extracto del fruto de la palma y una enzima, la enzima degrada un fosfolípido presente en el fruto de la palma o una porción de este o en el extracto del fruto de la palma, y
- b. incubar la mezcla en aproximadamente 45 °C a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 6 horas.

Se proporciona, además, el uso de una enzima, la enzima degrada un fosfolípido presente en el fruto de la palma o una porción de este o en un extracto del fruto de la palma

para mejorar los rendimientos del aceite de palma crudo en el procesamiento del fruto de la palma o mejorar la separación del aceite de palma crudo (p. ej., durante la clarificación) o una combinación de estos.

5 En otra modalidad, se proporciona un método para procesar el fruto de la palma; el método comprende:

- a. mezclar un fruto de la palma o una porción de este o un extracto del fruto de la palma y una enzima, la enzima produce un lisofosfolípido a partir de un fosfolípido presente en el fruto de la palma o una porción de este o en el extracto del fruto de la palma, y
- b. incubar la mezcla en aproximadamente 45 °C a aproximadamente 95 °C durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 6 horas.

En una modalidad se proporciona el uso de una enzima, la enzima produce un lisofosfolípido a partir de un fosfolípido presente en el fruto de la palma o una porción de este o en un extracto del fruto de la palma para mejorar los rendimientos del aceite de palma crudo en el procesamiento del fruto de la palma o mejorar la separación del aceite de palma crudo (p. ej., durante la clarificación) o una combinación de estos.

La enzima que degrada un fosfolípido presente en el extracto del fruto de la palma prensado como se usa en la presente descripción, puede seleccionarse del grupo que

consiste en: una lípido aciltransferasa, una fosfolipasa A1, una fosfolipasa A2, fosfolipasa B o una fosfolipasa D.

Una “enzima que degrada un fosfolípido” como se usa en la presente descripción es una enzima que es capaz de
5 escindir un enlace presente en un fosfolípido para romper la molécula de fosfolípido en uno o más productos diferentes, en donde el(los) producto(s) no incluye(n) fosfocolina u O-fosforiletanolamina. La escisión puede producirse en la posición SN-1, posición SN-2, después del grupo fosfato del
10 fosfolípido o una combinación de estas. Una “enzima que degrada un fosfolípido” no es una enzima que escinde un fosfolípido antes del fosfato. En otras palabras la enzima que degrada un fosfolípido no es un fosfolípido C [PLC] (p. ej., como se muestra en la Figura 2).

15 Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que el cuerpo de aceite en la emulsión aceite en agua se cubre en fibra y que el fosfolípido degradado (p. ej., material de acción superficial) desplaza la fibra del cuerpo de aceite. Se cree que el fosfolípido degradado (p. ej., material de
20 acción superficial) desplaza las macromoléculas que se absorben en la superficie de gotas de aceite, de esta manera, se disminuye la densidad y las vuelve separables después de la centrifugación.

El término fosfolípido, como se usa en la presente descripción, significa cualquier fosfolípido, tal como una lecitina, por ejemplo, fosfatidilcolina y/o fosfatidiletanolamina. El término lecitina, como se usa en
5 la presente descripción, abarca fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y ácido fosfatídico (PA).

En una modalidad, la enzima que degrada un fosfolípido puede usarse en combinación con una enzima que comprende una o
10 más de las siguientes actividades enzimáticas: actividad de celulasa, actividad de mananasa, actividad de pectinasa, actividad de xilanasas, actividad de glucuronidasa, o galactanasa.

En una modalidad, la enzima que degrada un fosfolípido
15 puede usarse en combinación con una enzima que comprende una o más de las siguientes actividades enzimáticas: actividad de celulasa y/o actividad de mananasa.

La actividad de celulasa de acuerdo con la presente invención puede ser una actividad de endoglucanasa (p. ej., una
20 β -glucanasa).

Se entiende que los términos “celulasas” o “enzimas celulolíticas”, como se usan en la presente descripción, comprenden la actividad de endoglucanasa (EC 3.2.1.4).

En una modalidad, la celulasa que se usa de acuerdo con la presente invención es una endoglucanasa (EC 3.2.1.4), por ejemplo, una endoglucanasa que corta las cadenas de celulosa de manera aleatoria. Las celulasas pueden comprender un módulo de unión a carbohidratos (CBM, por sus siglas en inglés) que
5 aumenta el enlace de la enzima a una fibra que contiene celulosa y aumenta la eficacia de la parte catalítica de la enzima. Un CBM se define como una secuencia contigua de aminoácidos dentro de una enzima activa en carbohidratos con
10 un pliegue discreto que tiene actividad de enlace a carbohidratos. Para obtener más información sobre CBM, consulte el servidor de internet CAZy (más arriba) o Tomme et al. (1995) en *Enzymatic Degradation of Insoluble Polysaccharides* (Saddler y Penner, edit.), Cellulose-binding
15 domains: classification and properties, págs. 142-163, American Chemical Society, Washington. En una modalidad preferida, las enzimas celulasas o celulolíticas pueden ser un preparado celulolítico tal como se define en la solicitud de patente de los Estados Unidos núm. 60/941,251, que se
20 incorpora a la presente descripción como referencia. En algunas modalidades, la enzima celulasa es una derivada de *Trichoderma reesei*.

En algunas modalidades, la actividad celulolítica puede derivarse de una fuente fúngica, tal como una cepa del
25 género *Trichoderma*, tal como una cepa de *Trichoderma reesei*;

o una cepa del género *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*.

Las endoglucanasas (E.C. 3.2.1.4) catalizan la endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-glucosídicos en celulosa, derivados de celulosa (tal como carboxi metil celulosa e hidroximetil celulosa), liquenina, enlaces beta-1,4 en beta-1,3 glucanos mixtos, tales como los beta-D-glucanos o xiloglucanos del cereal y otros materiales de plantas que contienen partes celulósicas. El nombre autorizado es endo-1,4-beta-D-glucano 4-glucano hidrolasa, pero en la presente descripción se usa el término abreviado endoglucanasa. La actividad de la endoglucanasa puede determinarse con el uso de la hidrólisis de carboximetil celulosa (CMC) de acuerdo con el procedimiento de Ghose, 1987, Pure and Appl. Chem. 59: 257-268 cuya enseñanza se incorpora en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades las endoglucanasas pueden derivarse a partir de una cepa del género *Trichoderma*, tal como una cepa de *Trichoderma reesei*; una cepa del género *Humicola*, tal como una cepa de *Humicola insolens*; o una cepa de *Chrysosporium*, preferentemente, una cepa de *Chrysosporium lucknowense*. En consecuencia, la celulasa para usar en la presente invención puede ser una celulasa *Chrysosporium lucknowense* disponible de Dyadic Internacional Inc. Estados Unidos, por ejemplo, como se enseña en la patente de los

Estados Unidos núm. 7,892,812, cuyas enseñanzas se incorporan en la presente descripción como referencia.

En algunas modalidades, la celulasa puede ser el producto de la expresión de una o más enzimas en una célula huésped adecuada (p. ej., un producto de fermentación).

En consecuencia, la composición enzimática que comprende actividad de celulasa puede ser obtenible (p. ej., obtenida) de *Trichoderma*, preferentemente, de *Trichoderma reesei*.

En una modalidad, la celulasa para usar en los métodos y/o usos de acuerdo con la presente invención puede ser o puede comprender LAMINEX® BG2 (disponible de Danisco A/S Genencor Division).

En una modalidad, la celulosa puede ser una fermentación de *Penicillium funiculosum* en combinación con una fermentación de *Trichoderma*, por ejemplo, *Trichoderma reesei*.

En otra modalidad, la celulasa de acuerdo con la presente invención pueden ser Laminex® Super 3G (disponible de Danisco A/S Genencor Division).

La composición enzimática que comprende celulasa para usar en la presente invención es, preferentemente, una que solubiliza tanto sedimento como sea posible.

En consecuencia, en una modalidad se usan una celulasa y una mananasa en combinación con la enzima que degrada un fosfolípido.

La composición enzimática para usar en la presente invención puede comprender actividad de celulasa junto con actividad de mananasa. En tal situación, la composición enzimática puede comprender, convenientemente, un nivel
5 mínimo de actividad de mananasa de tal manera que cuando se añade al sustrato se logra una concentración de mananasa de al menos 200 MVR/kg de sustrato.

En algunas modalidades, la composición de celulasa puede comprender actividad de mananasa secundaria. Cuando la
10 actividad de mananasa es una actividad secundaria debe representar al menos 200 MVR/kg de sustrato. Alternativamente, una enzima mananasa separada puede añadirse a una composición de celulasa para asegurar que al menos 200 MVR/kg de actividad de mananasa de sustrato esté presente en el sustrato.

15 Cuando la composición enzimática comprende mananasa, preferentemente, la composición enzimática para usar en la presente invención comprende un nivel mínimo de actividad de mananasa que cuando se añade al sustrato proporcionará una concentración de mananasa de al menos aproximadamente
20 200 MVR/kg de sustrato.

En una modalidad, puede usarse una xilanasa en combinación con la enzima que degrada un fosfolípido. En consecuencia, esto puede ser en combinación con una celulasa y/o una mananasa.

En una modalidad, la xilanasa es de origen microbiano,
25 tal como de origen fúngico (p. ej., Trichoderma, Meripilus,

Humicola, Aspergillus, Fusarium) o de una bacteria (p. ej., Bacillus). En algunas modalidades, la xilanasa se deriva de un hongo filamentoso, preferentemente, derivada de una cepa de Aspergillus, tal como Aspergillus aculeatus; o de una cepa de Humicola, preferentemente, Humicola lanuginosa. Preferentemente, la xilanasa puede ser una endo-1,4-beta-xilanasa. Los ejemplos de xilanasas que se encuentran en el mercado incluyen Grindamyl Powerbake 930 de Danisco A/S, Dinamarca o SHEARZYME™ y BIOFEED WHEAT™ de Novozymes A/S, Dinamarca.

En otra modalidad, puede usarse una glucuronidasa en combinación con la enzima que degrada un fosfolípido. La glucuronidasa para usar de acuerdo con la presente invención pueden ser una o más seleccionadas de: una 1,2-alfa-glucuronidasa (E.C. 3.2.1.131), una alfa-glucuronidasa (E.C. 3.2.1.139), una beta-glucuronidasa (E.C. 3.2.1.31), una glucuronosil-disulfoglucosamina glucuronidasa (E.C. 3.2.1.56) o una combinación de estas.

Como se usa en la presente descripción, el término “beta-glucuronidasa” es sinónimo de “beta-glucuronidasa glucuronohidrolasa”.

En otra modalidad, la glucuronidasa puede ser una 1,2-alfa-glucuronidasa (E.C. 3.2.1.131).

En una modalidad, la glucuronidasa puede ser una alfa-glucuronidasa (E.C. 3.2.1.139).

En otra modalidad, la glucuronidasa puede ser una beta-glucuronidasa (E.C. 3.2.1.31).

5 En una modalidad diferente, la glucuronidasa puede ser una glucuronosildisulfoglucosamina (E.C. 3.2.1.56).

En otra modalidad, puede usarse una galactanasa en combinación con la enzima que degrada un fosfolípido. La galactanasa puede seleccionarse de una exo-galactanasa (E.C. 10 3.2.1.23) o una endo-galactanasa (E.C. 3.2.1.89), por ejemplo, un arabinogalactano endo-1,4-beta-galactosidasa o una galactana endo-beta-1,3-galactanasa (E.C. 3.2.1.181). La arabinogalactano endo-1,4-beta-galactosidasa, cataliza la endohidrólisis de enlaces 1,4-D-galactosídicos en arabinogalactanos.

15 El término “xilanasa”, usado en la presente descripción, se refiere a una enzima que puede hidrolizar el enlace beta-1,4 glicosil en unidades beta-D- xilopiranosil-1,4-beta-D-xilopiranosil no terminales de xilano o arabinoxilano. Otros nombres incluyen 1,4-beta-D-xilano xilanohidrolasa, 1,4-beta- 20 xilano xilanohidrolasa, beta-1,4- xilano xilanohidrolasa, (1-4)-beta-xilano 4- xilanohidrolasa, endo-1,4-beta-xilanasas, endo-(1-4)-beta-xilanasas, endo-beta-1,4-xilanasas, endo-1,4-beta-D-xilanasas, endo-1,4-xilanasas, xilanasas, beta-1,4-xilanasas, beta-xilanasas, beta-D-xilanasas. Las xilanasas 25 pueden derivarse de una variedad de organismos, incluidas

plantas, hongos (p. ej., especies de *Aspergillus*,
Penicillium, *Disporotrichum*, *Neurospora*, *Fusarium*, *Humicola*,
Trichoderma, *Geosmithia*, *Talaromyces*) o especies bacterianas
 (p. ej., especies de *Bacillus*, *Aeromonas*, *Streptomyces*,
 5 *Nocardiosis*, *Thermomyces*) (ver, por ejemplo, las patentes
 núm. WO92/17573, WO92/01793, WO91/19782, WO94/21785 que se
 incorporan en la presente descripción como referencia).

En un aspecto de la invención, la xilanasa usada en los
 métodos de la invención es una enzima clasificada como EC
 10 3.2.1.8. EL nombre oficial es endo-1,4-beta-xilanasa. El nombre
 sistemático es 1,4-beta-D-xilano xilanohidrolasa. Pueden usarse
 otros nombres, tales como endo-(1-4)-beta-xilanasa; (1-4)-beta-
 xilano 4-xilanohidrolasa; endo-1,4-xilanasa; xilanasa; beta-
 1,4-xilanasa; endo-1,4-xilanasa; endo-beta-1,4-xilanasa; endo-
 15 1,4-beta-D- xilanasa; 1,4-beta-xilano xilanohidrolasa; beta-
 xilanasa; beta-1,4-xilano xilanohidrolasa; endo-1,4-beta-
 xilanasa; beta-D-xilanasa. La reacción catalizada es la
 endohidrólisis de enlaces 1,4-beta-D-xilosídicos en xilanos.

La mananasa para usar en la presente invención puede ser
 20 cualquier mananasa comercialmente disponible. La mananasa
 puede ser una endo-1,4- β -D-mananasa (clasificada como E.C.
 3.2.1.78) o una β -manosidasa (clasificada como E.C. 3.2.1.25).

Preferentemente, en una modalidad la mananasa es una
 endomananasa, por ejemplo, una endo-1,4- β -D-mananasa. La

clasificación para una endo-1,4- β -D-mananasa (β -mananasa) es E.C. 3.2.1.78.

En una modalidad, la mananasa puede ser una β -mananasa (E.C. 3.2.1.78) de *Bacillus*.

5 En una modalidad, la mananasa puede ser una β -mananasa (E.C. 3.2.1.78) de *Bacillus lentus* o *Bacillus subtilis* o *Bacillus licheniformis*.

En una modalidad, la composición enzimática puede comprender una mananasa (p. ej., E.C. 3.2.1.78) producida en
10 *Trichoderma*, por ejemplo, *Trichoderma reesei*.

En una modalidad, la mananasa puede ser Mannastar 375 375® (disponible comercialmente de Dupont industrial Biosciences).

En una modalidad, la mananasa puede ser una β -mananasa (E.C. 3.2.1.78) de *Bacillus lentus*, por ejemplo, tal como el
15 producto Hemicell® y Hemicell®-HT comercial de ChemGen Corp. (Elanco).

En una modalidad, la mananasa puede ser un Hemicell®-W (un producto comercial vendido por ChemGen Corp. que comprende β -mananasa (EC 3.2.1.78) de *Bacillus lentus* y una
20 xilanasa (EC 3.2.1.8) de *Trichoderma longibrachiatum*).

En una modalidad, la mananasa puede ser una β -mananasa (E.C. 3.2.1.78) de *Bacillus licheniformis*, tal como la β -mananasa (EC 3.2.1.78) de *Bacillus licheniformis* vendida en CTCzyme, un producto vendido por CTC BIO Inc.

En una modalidad, la mananasa puede ser Zymanase® (un producto comercial vendido por ChemGen Corp. que comprende una β -mananasa (EC 3.2.1.78) y una β -glucanasa.

En una modalidad, la mananasa puede ser CTCzyme, un
5 producto vendido por CTC BIO Inc., y que comprende una β -mananasa (EC 3.2.1.78) de *Bacillus licheniformis* (gen *B. licheniformis* expresado en *B. subtilis*).

En una modalidad, la mananasa puede ser una mananasa que se enseña en la patente de los Estados Unidos núm. 7.846.705,
10 que se incorpora en la presente descripción como referencia.

En una modalidad, las enzimas para usar en la presente invención son convenientemente termoestables.

En una modalidad, la enzima puede reticularse con glutaraldehído para mejorar la termoestabilidad de las enzimas.
15 Por ejemplo, ver las enseñanzas de Schmid et al Adv. Biochemc Ing. 12, pág. 41, 118 1979 y la patente europea núm. EP0575323B1, que se incorporan en la presente descripción como referencia.

En una modalidad, la enzima o enzima termoestable no es
20 una enzima modificada genéticamente.

El término “termoestabilidad” es la capacidad de una enzima para resistir la inactivación irreversible (usualmente, por desnaturalización) a una temperatura relativamente alta. Esto significa que la enzima retiene una cantidad especificada

de actividad enzimática después de la exposición a una temperatura identificada durante un período de tiempo dado.

Existen muchas maneras de medir la termoestabilidad. Como ejemplo, las muestras de enzimas pueden incubarse sin un sustrato durante un período de tiempo definido (p. ej., 10 min o de 1 a 30 min) a una temperatura elevada en comparación con la temperatura a la que la enzima es estable durante un tiempo más prolongado (días). Después de la incubación a temperatura elevada, la muestra de enzimas se analiza para determinar la actividad residual a la temperatura permisiva de, por ejemplo, 30 °C (alternativamente, de 25 a 50 °C o incluso hasta 70 °C). La actividad residual se calcula en relación con una muestra de la enzima que no se ha incubado a la temperatura elevada.

La termoestabilidad puede medirse, además, como inactivación de la enzima en función de la temperatura. En este caso, las muestras de enzimas se incuban sin un sustrato durante un período de tiempo definido (p. ej., 10 min o de 1 a 30 min) a varias temperaturas y, después de la incubación, se analizan para determinar la actividad residual a la temperatura permisiva de, por ejemplo, 30 °C (alternativamente, de 25 a 70 °C o incluso más alta). La actividad residual a cada temperatura se calcula en relación con una muestra de la enzima que no se ha incubado a la temperatura elevada. El perfil de desnaturalización térmica resultante (la temperatura frente a

la actividad residual) puede usarse para calcular la temperatura a la que se obtiene el 50 % de la actividad residual. Este valor se define como el valor de T_m .

Además, la termoestabilidad puede medirse como la inactivación de la enzima en función del tiempo. En este caso, las muestras de enzimas se incuban sin un sustrato a una temperatura elevada definida (p. ej., 76 °C) durante varios períodos de tiempo (p. ej., entre 10 s y 30 min) y, después de la incubación, se analizan para determinar la actividad residual a la temperatura permisiva de, por ejemplo, 30 °C (alternativamente, de 25 a 70 °C o incluso más alta). La actividad residual a cada temperatura se calcula en relación con una muestra de la enzima que no se ha incubado a la temperatura elevada. El perfil de inactivación resultante (el tiempo frente a la actividad residual) puede usarse para calcular el tiempo en el que se obtiene el 50 % de la actividad residual. Este se da, usualmente, como $T_{1/2}$.

Estos son ejemplos de cómo medir la termoestabilidad. La termoestabilidad puede medirse, además, con otros métodos. Preferentemente, la termoestabilidad se evalúa mediante el uso del “ensayo para la medición de la termoestabilidad” como se enseña en la presente descripción.

En contraposición con la termoestabilidad, la termoactividad es la actividad de la enzima en función de la

temperatura. Para determinar la termoactividad, las muestras de enzimas pueden incubarse (analizarse) durante el período de tiempo definido por el ensayo a varias temperaturas en presencia de un sustrato. La actividad enzimática se obtiene
5 durante o inmediatamente después de la incubación según lo definido por el ensayo (p. ej., la lectura de un valor de DO que refleja la cantidad de producto de reacción formado). La temperatura a la que se obtiene la actividad más alta es la temperatura óptima de la enzima en las condiciones de ensayo
10 dadas. La actividad obtenida a cada temperatura puede calcularse en relación con la actividad obtenida a la temperatura óptima. Esto proporcionará un perfil de temperatura para la enzima en las condiciones de ensayo dadas.

La termoestabilidad de una enzima (p. ej., una enzima que
15 degrada la fibra) para usar de acuerdo con la presente invención puede determinarse mediante el uso del “ensayo para la medición de la termoestabilidad” (ver a continuación).

“Ensayo para la medición de la termoestabilidad”

Los perfiles de desnaturalización térmica de la enzima
20 se miden al diluir y preincubar las muestras de enzimas en 25 mM de regulador de acetato, pH de 4,5, durante 10 minutos a temperaturas variables (60, 65, 70, 75, 80, 85 y 90 °C, respectivamente) y al medir, posteriormente, la actividad residual de la enzima cuando se prueba en el “ensayo de

actividad de beta-glucanasa” descrito en la presente descripción.

En el ensayo, la actividad medida sin preincubación se establece en 100 %, y la actividad residual de una enzima a
5 cada temperatura se calcula en relación con esta. El valor de T_m se calculó a partir de los perfiles de desnaturalización térmica como la temperatura a la que se obtiene el 50 % de la actividad residual.

En una modalidad, se considera que la enzima es
10 termoestable de acuerdo con la presente invención cuando tiene un valor de T_m mayor que 70 °C, en donde el valor de T_m es la temperatura a la que se obtiene el 50 % de la actividad residual después de 10 min de incubación. Este valor de T_m puede determinarse de acuerdo con el ensayo para
15 la medición de la termoestabilidad tal como se enseña en la presente descripción.

En una modalidad, se considera que la enzima es termoestable de acuerdo con la presente invención cuando tiene un valor de T_m mayor que 75 °C, en donde el valor de
20 T_m es la temperatura a la que se obtiene el 50 % de la actividad residual después de 10 min de incubación. Este valor de T_m puede determinarse de acuerdo con el ensayo para la medición de la termoestabilidad tal como se enseña en la presente descripción.

En una modalidad, se considera que la enzima es termoestable de acuerdo con la presente invención cuando tiene un valor de T_m mayor que 80 °C, en donde el valor de T_m es la temperatura a la que se obtiene el 50 % de la actividad residual después de 10 min de incubación. Este valor de T_m puede determinarse de acuerdo con el ensayo para la medición de la termoeestabilidad tal como se enseña en la presente descripción.

En una modalidad, la enzima de acuerdo con la presente invención no es Celluclast® (por Novozymes, A/S).

En una modalidad, la enzima no comprende actividad de pectinasa.

En una modalidad, la enzima o enzima termoeestable para usar en los métodos y/o los usos de la presente invención puede inmovilizarse.

El término “inmovilizada”, como se usa en la presente descripción, significa que la enzima o enzima termoeestable se fija en posición y su movimiento se impide, pero la actividad de la enzima o enzima termoeestable no se altera, sustancialmente, por dicha inmovilización. En consecuencia, una enzima o enzima termoeestable inmovilizada puede retener al menos 50 % de su actividad en comparación con una enzima o enzima termoeestable no inmovilizada. En consecuencia, puede retener al menos aproximadamente 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de su actividad en comparación con una enzima o enzima

termoestable no inmovilizada. Una enzima o enzima termoestable “inmovilizada” puede fijarse a una superficie. Esto puede lograrse mediante cualquier medio conocido en la materia que no altere, sustancialmente, la actividad de la enzima o enzima termoestable. En consecuencia, la enzima o enzima termoestable puede inmovilizarse mediante la reticulación (p. ej., la reticulación a una superficie). De manera ilustrativa, la enzima o enzima termoestable puede reticularse mediante el uso de glutaraldehído (Migneault et al BioTechniques 37: 790:802 (Nov. 2004)).

Ensayos de actividad enzimática

ENSAYO DE ACTIVIDAD DE CELULASA: MEDIANTE EL

PROCEDIMIENTO CMC-DNS:

El ensayo de la actividad de celulasa (p. ej., la actividad de endo-1,4- β -glucanasa) se basa en la hidrólisis enzimática de los enlaces 1,4- β -D-glucosídicos en carboximetilcelulosa (CM-celulosa 4M, Megazyme Ltd), un β -1,4 glucano. La enzima se diluye en ddH₂O y 0,25 ml de solución de enzima añadida a 1,75 ml de sustrato (1,5 % de CMC en 0,2 M de regulador de acetato de sodio, pH de 5,0) a 50 °C. Después de 10 min de incubación se añade una solución de 2 ml al 1 % de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y la muestra se coloca en un baño de agua hirviendo durante 5 min. Los productos de la reacción (β -1,4 glucano oligosacáridos) se determinan colorimétricamente a 540 nm al

medir el aumento resultante en los grupos reductores que reaccionan con el DNS. La actividad enzimática se calcula a partir de la relación entre la concentración de los grupos reductores, como equivalentes de glucosa, y la absorbancia
5 mediante el uso de un estándar de glucosa en el intervalo de 0,125-0,5 mg/ml. Una unidad de actividad de celulasa se define como la cantidad de enzima que produce 1 μ mol de equivalentes de glucosa por minuto en condiciones de ensayo.

En una modalidad, una celulasa de acuerdo con la
10 presente invención es una celulasa que reduce la cantidad de sedimento seco (materia seca) en al menos 20 % cuando se añade 25.000 CMC-DNS/kg de sustrato a un fruto de la palma, una porción de este o un extracto del fruto de la palma, y se incuba durante 1 hora a 50 °C y la materia seca de lodo
15 se analiza mediante el siguiente método:

Después de la incubación la muestra se colocó en un baño de agua a 95 grados durante 10 minutos para detener la reacción enzimática, y se transfirió a un tubo de centrifuga de 50 ml alquitranado.

20 La muestra se centrifugó a 4180 rcf y 60 °C durante 10 minutos.

La capa superior de aceite se eliminó, y la fase acuosa restante se descargó. Se añadió a cada tubo 30 ml de agua a 50 °C. La muestra se centrifugó a 4180 rcf y 60 °C durante
25 10 minutos.

La fase acuosa se eliminó y el lado del tubo se limpió con un pañuelo de papel para retirar el aceite residual en el interior del tubo. El sedimento húmedo se graduó, congeló y liofilizó.

5 El peso del sedimento seco se determinó después de la liofilización.

ENSAYOS DE ACTIVIDAD DE MANANASA Y PECTINASA (PVR U/G Y
MVR U/G) MEDIDOS MEDIANTE EL PROCEDIMIENTO DE REDUCCIÓN
DE VISCOSIDAD:

10 Se añade 25, 50, 75 y 100 μ l de una muestra de enzima diluida en ddH₂O a una solución de hidrocoloide (0,5 % de Grindsted GUAR 250 pH 6,7 o 1,4 % de Pectin SY200 pH 4 en un regulador de ácido cítrico-fosfato de sodio) y se incubó 19 horas a 40 °C. El hidrocoloide se escinde por la enzima a
15 oligosacáridos, para generar una caída en la viscosidad de la solución. Después de esto, las muestras se templaron durante 20 minutos en hielo antes de medir la viscosidad a 0 °C mediante el uso de una pipeta Viscoman (Gilson, Inc. Estados Unidos). La reducción de la viscosidad se calcula
20 como la viscosidad de una muestra con la adición de la enzima en relación con la viscosidad de la muestra sin la enzima. La reducción de la viscosidad se representa contra LN (μ l de dosificación en el sustrato) y debe ser lineal dentro de la viscosidad relativa de 0,1 a 0,85. La actividad
25 de la muestra en U/g se calcula mediante el uso de la línea

de regresión. Las unidades de reducción de viscosidad de la pectinasa (PVR, por sus siglas en inglés) y de reducción de viscosidad de la mananasa (MVR, por sus siglas en inglés) se definen como la cantidad de enzima que degradará la solución de sustrato hidrocoloide a una reducción de viscosidad de 50 % (0,5) en 19 horas de incubación a 40 °C.

Cuando la composición enzimática comprende mananasa, preferentemente, la composición enzimática para usar en la presente invención comprende un nivel mínimo de actividad de mananasa que cuando se añade al sustrato proporcionará una concentración de mananasa de al menos aproximadamente 200 MVR/kg de sustrato.

Cuando la composición enzimática comprende pectinasa, preferentemente, la composición enzimática para usar en la presente invención comprende un nivel mínimo de actividad de pectinasa que cuando se añade al sustrato proporcionará una concentración de mananasa de al menos aproximadamente 9 PVR/kg de sustrato.

En una modalidad, la composición enzimática para usar en la presente invención comprende poca o ninguna proteasa. En otras palabras, preferentemente, existen solamente niveles muy bajos o ninguna actividad de proteasa en la mezcla de reacción durante la incubación.

ENSAYO DE ACTIVIDAD DE PROTEASA (PU) - CON
SULFANILAMIDA-AZOCASEÍNA

El ensayo de azocaseína se basa en la hidrólisis de la azocaseína que libera el péptido con colorante azo en el sobrenadante en el que se detecta a 450 nm. Estos péptidos no pueden precipitarse mediante la adición de ácido, en comparación con la azocaseína no hidrolizada, la cual se precipita.

Sustrato: 0,25 % de azocaseína (Sigma **A2765**) disuelta en 50 mM de regulador de citrato de sodio, pH de 6.

Procedimiento: Se incuba 100 µl de solución de enzima con 250 µl de sustrato durante 30 minutos a 40 °C.

Se añade 50 µl 2 M de ácido tricloroacético, y la muestra se centrifuga a 10.000 rcf durante 5 minutos. Se transfiere 195 µl de sobrenadante a una placa de filtro de microtitulación (0,2 µm de membrana hidrofílica PVDF) y se añade 85 µl 1 M de NaOH. La muestra se filtra en otra placa de microtitulación mediante centrifugación a 2400 rcf durante 2 minutos. Se lee la OD 450 de la muestra filtrada.

La actividad de la muestra de enzima se mide en base a una curva de calibración obtenida mediante el análisis de diferentes diluciones de una proteasa comercial, Protex 14L (estandarizado a 150 PU/ml) y la construcción de una curva de calibración de OD₄₅₀ como una función de PU/g.

En una modalidad, preferentemente, la composición enzimática para usar en la presente invención tiene no más de aproximadamente 0,1 PU/ml.

En una modalidad, preferentemente, la composición enzimática para usar en la presente invención tiene no más de aproximadamente 0,04 PU/ml.

Ensayo de actividad de xilanasa

Se añade 25 µl, 50 µl, 75 µl y 100 µl de solución de enzima a 1,0 ml de alícuotas de regulador de ensayo y las mezclas se equilibran a 40,0 °C durante 5 minutos. Se añade una tableta XylaZyme (Megazyme cat núm. T-XYZ100) (p. ej., que contiene AZCL-arabinoxilano (trigo)) a cada tubo de ensayo y los tubos de ensayo no deben agitarse. Después de exactamente 10 minutos de incubación se añade 10 ml de solución de parada (1 % (p/v) tris(hidroximetil)-aminometano). Los tubos de ensayo se agitan y las soluciones se filtran a través de papel de filtro Whatman núm. 1.

La absorbancia a 590 nm de las muestras estándar y de prueba se mide contra una muestra de control sin enzima. Las concentraciones de enzimas estándar y de muestra se ajustan de manera que las densidades ópticas (OD, por sus siglas en inglés) a 590 nm se encuentren dentro del intervalo 0,2-1,1.

La enzima estándar es xilanasa de *Aspergillus niger*, Megazyme cat. núm. E-XYAN4.

Las OD₅₉₀ para enzimas estándar y de prueba se trazan contra los volúmenes de solución de enzima añadida. El mejor ajuste de curva se encuentra mediante el uso de la regresión lineal. Se calculan los volúmenes de enzimas estándar (V_{st}) y de prueba (V_t) que corresponden a una OD₅₉₀ de 0,7.

$$XU/g = \frac{ACT_{st} * V_{st} * D_t * A_{st}}{V_t * D_{st} * A_t}$$

en donde ACT_{st} = actividad de la preparación de enzima estándar, XU/g

D_t = dilución de muestra de prueba, ml

D_{st} = dilución de enzima estándar, ml

A_{st} = cantidad de enzima estándar, g

A_t = cantidad de muestra de prueba en g

V_{st} = volumen de lectura de enzima estándar en el eje x, µl

V_t = volumen de lectura de muestra de prueba en el eje x, µl

Una enzima es una xilanasas de acuerdo con la presente invención si en el ensayo de actividad de xilanasas de la presente descripción esta tiene al menos 100 unidades/ml

En una modalidad la separación del aceite crudo del lodo puede llevarse a cabo mediante clarificación. Como se usa en la presente descripción, "clarificación" se refiere al uso de

la gravedad para permitir que el aceite se sedimente fuera del lodo. Durante la clarificación el aceite se vuelve “claro”. La clarificación puede producirse entre aproximadamente 90 y 95 °C. Típicamente, se dejaría la mezcla
5 durante 1-3 horas para que se produzca el proceso de clarificación. Pueden usarse tanques de sedimentación grandes (denominados, clarificadores verticales) en donde el aceite crudo se sedimenta fuera del lodo. El aceite puede desnatarse del lodo. Con el lodo que sale, típicamente, de la parte
10 inferior de un clarificador vertical (este lodo se denomina, típicamente, “flujo inferior”). Como se usa en la presente descripción, “lodo” es una fracción pesada de extracto del fruto de la palma prensado que comprende aceite, agua y algo de material orgánico que tiene una tendencia a sedimentarse
15 fuera del extracto del fruto de la palma prensado. El lodo puede obtenerse después de la clarificación, por ejemplo después de la separación como se muestra en la Figura 1.

Pueden usarse mecanismos para mejorar la recuperación de aceite residual del lodo sedimentado (p. ej., después de la
20 clarificación). Por ejemplo, puede usarse una centrífuga para extraer aceite adicional del lodo. Típicamente, por lo tanto, el lodo puede enviarse a una centrífuga. Alternativamente, puede usarse un decantador en combinación con la clarificación. Por ejemplo, pueden usarse decantadores de 3

fases disponibles como “Westfalia Separator® topd 3-Phase Decanter” para separar el lodo del proceso de clarificación en 3 fases: una fase oleosa, sólidos y agua residual prácticamente libre de aceite. Alternativamente, pueden usarse
5 separadores de tipo boquilla, tal como el de GEA Westfalia, que separan el lodo de la etapa de clarificación en tres fases: aceite de palma, concentrado sólido y agua.

La separación del aceite crudo del lodo puede llevarse a cabo mediante centrifugación o decantación (p. ej., sin
10 clarificación). Los decantadores de 3 fases disponibles como “Westfalia Separator® topd 3-Phase Decanter” pueden usarse directamente con el extracto del fruto de la palma prensado tratado con enzimas sin la clarificación. Esto puede tener la ventaja de un tiempo de procesamiento más corto,
15 dimensiones más pequeñas de las líneas de proceso. Además, el riesgo de oxidación del aceite crudo es menos significativo en comparación con el proceso que usa clarificadores verticales. Tal decantador separa el lodo en 3 fases una fase oleosa, una torta de sólidos secos y agua
20 residual prácticamente libre de aceite. Puede usarse la centrifugación durante o después del proceso de decantación.

El método puede comprender, además, purificadores corriente abajo de la etapa de separación (p. ej., corriente abajo de la etapa de clarificación y/o decantación). Los

purificadores pueden eliminar incluso cantidades extremadamente pequeñas de aceite que queda en el efluente.

El método puede comprender, además, una etapa de desarenado, esta etapa elimina la arena para evitar problemas de erosión provocados por ella. La arena puede eliminarse
5 mediante cualquier método conocido por una persona con experiencia en la materia. Como la persona con experiencia en la materia apreciará, puede usarse un sistema multiciclón para separar la arena. Típicamente, la etapa de desarenado
10 puede producirse antes de la etapa de centrifugación.

El extracto del fruto de la palma prensado puede prepararse mediante la esterilización de los racimos del fruto de la palma frescos, la extracción del fruto de los racimos, opcionalmente, la digestión del fruto y el prensado.
15 La digestión puede realizarse en un digestor. Durante la digestión, el fruto de la palma se desintegra y el aceite se libera de la fibra. Después de la digestión, el aceite crudo se separa de la fibra al prensar los frutos digeridos.

El método de la presente invención puede incluir una o
20 más de las siguientes etapas después del prensado del fruto de la palma:

- Eliminar grandes particulados sólidos/fibras de curso del extracto del fruto de la palma, por ejemplo, esto puede lograrse al pasar el

extracto del fruto de la palma prensado a través de un tamiz que puede vibrar;

- Añadir agua extra al extracto del fruto de la palma prensado, por ejemplo, para reducir la viscosidad y mejorar la separación del aceite crudo de los otros componentes.

Estas etapas adicionales pueden realizarse antes de la clarificación y/o decantación.

En una modalidad, la enzima para usar en la presente invención se mezcla con uno o más frutos de la palma o una porción de ellos antes del prensado. En consecuencia, este(estos) fruto(s) de la palma o la porción de este(estos) se mezcla(n) con la enzima durante una etapa de digestión. En una modalidad, el fruto de la palma o la porción de este puede mezclarse con la enzima en un digestor. En otra modalidad, la enzima para usar en la presente invención puede mezclarse con el fruto de la palma o la porción de este digerido antes del prensado.

Como se usa en la presente descripción, el término “o una porción de este(estos)” en relación con el(los) fruto(s) de la palma se refiere a la parte de los frutos de la palma que permanece después de la extracción del fruto de los racimos.

En una modalidad, el fruto de la palma o una porción de este o el extracto del fruto de la palma pueden ser uno que

tenga un contenido de diglicérido de aproximadamente 3 % p/p a aproximadamente 8 % p/p.

En otra modalidad, la enzima para usar en la presente invención puede mezclarse con el extracto del fruto de la palma
5 prensado antes de separar el aceite de palma crudo del lodo (p. ej., mediante clarificación o decantación o centrifugación).

En una modalidad, la enzima para usar en la presente invención puede mezclarse con el extracto del fruto de la palma prensado durante la etapa de separación, por ejemplo,
10 cuando el aceite de palma crudo se separa del lodo (p. ej., mediante clarificación o centrifugación). Particularmente, en una modalidad la enzima para usar en la presente invención puede mezclarse con el extracto del fruto de la palma prensado durante la clarificación (p. ej., en el tanque de
15 clarificación).

El término “extracto del fruto de la palma prensado” se conoce, además, en la industria como “líquido prensado” o “aceite prensado”. Para evitar dudas, el término extracto del fruto de la palma prensado no es un aceite de palma crudo o
20 aceite de palma semicrudo y, típicamente, no se ha desgomado con enzimas o agua. Un aceite de palma crudo es el aceite resultante que se purifica y se seca antes del envío a las plantas de refinación/desgomado.

El aceite de palma crudo tiene tres componentes principales, que son una mezcla de aceite y agua, emulsiones aceite en agua y emulsiones agua en aceite. Un aceite de palma crudo se separa, típicamente, en aceite puro y lodo en una estación de clarificación (Stork et al 1996 (la cual se hace referencia en la Tesis de Maestría:

SEPARATION TECHNIQUE OF CRUDE PALM OIL AT CLARIFICATION AREA VIA OPTIMUM PARAMETERS NURULHUDA BINTI KASIM. Una tesis presentada en cumplimiento del requisito para la obtención del grado de Bachiller de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería de Recursos Naturales y Químicos, Universidad de Malasia Pahang, abril 2009), cuyo contenido se incorpora en la presente descripción como referencia). Una composición media aproximada de aceite de palma crudo prensado con tornillo podría ser 64 % de aceite, 24 % de agua y 12 % de sólidos sin aceite (Maycock et al (1987) Palm Oil Factory Process Handbook parte 1, PORIM, Bangi, cuyo contenido se incorpora en la presente descripción como referencia). Sin desear estar limitados por la teoría, el examen de muestras de lodo revela, típicamente, la presencia de gotitas de aceite de tamaños que varían desde menos de 1 μm . La diferencia en la gravedad específica entre lodo y aceite es, prácticamente, contraponedor a 0,1 a lo largo de todo el intervalo de temperatura de 40 °C a 100 °C (Stork et al 1996). La mayor impureza sólida que se separará es la fibra y la más pequeña es el residuo celular.

Nuevamente sin desear estar limitados por la teoría, debido a la alta relación de sólidos a aceite y la baja relación de agua a sólidos en el aceite crudo de una prensa de tornillo, se añade agua para mejorar la eficacia de sedimentación. Sin
5 desear estar limitados por la teoría, se cree que la viscosidad aumenta con la cantidad de agua añadida hasta 50 % de dilución y más allá de este punto, la viscosidad cae continuamente con mayor dilución pero de manera menos abrupta.

El extracto del fruto de la palma prensado de acuerdo con
10 la presente invención es un compuesto que contiene: aceite, agua y sólidos sin aceite (que comprende lignina, carbohidratos, proteínas y sólidos inorgánicos). La mezcla es una emulsión de aceite en agua de la cual se separa el aceite.

El extracto del fruto de la palma prensado comprende,
15 típicamente, aproximadamente 64 % de aceite, 24 % de agua y 12 % de sólidos sin aceite (que comprenden lignina, carbohidratos, proteínas y sólidos inorgánicos). Será del conocimiento de una persona con experiencia en la materia que los niveles de cada uno de estos componentes en el extracto del
20 fruto de la palma prensado pueden variar en función de los frutos de palma iniciales usados, que varían de acuerdo al lugar y año de la cosecha, así como, por ejemplo, la cantidad de agua en el fruto. Sin desear estar limitados por la teoría, la cantidad de agua en el fruto puede variar en función de si
25 las condiciones climáticas son húmedas o secas durante la

cosecha, por ejemplo. Sin embargo, el extracto del fruto de la palma prensado de acuerdo con la presente invención tiene, típicamente, entre 60 y 85 % de aceite. Sin embargo, la persona con experiencia en la materia apreciará, además, que el contenido de aceite en el extracto del fruto de la palma prensado puede variar, por ejemplo, cuando se aumenta el contenido de agua. Por lo tanto, en algunas modalidades, por ejemplo, cuando se inyecta vapor en el digestor para elevar las temperaturas el contenido de agua puede ser mayor y el contenido de aceite menor. El extracto del fruto de la palma prensado de acuerdo con la presente invención puede tener un nivel relativamente alto de sólidos sin aceite (que se encuentra, típicamente, en la región de 5-15 % p/p). En algunos casos el nivel de sólidos sin aceite puede ser al menos más de 5 % p/p del extracto del fruto de la palma prensado.

Típicamente, 7-10 % p/p (p. ej., 8,5 % p/p) del total de sólidos sin aceite en el extracto del fruto de la palma prensado es proteína. Por lo tanto, en una modalidad la presente invención se refiere a un extracto del fruto de la palma (p. ej., un extracto del fruto de la palma prensado) que comprende al menos 7 % p/p (convenientemente al menos 8,4 % p/p) del total de sólidos sin aceite.

En algunas modalidades, la presente invención se refiere a un extracto del fruto de la palma (p. ej., un extracto del fruto de la palma prensado) que comprende de al

menos aproximadamente 6,5 % a aproximadamente 12 % p/p del total de sólidos sin aceite.

Aproximadamente, 0,5-2 % p/p (típicamente, aproximadamente 1 % p/p) del total de extracto de palma prensado es proteína.

5 Por lo tanto, en una modalidad la presente invención se refiere a un extracto del fruto de la palma (p. ej., un extracto del fruto de la palma prensado) que comprende al menos 0,5 %, preferentemente, al menos 1 % p/p de proteína.

Para evitar dudas, el extracto de palma crudo contiene
10 aproximadamente 99 % p/p de aceite debido a que casi la totalidad de los sólidos sin aceite se ha eliminado. En una modalidad, el contenido de fósforo no hidratable del extracto del fruto de la palma (p. ej., el extracto del fruto de la palma prensado) es menor que 45 ppm,
15 preferentemente, menor que 30 ppm.

En algunas modalidades, el contenido de fósforo no hidratable puede considerarse como equivalente a fosfolípidos no hidratables. Por lo tanto, en algunas modalidades, el fósforo no hidratable en el contenido de fosfolípidos no
20 hidratables del extracto del fruto de la palma (p. ej., el extracto del fruto de la palma prensado) puede ser menor que 45 ppm, preferentemente, menor que 30 ppm.

La incubación de la mezcla de enzima y extracto del fruto de la palma de acuerdo con la presente invención puede
25 realizarse en aproximadamente 45 °C a aproximadamente 95 °C.

En una modalidad, la incubación puede producirse en aproximadamente 50 °C a aproximadamente 90 °C. En otra modalidad, la incubación puede producirse en aproximadamente 50 °C a aproximadamente 85 °C. En consecuencia, la incubación puede producirse en aproximadamente 50 °C a aproximadamente 60 °C.

En consecuencia, la incubación puede producirse a aproximadamente 50 °C.

La incubación de la enzima y el extracto del fruto de la palma de acuerdo con la presente invención puede producirse durante entre aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 6 horas.

En una modalidad, la incubación se produce durante entre aproximadamente 2 horas a aproximadamente 6 horas. En otra modalidad, la incubación se produce durante entre aproximadamente 2 horas a aproximadamente 4 horas.

En consecuencia, el mezclado se produce durante aproximadamente 2 horas.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado comúnmente entendido por una persona con conocimiento ordinario en la materia a la cual pertenece esta descripción. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 20 ED., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale & Marham, THE HARPER COLLINS

DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a un experimentado en la materia un diccionario general de muchos de los términos usados en esta descripción.

Esta descripción no se limita por los métodos y materiales ilustrativos descritos en la presente descripción, y cualquier método y material similar o equivalente a aquellos descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o pruebas de las modalidades de esta descripción. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique de cualquier otra manera, cualquier secuencia de ácido nucleico se escribe de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi, respectivamente.

Los títulos proporcionados en la presente descripción no limitan los diversos aspectos o modalidades de esta descripción y pueden usarse como referencia a la especificación general. En consecuencia, los términos definidos más abajo se definen con mayor detalle como referencia a la especificación en general.

En la presente descripción se hace referencia a los aminoácidos por medio del nombre del aminoácido, la abreviatura de tres letras o la abreviatura de una sola letra.

El término "proteína", como se usa en la presente descripción, incluye proteínas, polipéptidos y péptidos.

Como se usa en la presente descripción, el término “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “polipéptido” y/o del término “proteína”. En algunos casos, el término “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “péptido”. En algunos casos, el término “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “enzima”.

Los términos “proteína” y “polipéptido” se usan indistintamente en la presente descripción. En la presente descripción y en las reivindicaciones, pueden usarse los códigos convencionales de una letra y de tres letras para los residuos de aminoácidos. El código de 3 letras para los aminoácidos es el que se define de acuerdo con IUPACIUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). Se entiende, además, que un polipéptido puede estar codificado por más de una secuencia de nucleótidos debido a la redundancia del código genético.

Pueden encontrarse otras definiciones de términos en toda la especificación. Antes de describir las modalidades ilustrativas con mayor detalle, debe entenderse que esta descripción no se limita a las modalidades particulares descritas, porque estas, evidentemente, pueden variar. Además, se entiende que la terminología usada en la presente descripción está prevista para describir modalidades particulares solamente, y no como una limitación, ya que el

alcance de la presente descripción estará limitado solamente por las reivindicaciones anexas.

Se entiende que cuando se proporciona un intervalo de valores, se describe específicamente, además, cada valor
5 interviniente hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo. Cada intervalo menor entre cualquier valor mencionado o valor interviniente en un intervalo mencionado y
10 cualquier otro valor mencionado o interviniente en ese intervalo mencionado queda abarcado dentro de esta descripción. Los límites superior e inferior de estos intervalos menores pueden incluirse o excluirse independientemente en el intervalo, y cada intervalo en el cual alguno, ninguno o ambos
15 límites se incluyen en los intervalos menores está comprendido, además, dentro de esta descripción, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo mencionado. Cuando el intervalo mencionado incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen alguno o los dos límites incluidos
20 están comprendidos, además, en esta descripción.

Debe mencionarse que, tal como se usa en la presente descripción y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares “un”, “uno/una” y “el/la” incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo

contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a “una enzima” incluye una pluralidad de estos agentes candidato y equivalentes de estos conocidos por los experimentados en la materia, etc.

5 Las publicaciones descritas en la presente descripción se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada de lo descrito en la presente descripción se interpretará como una admisión de que dichas publicaciones constituyen una materia anterior a
10 las reivindicaciones anexas a la presente descripción.

El término “transferasa”, como se usa en la presente descripción, es intercambiable con el término “lípidido aciltransferasa”.

En consecuencia, la lípidido aciltransferasa como se define
15 en la presente descripción cataliza una transesterificación.

El término “interesterificación” se refiere a la transferencia catalizada por enzimas de grupos acilo entre un lípidido donante y un lípidido aceptor, en donde el lípidido donante no es un grupo acilo libre.

20 El término “transesterificación”, como se usa en la presente descripción, se refiere a la transferencia catalizada por enzimas de un grupo acilo desde un lípidido donante (que no sea un ácido graso libre) hasta un acilo aceptor (que no sea agua).

Como se usa en la presente descripción, el término “alcohólisis” se refiere al clivaje enzimático de un enlace covalente de un ácido derivado por la reacción con un alcohol ROH de manera que uno de los productos se combine con el H del alcohol y el otro producto se combine con el grupo OR del alcohol.

Como se usa en la presente descripción, el término “alcohol” se refiere a un compuesto alquilo que contiene un grupo hidroxilo.

Como se usa en la presente descripción, el término “hidrólisis” se refiere a la transferencia catalizada por enzimas de un grupo acilo desde un lípido hasta el grupo OH de una molécula de agua.

Lípido aciltransferasa

La secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede codificar una lípido aciltransferasa natural o una lípido aciltransferasa variante.

La lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa natural o una lípido aciltransferasa variante.

Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para usar en la presente invención puede ser una como se describe en las patentes núm. WO 2004/064537,

WO 2004/064987, WO 2005/066347, WO 2006/008508, WO 2009/024862, WO2011/061657, o WO2011/061657. Estos documentos se incorporan en la presente descripción como referencia.

Como se usa en la presente descripción, el término
5 “lípidido aciltransferasa” se refiere, preferentemente, a una enzima que tiene actividad de aciltransferasa (generalmente clasificada como E.C. 2.3.1.x, por ejemplo 2.3.1.43), por lo cual la enzima es capaz de transferir un grupo acilo de un
10 los siguientes: un esteroles; un estanol; un carbohidrato; una proteína; una subunidad de proteína; un alcohol de azúcar, tal como ácido ascórbico y/o glicerol, preferentemente, glicerol y/o un esteroles, tal como colesterol.

Preferentemente, la lípidido aciltransferasa para usar en
15 cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípidido aciltransferasa que tiene la capacidad de transferir un grupo acilo de un fosfolípido (tal como se define en la presente invención) a un alcohol de azúcar, tal como ácido ascórbico y/o glicerol y/o un esteroles,
20 preferentemente, glicerol o un esteroles, con la máxima preferencia, un esteroles (p. ej., colesterol).

En consecuencia, la lípidido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención es una lípidido aciltransferasa que es capaz de transferir un grupo
25 acilo de un fosfolípido (tal como se define en la presente

descripción) a un fitosterol y/o un fitostanol. En consecuencia, la lípido aciltransferasa puede ser una que es capaz de transferir un grupo acilo de un fosfolípido (tal como se define en la presente descripción) a un fitosterol.

5 Preferentemente, el fitosterol y/o el fitostanol comprenden una o más de las siguientes características estructurales:

- i) un grupo hidroxilo 3-beta o un grupo hidroxilo 3-alfa; y/o
- 10 ii) los anillos A:B en la posición *cis* o los anillos A:B en la posición *trans* o C₅-C₆ es insaturado.

En una modalidad, preferentemente, el fitosterol se selecciona del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: alfa-sitosterol, beta-sitosterol, estigmasterol, ergosterol, campesterol, 5,6-dihidrosterol, brassicasterol, 15 alfa-espinasterol, beta-espinasterol, gamma-espinasterol, deltaspinasterol, fucosterol, dimosterol, ascosterol, serebisterol, episterol, anasterol, avenasterol, clionasterol, hiposterol, condrilasterol, desmosterol, calinosterol, 20 poriferasterol, clionasterol, glucósidos de esterol y otras formas isoméricas naturales o sintéticas y derivados.

En una modalidad, preferentemente, el fitostanol se selecciona del grupo que consiste en uno o más de los siguientes: alfa-sitostanol, beta-sitostanol, estigmastanol, 25 ergostanol, campestanol, 5,6-dihidrostanol, brassicastanol,

alfa-espinaanol, beta- espinaanol, gamma-espinaanol, deltaspinastanol, fucostanol, dimostanol, ascostanol, serebistanol, epistanol, anastanol, avenastanol, clionastanol, hipostanol, condriastanol, desmostanol, calinastanol, poriferastanol, clionastanol, glucósidos de estanol y otras formas isoméricas naturales o sintéticas y derivados.

En consecuencia, los fitostanoles para usar en la presente invención pueden obtenerse a partir de la hidrogenación de esteroides (ver la patente de los Estados Unidos núm. 6.866.837, por ejemplo).

Para algunos aspectos el “aceptor de acilo” de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier compuesto que comprende un grupo hidroxilo (-OH), tal como, por ejemplo, alcoholes polivalentes, que incluyen glicerina; esteroides; estanoles; carbohidratos; hidroxiaácidos que incluyen ácidos de frutas, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido láctico y ácido ascórbico; proteínas o una subunidad de estas, tales como aminoácidos, hidrolizados de proteínas y péptidos (proteína hidrolizada parcialmente), por ejemplo; y mezclas y derivados de estos. Preferentemente, el “aceptor acilo” de acuerdo con la presente invención no es agua. Preferentemente, el “aceptor acilo” de acuerdo con la presente invención es un alcohol de azúcar, tal como un poliol, con la máxima preferencia, glicerol. Para el

propósito de la presente invención el ácido ascórbico se considera, además, un alcohol de azúcar.

Preferentemente, el aceptor acilo no es un monoglicérido.

Preferentemente, el aceptor acilo no es un diglicérido.

5 En un aspecto la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede, y tiene la capacidad de, transferir un grupo acilo de un lípido a glicerol, adicionalmente, tiene la capacidad de transferir el grupo
10 acilo de un lípido a uno o más de los siguientes: un carbohidrato, una proteína, una subunidad proteica, esteroil y/o un estanol, preferentemente, tiene la capacidad de transferir ambos en un alcohol de azúcar, tal como ácido ascórbico y/o glicerol, con la máxima preferencia, un esteroil,
15 tal como colesterol, y/o esteroides/estanoles vegetales.

En algunos aspectos la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que tiene la capacidad de esterificarse al menos aproximadamente 10 %, con mayor preferencia, al menos aproximadamente 20 %, 30 %, 20
40 %, 50 %, 60 % o 70 % del aceptor acilo.

Preferentemente, el sustrato lipídico sobre el que actúa la lípido aciltransferasa es uno o más de los siguientes lípidos: un fosfolípido, tal como una lecitina, por ejemplo, fosfatidilcolina y/o fosfatidiletanolamina.
25

Este sustrato lipídico puede denominarse en la presente descripción como “donante de acilo lipídico”. El término lecitina, como se usa en la presente descripción, abarca fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol,
5 fosfatidilserina y fosfatidilglicerol.

Para algunos aspectos la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es, preferentemente, una lípido aciltransferasa que no tiene la capacidad, o es sustancialmente incapaz, de actuar en un
10 triglicérido y/o un 1-monoglicérido y/o 2-monoglicérido.

Para algunos aspectos, preferentemente, la lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que no muestra actividad de triacilglicerol lipasa (E.C. 3.1.1.3) o
15 no muestra actividad significativa de triacilglicerol lipasa (E.C. 3.1.1.3). El término “no muestra actividad significativa de triacilglicerol lipasa” significa que tiene, preferentemente, menos de 2,5 LUS/mg de enzima, con mayor preferencia, menos de 2,0 LUS/mg de enzima, tal como se
20 determina mediante el uso del ensayo de titulación modificado para el aceite de girasol y un pH de 5,5 en lugar de aceite de oliva y un pH de 6,5 como se detalla a continuación.

La actividad de triacilglicerol puede medirse mediante el uso de un ensayo de titulación de acuerdo con Food Chemical

Codex (3.^a Ed., 1981, págs. 492-493) modificado para el aceite de girasol y un pH de 5,5 en lugar de aceite de oliva y un pH de 6,5. La actividad de lipasa se mide como LUS (unidades de lipasa de girasol, por sus siglas en inglés), en donde 1 LUS se
5 define como la cantidad de enzima que puede liberar 1 μ mol de ácidos grasos por minuto de aceite de girasol en las condiciones de ensayo.

En consecuencia, la lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención es una
10 lípido aciltransferasa que puede mostrar una o más de las siguientes actividades de fosfolipasa: actividad de fosfolipasa A2 (E.C. 3.1.1.4) y/o actividad de fosfolipasa A1 (E.C. 3.1.1.32). La lípido aciltransferasa puede tener, además, actividad de la fosfolipasa B (E.C 3.1.1.5).

15 En consecuencia, para algunos aspectos la lípido aciltransferasa puede tener la capacidad de transferir un grupo acilo de un fosfolípido a un alcohol de azúcar, preferentemente, glicerol y/o ácido ascórbico.

En consecuencia, para algunos aspectos la lípido
20 aciltransferasa puede tener la capacidad de transferir un grupo acilo un fosfolípido a un estanol y/o estero, preferentemente, colesterol.

Para algunos aspectos la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención
25 codifica, preferentemente, una lípido aciltransferasa que

tiene la capacidad de transferir un grupo acilo de un fosfolípido a un esterol y/o un estanol para formar al menos un éster de esterol y/o un éster de estanol.

La lípido aciltransferasa puede tener la capacidad de transferir un grupo acilo de un lípido a un poliol, tal como glicerol y/o un esterol, tal como colesterol o esterol/estanoles vegetales. Por lo tanto, en una modalidad el “aceptor acilo” de acuerdo con la presente invención puede ser glicerol y/o colesterol o esterol/estanoles vegetales.

En algunos aspectos la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede comprender un motivo GDSx y/o un motivo GANDY.

Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa se caracteriza como una enzima que tiene actividad aciltransferasa y que comprende el motivo GDSX de la secuencia de aminoácidos, en donde X es uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.

En consecuencia, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa o lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención puede ser obtenible, preferentemente, obtenida a partir de un organismo de uno o más de los siguientes géneros: *Aeromonas*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Lactococcus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Desulfitobacterium*, *Bacillus*, *Campylobacter*, *Vibrionaceae*, *Xylella*, *Sulfolobus*, *Aspergillus*,

Schizosaccharomyces, *Listeria*, *Neisseria*, *Mesorhizobium*, *Ralstonia*, *Xanthomonas* y *Candida*. Preferentemente, la lípido aciltransferasa es obtenible, preferentemente, obtenida de un organismo del género *Aeromonas*.

5 En algunos aspectos de la presente invención, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención codifica una lípido aciltransferasa que comprende un residuo de ácido aspártico en una posición
10 correspondiente a N-80 en la secuencia de aminoácidos de la lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* que se muestra como la sec. con núm. de ident. 34.

 En algunos aspectos de la presente invención, la lípido aciltransferasa para usar cualquier método y/o usos de la
15 presente invención es una lípido aciltransferasa que comprende un residuo de ácido aspártico en una posición correspondiente a N-80 en la secuencia de aminoácidos de la lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* que se muestra como la sec. con núm. de ident. 34.

20 Adicionalmente o alternativamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm.
25 de ident. 16 o una secuencia de aminoácidos que tiene 75 % o

más de homología con esta. En consecuencia, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 16.

5 Adicionalmente o alternativamente, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 68 o una secuencia de aminoácidos que tiene 75 % o
10 más de homología con esta. En consecuencia, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa codifica una lípido aciltransferasa que puede comprender la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 68.

15 En una modalidad, la lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 16 o sec. con núm. de ident. 68 o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de
20 identidad con esta, preferentemente, al menos 80 %, preferentemente, al menos 85 %, preferentemente, al menos 95 %, preferentemente, al menos 98 % de identidad con esta.

 En una modalidad, la lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención tiene una
25 secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de

ident. 68 o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad con esta, preferentemente, al menos 80 %, preferentemente, al menos 85 %, preferentemente, al menos 95 %, preferentemente, al menos 98 % de identidad con esta.

5 En una modalidad, la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 121 o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad con esta,
10 preferentemente, al menos 80 %, preferentemente, al menos 85 %, preferentemente, al menos 95 %, preferentemente, al menos 98 % de identidad con esta.

 En otra modalidad, la lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención tiene una
15 secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 122 o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad con esta, preferentemente, al menos 80 %, preferentemente, al menos 85 %, preferentemente, al menos 95 %, preferentemente, al menos 98 % de identidad con esta.

20 En una modalidad, la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 123 o tiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75 % de identidad con esta,
25 preferentemente, al menos 80 %, preferentemente, al menos

85 %, preferentemente, al menos 95 %, preferentemente, al menos 98 % de identidad con esta.

Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa se puede caracterizar con el uso del siguiente criterio:

- 5 la enzima tiene actividad de aciltransferasa que puede definirse como la actividad de transferencia de ésteres con lo cual la parte acilo de una unión éster original de un donante de acilo lipídico se transfiere a un aceptor acilo, preferentemente, glicerol o colesterol
- 10 para formar un éster nuevo; y
- la enzima comprende el motivo GDSX de la secuencia de aminoácidos, en donde X es uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S.
- 15 Preferentemente, X del motivo GDSX es L o Y. Con mayor preferencia, X del motivo GDSX es L. Por lo tanto, preferentemente, la enzima de acuerdo con la presente invención comprende el motivo GDSL de secuencia de aminoácidos.

- El motivo GDSX se compone de cuatro aminoácidos
- 20 conservados. Preferentemente, la serina en el motivo es una serina catalítica de la enzima lípido aciltransferasa. En consecuencia, la serina del motivo GDSX puede estar en una posición correspondiente a Ser-16 en la enzima lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* que se enseña en

Brumlik & Buckley (Journal of Bacteriology, abril de 1996, vol. 178, núm. 7, págs. 2060-2064).

Para determinar si una proteína tiene el motivo GDSX de acuerdo con la presente invención, la secuencia se compara,
5 preferentemente, con los perfiles del modelo oculto de Markov (perfiles HMM) de la base de datos Pfam, de acuerdo con los procedimientos que se enseñan en las patentes núm. WO 2004/064537 o WO 2004/064987, que se incorporan en la presente descripción como referencia.

10 Preferentemente, la enzima lípido aciltransferasa puede alinearse mediante el uso de la secuencia consenso Pfam00657 (para una explicación completa, ver las patentes núm. WO 2004/064537 o WO 2004/064987).

Preferentemente, una coincidencia positiva con el perfil
15 del modelo oculto de Markov (perfil HMM) de la familia del dominio pfam00657 indica la presencia del dominio GDSL o GDSX de acuerdo con la presente invención.

Preferentemente, cuando se alinea con la secuencia consenso Pfam00657, la lípido aciltransferasa para usar en los
20 métodos o usos de la presente invención puede tener al menos uno, preferentemente, más de uno, preferentemente, más de dos, de los siguientes, un bloque GDSx, un bloque GANDY, un bloque HPT. En consecuencia, la lípido aciltransferasa puede tener un bloque GDSx y un bloque GANDY. Alternativamente, la enzima
25 puede tener un bloque GDSx y un bloque HPT. Preferentemente, la

enzima comprende al menos un bloque GDSx. Ver las patentes núm. WO 2004/064537 o WO 2004/064987 para más detalles.

Preferentemente, los residuos del motivo GANDY se seleccionan de GANDY, GGND A, GGNDL, con la máxima
5 preferencia, GANDY.

Preferentemente, cuando se alinea con la secuencia consenso Pfam00657 la enzima para usar en los métodos o usos de la presente invención tiene al menos una, preferentemente, más de una, preferentemente, más de dos,
10 preferentemente, más de tres, preferentemente, más de cuatro, preferentemente, más de cinco, preferentemente, más de seis, preferentemente, más de siete, preferentemente, más de ocho, preferentemente, más de nueve, preferentemente, más de diez, preferentemente, más de once, preferentemente, más
15 de doce, preferentemente, más de trece, preferentemente, más de catorce, de los siguientes residuos de aminoácidos en comparación con la secuencia de referencia polipéptidos de *A. hydrophilia*, particularmente, la sec. con núm. de ident. 1: 28His, 29His, 30His, 31His, 32Gly, 33Asp, 34Ser, 35His,
20 130His, 131Gly, 132His, 133Asn, 134Asp, 135His, 309His.

El dominio GDSX pfam00657 es un identificador único que distingue las proteínas que tienen este dominio de otras enzimas.

La secuencia consenso pfam00657 se presenta en la
25 Figura 5 como la sec. con núm. de ident. 2. Esto se deriva

de la identificación de la familia 00657 de pfam, versión 6 de la base de datos, que en la presente invención se puede denominar, además, pfam00657.6.

La secuencia consenso puede actualizarse mediante el uso de liberaciones adicionales de la base de datos Pfam (p. ej., ver las patentes núm. WO 2004/064537 o WO 2004/064987).

En una modalidad, la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede caracterizarse mediante el uso de los siguientes criterios:

- (i) la enzima tiene actividad de aciltransferasa que puede definirse como la actividad de transferencia de ésteres por lo cual la parte acilo de una unión éster original de un donante de acilo lipídico se transfiere a un aceptor acilo, preferentemente, glicerol o colesterol, para formar un éster nuevo, preferentemente, monoglicérido o éster de colesterol, respectivamente;
- (ii) la enzima comprende el motivo GDSX de secuencia de aminoácidos, en donde X es uno o más de los siguientes residuos de aminoácidos L, A, V, I, F, Y, H, Q, T, N, M o S;
- (iii) la enzima comprende His-309 o comprende un residuo de histidina en una posición

correspondiente a His-309 en la enzima lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* que se muestra en las Figuras 4 y 6 (sec. con núm. de ident. 1 o sec. con núm. de ident. 3).

5 Preferentemente, el residuo de aminoácidos del motivo GDSX es L.

En la sec. con núm. de ident. 3 o la sec. con núm. de ident. 1 los primeros 18 residuos de aminoácidos forman una secuencia señal. La His-309 de la secuencia de longitud
10 total, que es la proteína que incluye la secuencia señal, equivale a la His-291 de la parte madura de la proteína, es decir, la secuencia sin la secuencia señal.

En una modalidad, la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y usos de la presente invención es
15 una lípido aciltransferasa que comprende la siguiente triada catalítica: Ser-34, Asp-306 y His-309 o comprende un residuo de serina, un residuo de ácido aspártico y un residuo de histidina, respectivamente, en las posiciones correspondientes a Ser-34, Asp-306 y His-309 en la enzima
20 lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* que se muestra en la Figura 6 (sec. con núm. de ident. 3) o en la Figura 4 (sec. con núm. de ident. 1). Como se indicó anteriormente, en la secuencia que se muestra en la sec. con núm. de ident. 3 o la sec. con núm. de ident. 1 los primeros
25 18 residuos de aminoácidos forman una secuencia señal. Ser-

34, Asp-306 y His-309 de la secuencia de longitud total, que es la proteína que incluye la secuencia señal, equivale a Ser-16, Asp-288 y His-291 de la parte madura de la proteína, es decir, la secuencia sin la secuencia señal. En la
5 secuencia consenso pfam00657, como se muestra en la Figura 5 (sec. con núm. de ident. 2), los residuos del sitio activo corresponden a Ser-7, Asp-345 y His-348.

En una modalidad la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente
10 invención es una lípido aciltransferasa que se puede caracterizar con el uso del siguiente criterio:

la enzima tiene actividad de aciltransferasa que puede definirse como la actividad de transferencia de ésteres con lo cual la parte acilo de una unión éster original
15 de un primer donante de acilo lipídico se transfiere a un aceptor acilo para formar un éster nuevo; y
la enzima comprende al menos Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-134 y His-309 o comprende residuos de glicina, ácido aspártico, serina, ácido aspártico e histidina en
20 las posiciones correspondientes a Gly-32, Asp-33, Ser-34, Asp-306 y His-309, respectivamente, en la enzima lípido aciltransferasa de *Aeromonas hydrophila* que se muestra en la sec. con núm. de ident. 3 o la sec. con núm. de ident. 1.

En consecuencia, la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención puede codificarse por una de las siguientes secuencias de nucleótidos:

- 5 (a) la secuencia de nucleótidos que se muestra
 como la sec. con núm. de ident. 36;
- (b) la secuencia de nucleótidos que se muestra
 como la sec. con núm. de ident. 39;
- (c) la secuencia de nucleótidos que se muestra
10 como la sec. con núm. de ident. 42;
- (d) la secuencia de nucleótidos que se muestra
 como la sec. con núm. de ident. 44;
- (e) la secuencia de nucleótidos que se muestra
 como la sec. con núm. de ident. 46;
- 15 (f) la secuencia de nucleótidos que se muestra
 como la sec. con núm. de ident. 48;
- (g) la secuencia de nucleótidos que se muestra
 como la sec. con núm. de ident. 49;
- (h) la secuencia de nucleótidos que se muestra
20 como la sec. con núm. de ident. 50;
- (i) la secuencia de nucleótidos que se muestra
 como la sec. con núm. de ident. 51;
- (j) la secuencia de nucleótidos que se muestra
 como la sec. con núm. de ident. 52;

- (k) la secuencia de nucleótidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 53;
- (l) la secuencia de nucleótidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 54;
- 5 (m) la secuencia de nucleótidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 55;
- (n) la secuencia de nucleótidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 56;
- (o) la secuencia de nucleótidos que se muestra
10 como la sec. con núm. de ident. 57;
- (p) la secuencia de nucleótidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 58;
- (q) la secuencia de nucleótidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 59;
- 15 (r) la secuencia de nucleótidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 60;
- (s) la secuencia de nucleótidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 61;
- (t) la secuencia de nucleótidos que se muestra
20 como la sec. con núm. de ident. 62;
- (u) la secuencia de nucleótidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 63;
- (v) o
- una secuencia de nucleótidos que tiene 70 % o más,
25 preferentemente, 75 % o más de identidad con cualquier

secuencia que se muestran como sec. con núm. de ident. 36, sec. con núm. de ident. 39, sec. con núm. de ident. 42, sec. con núm. de ident. 44, sec. con núm. de ident. 46, sec. con núm. de ident. 48, sec. con núm. de ident. 49, sec. con núm. de ident. 50, sec. con núm. de ident. 51, sec. con núm. de ident. 52, sec. con núm. de ident. 53, sec. con núm. de ident. 54, sec. con núm. de ident. 55, sec. con núm. de ident. 56, sec. con núm. de ident. 57, sec. con núm. de ident. 58, sec. con núm. de ident. 59, sec. con núm. de ident. 60, sec. con núm. de ident. 61, sec. con núm. de ident. 62 o sec. con núm. de ident. 63.

En consecuencia, la secuencia de nucleótidos puede tener 80 % o más, preferentemente, 85 % o más, con mayor preferencia, 90 % o más y, aún con mayor preferencia, 95 % o más de identidad con cualquier secuencia que se muestran como sec. con núm. de ident. 36, sec. con núm. de ident. 39, sec. con núm. de ident. 42, sec. con núm. de ident. 44, sec. con núm. de ident. 46, sec. con núm. de ident. 48, sec. con núm. de ident. 49, sec. con núm. de ident. 50, sec. con núm. de ident. 51, sec. con núm. de ident. 52, sec. con núm. de ident. 53, sec. con núm. de ident. 54, sec. con núm. de ident. 55, sec. con núm. de ident. 56, sec. con núm. de ident. 57, sec. con núm. de ident. 58, sec. con núm. de ident. 59, sec. con núm. de ident. 60, sec. con núm. de ident. 61, sec. con núm. de ident. 62 o sec. con núm. de ident. 63.

En una modalidad, la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y usos de la presente invención es una secuencia de nucleótidos que tiene 70 % o más, preferentemente, 75 % o más de identidad con cualquier secuencia que se muestran como: sec. con núm. de ident. 49, sec. con núm. de ident. 50, sec. con núm. de ident. 51, sec. con núm. de ident. 62 y sec. con núm. de ident. 63. En consecuencia, la secuencia de nucleótidos puede tener 80 % o más, preferentemente, 85 % o más, con mayor preferencia, 90 % o más y, aún con mayor preferencia, 95 % o más de identidad con cualquier secuencia que se muestran como: sec. con núm. de ident. 49, sec. con núm. de ident. 50, sec. con núm. de ident. 51, sec. con núm. de ident. 62 y sec. con núm. de ident. 63.

En una modalidad la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y usos de la presente invención es una secuencia de nucleótidos que tiene 70 % o más, 75 % o más, 80 % o más, preferentemente, 85 % o más, con mayor preferencia, 90 % o más y, aún con mayor preferencia, 95 % o más de identidad con la secuencia que se muestra como la sec. con núm. de ident. 49.

En consecuencia, la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- (i) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 3
- (ii) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 4
- 5 (iii) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 5
- (iv) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 6
- (v) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 7
- 10 (vi) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 8
- (vii) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 9
- 15 (viii) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 10
- (ix) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 11
- (x) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 12
- 20 (xi) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 13
- (xii) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 14

- (xiii) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 1
- (xiv) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 15
- 5 (xv) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 16
- (xvi) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 17
- (xvii) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 18
- 10 (xviii) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 19
- (xix) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 26
- 15 (xx) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 27
- (xxi) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 28
- (xxii) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 29
- 20 (xxiii) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 30
- (xxiv) la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 31

- (xxv) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 32
- (xxvi) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 33
- 5 (xxvii) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 34
- (xxviii) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 35
- (xxix) la secuencia de aminoácidos que se muestra
10 como la sec. con núm. de ident. 37
- (xxx) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 38
- (xxxi) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 40
- 15 (xxxii) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 41
- (xxxiii) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 43
- (xxxiv) la secuencia de aminoácidos que se muestra
20 como la sec. con núm. de ident. 45
- (xxxv) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 47
- (xxxvi) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 48

- (xxxvii) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 68
- (xxxviii) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 121
- 5 (xxxix) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 122
- (xl) la secuencia de aminoácidos que se muestra
como la sec. con núm. de ident. 123 o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o más de identidad con cualquier secuencia
10 que se muestran como sec. con núm. de ident. 1, sec. con
núm. de ident. 3, sec. con núm. de ident. 4, sec. con núm.
de ident. 5, sec. con núm. de ident. 6, sec. con núm. de
ident. 7, sec. con núm. de ident. 8, sec. con núm. de ident.
15 9, sec. con núm. de ident. 10, sec. con núm. de ident. 11,
sec. con núm. de ident. 12, sec. con núm. de ident. 13, sec.
con núm. de ident. 14, sec. con núm. de ident. 15, sec. con
núm. de ident. 16, sec. con núm. de ident. 17, sec. con núm.
de ident. 18, sec. con núm. de ident. 19, sec. con núm. de
20 ident. 26, sec. con núm. de ident. 27, sec. con núm. de
ident. 28, sec. con núm. de ident. 29, sec. con núm. de
ident. 30, sec. con núm. de ident. 31, sec. con núm. de
ident. 32, sec. con núm. de ident. 33, sec. con núm. de
ident. 34, sec. con núm. de ident. 35, sec. con núm. de
25 ident. 37, sec. con núm. de ident. 38, sec. con núm. de

ident. 40, sec. con núm. de ident. 41, sec. con núm. de
ident. 43, sec. con núm. de ident. 45, sec. con núm. de
ident. 47, sec. con núm. de ident. 48, sec. con núm. de
ident. 68, sec. con núm. de ident. 121, sec. con núm. de
5 ident. 122 o sec. con núm. de ident. 123.

En consecuencia, la enzima lípido aciltransferasa para
usar en cualquiera de los métodos y usos de la presente
invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende
ya sea la secuencia de aminoácidos que se muestra como la
10 sec. con núm. de ident. 3 o como sec. con núm. de ident. 4 o
la sec. con núm. de ident. 1 o sec. con núm. de ident. 15 o
sec. con núm. de ident. 16 o sec. con núm. de ident. 34,
sec. con núm. de ident. 35, sec. con núm. de ident. 68, sec.
con núm. de ident. 121, sec. con núm. de ident. 122 o sec.
15 con núm. de ident. 123 o comprende una secuencia de
aminoácidos que tiene 75 % o más, preferentemente, 80 % o
más, preferentemente, 85 % o más, preferentemente, 90 % o
más, preferentemente, 95 % o más de identidad con la
secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con
20 núm. de ident. 3 o la secuencia de aminoácidos que se
muestra como la sec. con núm. de ident. 4 o la secuencia de
aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 1
o la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec.
con núm. de ident. 15 o la secuencia de aminoácidos que se
25 muestra como la sec. con núm. de ident. 16 o la secuencia de

aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 34 o la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 35 o la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 68 o la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 121 o la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 122 o la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 123.

En consecuencia, la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene 80 % o más, preferentemente, 85 % o más, con mayor preferencia, 90 % o más, y aún con mayor preferencia, 95 % o más de identidad con cualquier secuencia que se muestran como sec. con núm. de ident. 16, sec. con núm. de ident. 68, sec. con núm. de ident. 121, sec. con núm. de ident. 122 o sec. con núm. de ident. 123.

En consecuencia, la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende una o más de las siguientes secuencias de aminoácidos:

- (a) una secuencia de aminoácidos que se muestra como
residuos de aminoácidos 1-100 de la sec. con
núm. de ident. 3 o sec. con núm. de ident. 1;

- (b) una secuencia de aminoácidos que se muestra como
residuos de aminoácidos 101-200 de la sec. con
núm. de ident. 3 o sec. con núm. de ident. 1;
- 5 (c) una secuencia de aminoácidos que se muestra como
residuos de aminoácidos 201-300 de la sec. con
núm. de ident. 3 o sec. con núm. de ident. 1; o
- (d) una secuencia de aminoácidos que tiene 75 % o
más, preferentemente, 85 % o más, con mayor
preferencia, 90 % o más, aún con mayor
10 preferencia 95 % o más de identidad con
cualquier secuencia de aminoácidos definidas
anteriormente en (a)-(c).

En consecuencia, la enzima lípido aciltransferasa para
usar en los métodos y usos de la presente invención puede
15 comprender una o más de las siguientes secuencias de
aminoácidos:

- (a) una secuencia de aminoácidos que se muestra como
residuos de aminoácidos 28-39 de la sec. con
núm. de ident. 3 o sec. con núm. de ident. 1;
- 20 (b) una secuencia de aminoácidos que se muestra como
residuos de aminoácidos 77-88 de la sec. con
núm. de ident. 3 o sec. con núm. de ident. 1;
- (c) una secuencia de aminoácidos que se muestra como
residuos de aminoácidos 126-136 de la sec. con
25 núm. de ident. 3 o sec. con núm. de ident. 1;

- (d) una secuencia de aminoácidos que se muestra como
residuos de aminoácidos 163-175 de la sec. con
núm. de ident. 3 o sec. con núm. de ident. 1;
- 5 (e) una secuencia de aminoácidos que se muestra como
residuos de aminoácidos 304-311 de la sec. con
núm. de ident. 3 o sec. con núm. de ident. 1; o
- (f) una secuencia de aminoácidos que tiene 75 % o
más, preferentemente, 85 % o más, con mayor
preferencia, 90 % o más, aún con mayor
10 preferencia, 95 % o más de identidad con
cualquier secuencia de aminoácidos definidas
anteriormente en (a)-(e).

En un aspecto, la enzima lípido aciltransferasa para usar
en cualquier método y/o usos de la presente invención es una
15 lípido aciltransferasa que puede ser la lípido aciltransferasa
de *Candida parapsilosis* como se enseña en la patente europea
núm. EP 1 275 711. Por lo tanto, en un aspecto la lípido
aciltransferasa para usar en el método y usos de la presente
invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende
20 una de las secuencias de aminoácidos que se enseñan en la sec.
con núm. de ident. 17 o sec. con núm. de ident. 18.

Con mayor preferencia, la enzima lípido aciltransferasa
para usar en cualquier método y usos de la presente
invención es una lípido aciltransferasa que puede ser una
25 lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de

aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 16 o una secuencia de aminoácidos que tiene 75 % o más, preferentemente, 85 % o más, con mayor preferencia, 90 % o más, aún con mayor preferencia, 95 % o más, aún con mayor preferencia, 98 % o más o, aún con mayor preferencia, 99 % o más de identidad con la sec. con núm. de ident. 16. Esta enzima se podría considerar una enzima variante.

En un aspecto la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede ser una lecitina:colesterol aciltransferasa (LCAT) o variante de esta (p. ej., una variante elaborada por evolución molecular)

Las LCAT adecuadas se conocen en la materia y pueden ser obtenibles de uno o más de los siguientes organismos, por ejemplo: mamíferos, ratas, ratones, gallinas, *Drosophila melanogaster*, plantas, que incluyen *Arabidopsis* y *Oryza sativa*, nematodos, hongos y levadura.

En una modalidad la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que puede ser la lípido aciltransferasa obtenible, obtenida, preferentemente, de las cepas TOP 10 de *E. coli* que contienen pPet12aAhydro y pPet12aASalmo depositadas por Danisco A/S de Langebrogade 1, DK-1001 Copenhagen K, Dinamarca, bajo el Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for

the purposes of Patent Procedure (Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes) en la National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria
5 (NCIMB) (Colección Nacional de Bacterias Industriales, Marinas y Alimentarias) 23 St. Machar Street, Aberdeen, Scotland, Reino Unido el 22 de diciembre de 2003 con los números de registro NCIMB 41204 y NCIMB 41205, respectivamente.

Una enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquiera
10 de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una fosfolípido glicerol aciltransferasa. Las fosfolípido glicerol aciltransferasas incluyen las aisladas de *Aeromonas spp.*, preferentemente, *Aeromonas hydrophila* o *A. salmonicida*, con la máxima preferencia, *A. salmonicida* o variantes de estas.

15 Con la máxima preferencia, las lípido aciltransferasas para usar en la presente invención están codificadas por las sec. con núm. de ident. 1, 3, 4, 15, 16, 34 y 35. Un experto en la materia reconocerá que es preferible que el péptido señal de la aciltransferasa se desdoble durante la expresión
20 de la transferasa. Los péptidos señal de las sec. con núm. de ident. 1, 3, 4 y 15 son los aminoácidos 1-18. Por lo tanto, las regiones más preferidas son los aminoácidos 19-335 para la sec. con núm. de ident. 1 y la sec. con núm. de ident. 3 (*A. hydrophilia*) y los aminoácidos 19-336 para la sec. con
25 núm. de ident. 4 y la sec. con núm. de ident. 15 (*A.*

salmonicida). Cuando se usa para determinar la homología de identidad de las secuencias de aminoácidos, se prefiere que los alineamientos como se describen en la presente invención usen la secuencia madura.

5 En una modalidad la lípido aciltransferasa para usar en la presente invención comprende (o consiste en), en consecuencia, la secuencia de aminoácidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 16 o comprende (o consiste en) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos
10 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % de identidad con la sec. con núm. de ident. 16.

 En una modalidad la lípido aciltransferasa para usar en la presente invención está codificada, en consecuencia, por una secuencia de nucleótidos que comprende (o consiste en) una
15 secuencia de nucleótidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 49 o comprende (o consiste en) una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 98 % de identidad con la sec. con núm. de ident. 49.

20 Por lo tanto, las regiones más preferidas para determinar la homología (identidad) son los aminoácidos 19-335 para las sec. con núm. de ident. 1 y 3 (*A. hydrophilia*) y los aminoácidos 19-336 para las sec. con núm. de ident. 4, 15 (*A. salmonicida*). Las sec. con núm. de ident. 34 y 35 son
25 secuencias de proteínas maduras de una lípido aciltransferasa

de *A. hydrophilia* y *A. salmonicida*, respectivamente, que pueden o no experimentar modificación postraslacional adicional.

Una enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que puede, además, aislarse de *Thermobifida*,
5 preferentemente, *T. fusca*, con la máxima preferencia, aquella codificada por la sec. con núm. de ident. 28.

En una modalidad preferida, la enzima para usar de acuerdo con la presente invención y/o en los métodos de la presente invención puede comprender cualesquiera de las
10 siguientes secuencias de aminoácidos y/o codificarse por las siguientes secuencias de nucleótidos:

a) un ácido nucleico que codifica un polipéptido que muestra actividad de la lípido aciltransferasa y
15 es al menos 70 % idéntico (preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 % idéntico) a la secuencia de polipéptidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 16 o al polipéptido que se muestra en la sec. con núm. de
20 ident. 68 o a los polipéptidos que se muestran en la sec. con núm. de ident. 121 o al polipéptido que se muestra en la sec. con núm. de ident. 122 o al polipéptido que se muestra en la sec. con núm. de ident. 123;

- b) un polipéptido (aislado) que comprende (o consiste en) una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la sec. con núm. de ident. 16 o sec. con núm. de ident. 68 o una secuencia de aminoácidos que es al menos 70 % idéntica (preferentemente, al menos 80 % idéntica, con mayor preferencia, al menos 90 % idéntica) a la sec. con núm. de ident. 16, sec. con núm. de ident. 68, sec. con núm. de ident. 121, sec. con núm. de ident. 122 o sec. con núm. de ident. 123;
- c) un ácido nucleico que codifica una lípido aciltransferasa, cuyo ácido nucleico comprende (o consiste en) una secuencia de nucleótidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 49 o una secuencia de nucleótidos que es al menos 70 % idéntica (preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 90 % idéntica) a la secuencia de nucleótidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 49;
- d) un ácido nucleico que se hibridiza en condiciones de media o alta rigurosidad en una sonda de ácido nucleico que comprende la secuencia de nucleótidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 49 y codifica para un polipéptido que muestra actividad de la lípido aciltransferasa;

e) un ácido nucleico que es un fragmento de las
secuencias de ácido nucleico especificadas en
a), c) o d); o

5 f) un polipéptido que es un fragmento del
polipéptido especificado en b).

Una enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquier
método y usos de la presente invención puede ser una lípido
aciltransferasa que puede, además, aislarse de *Streptomyces*,
preferentemente, *S. avermitis*, con la máxima preferencia,
10 aquella codificada por la sec. con núm. de ident. 32. Otras
enzimas posibles para usar en la presente invención de
Streptomyces incluyen aquellas codificadas por las sec. con
núm. de ident. 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 31 y 33.

Una enzima para usar en la invención puede aislarse,
15 además, de *Corynebacterium*, preferentemente, *C. efficiens*,
con la máxima preferencia, aquella codificada por la sec.
con núm. de ident. 29.

En consecuencia, la enzima lípido aciltransferasa para
usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente
20 invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende
cualquiera de las secuencias de aminoácidos que se muestran
como sec. con núm. de ident. 37, 38, 40, 41, 43, 45 o 47 o
una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad con
25 esta, o puede estar codificada por cualquiera de las

secuencias de nucleótidos que se muestran como sec. con núm. de ident. 36, 39, 42, 44, 46 o 48 o una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad con esta.

5 En una modalidad, la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima lípido aciltransferasa para usar cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en:

10 a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 36;

15 b) un ácido nucleico que se relaciona con la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident. 36 por la degeneración del código genético; y

 c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70 % de identidad con la secuencia de nucleótidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 36.

20 En una modalidad, la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención es una lípido aciltransferasa que comprende una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la sec. con núm. de ident. 37 o una secuencia de aminoácidos que tiene al
25 menos 60 % de identidad con esta.

En una modalidad adicional, la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende cualquier secuencia de aminoácidos que se muestran
5 como sec. con núm. de ident. 37, 38, 40, 41, 43, 45 o 47 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad con esta, o puede codificarse por cualquier secuencia de nucleótidos que se muestran como sec. con núm. de ident. 39, 42, 44, 46 o 48 o una
10 secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad con esta.

En una modalidad adicional la enzima lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa
15 que comprende cualquiera de las secuencias amino que se muestran como sec. con núm. de ident. 38, 40, 41, 45 o 47 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad con esta para los usos descritos en la presente descripción.

20 En una modalidad adicional la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende cualquiera de las secuencias amino que se muestran como sec. con núm. de ident. 38, 40 o 47 o una secuencia de
25 aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad con esta para los usos descritos en la presente descripción.

95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad con esta para los usos descritos en la presente descripción.

Con mayor preferencia, en una modalidad la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y/o
5 usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 47 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad con esta.

10 En otra modalidad la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con núm. de ident. 43 o 44 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad con esta.
15

En otra modalidad la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra como la sec. con
20 núm. de ident. 41 o una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de identidad con esta.

En una modalidad la lípido aciltransferasa para usar en cualquiera de los métodos y usos de la presente invención

puede estar codificada por un ácido nucleico seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 a) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 36;
- b) un ácido nucleico que se relaciona con la secuencia de nucleótidos de la sec. con núm. de ident. 36 por la degeneración del código genético; y
- 10 c) un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que tiene al menos 70 % de identidad con la secuencia de nucleótidos que se muestra en la sec. con núm. de ident. 36.

En una modalidad la lípido aciltransferasa de acuerdo
15 con la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa obtenible, preferentemente, obtenida de las cepas L130 o L131 de *Streptomyces* depositadas por Danisco A/S de Langebrogade 1, DK-1001 Copenhagen K, Dinamarca, bajo el Budapest Treaty on the International Recognition of the
20 Deposit of Microorganisms for the purposes of Patent Procedure (Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a los fines del Procedimiento en Materia de Patentes) en la National Collection of Industrial, Marine and Food Bacteria (NCIMB)
25 (Colección Nacional de Bacterias Industriales, Marinas y

Alimentarias) 23 St. Machar Street, Aberdeen, Scotland, Reino Unido, el 23 de junio de 2004, con los números de acceso NCIMB 41226 y NCIMB 41227, respectivamente.

Las secuencias de nucleótidos adecuadas que codifican una
5 lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención pueden codificar un polinucleótido que codifica una lípido aciltransferasa (sec. con núm. de ident. 16); o pueden codificar una secuencia de aminoácidos de una lípido aciltransferasa (sec. con núm. de ident. 16).

10 Una lípido aciltransferasa adecuada para usar en cualquier métodos y/o usos de la presente invención puede ser una secuencia de aminoácidos que puede identificarse por el alineamiento a la secuencia L131 (sec. con núm. de ident. 37) mediante el uso de Align X, el algoritmo de alineamiento
15 de pares Clustal W de VectorNTI con el uso de configuraciones predeterminadas.

Un alineamiento de L131 y los homólogos de *S. avermitilis* y *T. fusca* ilustra la conservación del motivo GDSx (GDSY en L131 y *S. avermitilis* y *T. fusca*), el bloque
20 GANDY, que es GGND A o GGNDL, y el bloque HPT (que se considera histidina catalítica conservada). Estos tres bloques conservados se resaltan en la Figura 42.

Cuando se alinean ya sea a la secuencia consenso Pfam00657 de pfam (como se describe en la patente núm. WO
25 2004/064987) y/o a la secuencia L131 descrita en la presente

descripción (sec. con núm. de ident. 37) es posible identificar tres regiones conservadas, el bloque GDSx, el bloque GANDY y el bloque HTP (ver la patente núm. WO 2004/064987 para más detalles).

5 Cuando se alinea ya sea a la secuencia consenso Pfam00657 de pfam (como se describe en la patente núm. WO 2004/064987) y/o a la secuencia L131 descrita en la presente descripción (sec. con núm. de ident. 37)

10 i) la lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que tiene un motivo GDSx, con mayor preferencia, un motivo GDSx seleccionado del motivo GDSL o GDSY.

15 y/o

20 ii) la lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que tiene un bloque GANDY, con mayor preferencia, un bloque GANDY que comprende GGNDx amino, con mayor preferencia, GGND A o GGNDL.

y/o

25 iii) la lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y usos de la presente

invención puede ser una lípido aciltransferasa que tiene, preferentemente, un bloque HTP.

y, preferentemente,

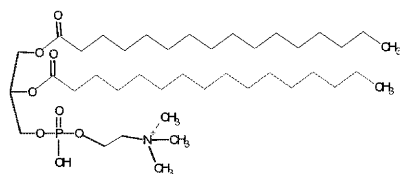
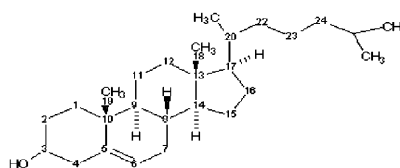
iv) la lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y usos de la presente invención puede ser una lípido aciltransferasa que tiene, preferentemente, un motivo GDSx o GDSY, y un bloque GANDY que comprende GGNDx amino, preferentemente, GGND A o GGNDL, y un bloque HTP (histidina conservada).

La lípido aciltransferasa, como se usa en la presente descripción, puede mencionarse como glicerofosfolípido colesterol aciltransferasa. En otras palabras, la lípido aciltransferasa para usar en la presente invención tiene, preferentemente, la capacidad de “desesterificar” fosfolípidos y, al mismo tiempo, esterificar colesterol con el ácido graso libre de la hidrolización, esto es efectivamente una reacción de tranferasa (es decir, una reacción de transesterificación). El grado de “desesterificación” puede describirse como la relación de fosfatidilcolina (PC) y/o fosfatidiletanolamina (PE) convertida en liso-PC o liso-PE, respectivamente.

Mediante la desesterificación enzimática de PC en liso-PC, se altera la relación entre la parte hidrófila de la molécula de fosfolípido (grupo de cabeza polar) y la parte hidrófoba

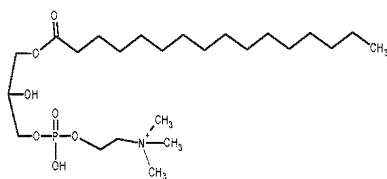
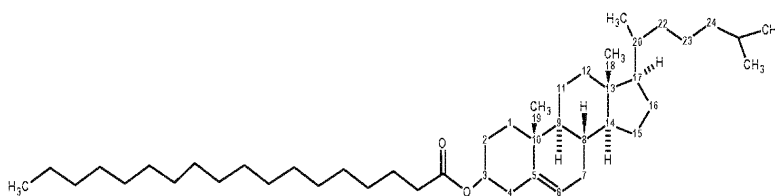
(cadenas de ácido graso). Al eliminar un ácido graso (ácidos grasos saturados y/o insaturados) se reduce la parte hidrofóbica, lo que hace que la molécula completa sea más hidrofílica. Además, se puede cambiar la configuración molecular estérica, lo que puede afectar las estructuras de fase (p. ej., micelación) formadas por las moléculas en dispersión, así como las interacciones con otras moléculas similares, por ejemplo, proteínas de la leche.

Los productos de liso-lecitina son conocidos por tener propiedades de emulsificación mejoradas. Con un grado alto de interesterificación y/o transesterificación es posible obtener tamaños promedio menores de gotitas de aceite en una prueba de emulsificación comparativa.

Fosfatidilcolina**Colesterol**

5

+ lípido aciltransferasa ↓ enzima

**Lisofosfatidilcolina****Éster de colesterol**

10

La función de la lípido aciltransferasa es que el colesterol y los fosfolípidos se transformarán en ésteres de colesterol y liso-fosfolípidos.

La lípido aciltransferasa puede ser una lípido aciltransferasa variante. La producción de tales variantes se enseña en la patente núm. WO2011/045629 que se incorpora en la presente descripción como referencia.

En una modalidad la enzima lípido aciltransferasa puede ser la enzima que se vende como LysoMax Oil™ (disponible de Danisco A/S).

En una modalidad la enzima lípido aciltransferasa puede ser una enzima que se vende como FoodPro® Cleanline (disponible de Danisco A/S).

En una modalidad preferida la lípido aciltransferasa para usar de acuerdo con la presente invención puede ser la sec. con núm. de ident. 16, como se enseña en la patente núm. WO2011/045629.

5 Las enzimas que funcionan como lípido aciltransferasas de acuerdo con la presente invención pueden identificarse rutinariamente con el uso del ensayo que se enseña en la presente descripción a continuación:

Determinación de la actividad de transferasa - ensayo

10 (colesterol:fosfolípido)" (TrU)

Sustrato: 50 mg de colesterol (Sigma C8503) y 450 mg de soja fosfatidilcolina (PC), Avanti núm. 441601 se disuelve en cloroformo, y el cloroformo se evapora a 40 °C bajo vacío.

Se dispersa 300 mg de PC:colesterol 9:1 a 40 °C en
15 15 ml 50 mM de regulador HEPES, pH de 7.

Enzimación:

Se añade 1 ml de sustrato en un vaso con tapa a 40 °C.

Se añade 25 µl de solución de enzima y se incuba durante la agitación durante 10 minutos a 40 °C.

20 La enzima añadida debe esterificar 0,6-3 % del colesterol en el ensayo.

Además, se analiza un vacío con 25 µl de agua en lugar de la solución de enzima.

Después de 10 minutos se añade 5 ml de
25 hexano:isopropanol 3:2.

Los lípidos se extraen en la fase orgánica y se aísla la fase orgánica superior.

La cantidad de éster de colesterol se analiza mediante HPTLC o HPLC mediante el uso de estearato de colesterilo

5 (Sigma C3549) estándar para la calibración.

La actividad de transferasa se calcula como la cantidad de formación de éster de colesterol por minuto en condiciones de ensayo.

Una unidad de transferasa (TrU) se define como μmol de éster de colesterol producido por minuto a 40 °C y pH de 7, de acuerdo con el ensayo de transferasa proporcionado anteriormente.

Preferentemente, cuando se usa el ensayo mencionado anteriormente, la lípido aciltransferasa que se usa en el método y usos de la presente invención tendrá una unidad de transferasa específica (TrU) por mg de enzima de al menos 25 TrU/mg de proteína enzimática.

En consecuencia, la lípido aciltransferasa para usar en la presente invención puede dosificarse en la cantidad de 0,05 a 50 de TrU por g de aceite, convenientemente, en una cantidad de 0,5 a 5 de TrU por g de aceite.

Con mayor preferencia, las enzimas adecuadas para usar en los métodos y/o usos de la presente invención tienen actividad de lípido aciltransferasa, tal como se define por el protocolo a continuación:

Protocolo para la determinación del % de actividad de
aciltransferasa:

Un aceite comestible al cual se ha añadido una lípido
 aciltransferasa de acuerdo con la presente invención puede
 5 extraerse después de la reacción enzimática con $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$
 2:1, y la fase orgánica que contiene el material lipídico se
 aísla y se analiza por GLC y HPLC de acuerdo con el
 procedimiento detallado a continuación. La cantidad de
 ácidos grasos libres y uno o más ésteres de estero/estanol
 10 se determinan a partir del análisis GLC y HPLC. Un aceite
 comestible de control al cual no se ha añadido ninguna
 enzima de acuerdo con la presente invención, se analiza de
 la misma manera.

Cálculo:

15 El aumento de ácidos grasos libres y ésteres de
 estero/estanol puede calcularse a partir de los
 resultados del análisis GLC y HPLC:

Δ % ácido graso = % ácido graso (enzima) - % ácido
 graso (control);

20 M_v ácido graso = peso molecular promedio de los ácidos
 grasos;

$A = \Delta$ % éster de estero/ M_v éster de estero (en donde
 Δ % éster de estero = % éster de estero/estanol
 (enzima) - % éster de estero/estanol (control) y M_v

éster de estero1 = peso molecular promedio de los ésteres de estero1/estanol);

La actividad de transferasa se calcula como un porcentaje de la actividad enzimática total:

5

$$\% \text{ actividad de transferasa} = \frac{A \times 100}{A + \Delta \% \text{ ácido graso} / (Mv \text{ ácido graso})}$$

Si los ácidos grasos libres aumentan en el aceite comestible, se prefiere que no aumenten sustancialmente, es decir, en un grado significativo. Esto significa, que el aumento de ácido graso libre no afecta negativamente la calidad del aceite comestible.

El aceite comestible que se usa para el ensayo de actividad de aciltransferasa es, preferentemente, el aceite de soja complementado con estero1 vegetal (1 %) y fosfatidilcolina (2 %); el aceite que usa el método:

El estero1 vegetal y la fosfatidilcolina se disolvieron en aceite de soja mediante calentamiento a 95 °C durante la agitación. Después, el aceite se enfrió a 40 °C y se añadieron las enzimas. Se añadió agua a una concentración total de 5 % de la fase oleosa. La muestra se mantuvo a 40 °C con agitación magnética y las muestras se extrajeron después de 4 y 20 horas y se analizaron mediante TLC.

Para el ensayo la dosificación enzimática que se usa es, preferentemente, 0,2 TIPU-K/g de aceite, con mayor preferencia, 0,08 TIPU-K/g de aceite, preferentemente, 0,01 TIPU-K/g de aceite. El nivel de fosfolípido presente en el aceite y/o el % de conversión de esteroles se determina, 5 preferentemente, después de 0,5, 1, 2, 4 y 20 horas, con mayor preferencia, después de 20 horas.

Cuando la enzima que se usa en el extracto del fruto de la palma (p. ej., extracto del fruto de la palma prensado) es 10 una enzima lípido acetiltransferasa, preferentemente, el tiempo de incubación es eficaz para asegurar que existe al menos 5 % de actividad de transferasa, preferentemente, al menos 10 % de actividad de transferasa, preferentemente, al menos 15 %, 20 %, 25 %, 26 %, 28 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o 15 75 % de actividad de transferasa.

El % de actividad de transferasa (es decir, la actividad de transferasa como un porcentaje de la actividad enzimática total) puede determinarse mediante el protocolo que se enseñó anteriormente.

20 Una enzima es una lípido aciltransferasa si produce al menos 5 % (preferentemente, al menos 10 % de actividad de transferasa, preferentemente, al menos 20 %, preferentemente, al menos 25 %, preferentemente, al menos 30 % de actividad de transferasa) en el ensayo que se enseñó anteriormente.

Enzimas fosfolipasa

En consecuencia, la enzima para usar en la presente invención es una enzima fosfolipasa A1 y/o fosfolipasa A2 y/o fosfolipasa B y/o fosfolipasa D. Las enzimas fosfolipasa A1 y A2 hidrolizan los fosfolípidos (p. ej., lecitina) en ácidos grasos y otras sustancias lipófilas. Las enzimas fosfolipasa A1 hidrolizan o escinden la cadena de acilo SN-1. Las enzimas fosfolipasa A2 hidrolizan o escinden la cadena de acilo SN-2. Las enzimas fosfolipasa A2 actúan sobre el fosfolípido intacto (p. ej., molécula de lecitina) e hidrolizan el ácido graso esterificado al segundo átomo de carbono. Los productos resultantes son lisolecitina y un ácido graso.

Los sitios de escisión de fosfolipasa se muestran en la Figura 2. Particularmente, la fosfolipasa A1 se muestra como PLA1 y la fosfolipasa A2 se muestra como PLA2. PLC y PLD son fosfolipasa C y fosfolipasa D, respectivamente.

La PLC no es una enzima para usar en la presente invención.

En una modalidad, la enzima para usar en la presente invención puede ser una enzima PLD.

En una modalidad alternativa la enzima para usar en la presente invención puede no ser una fosfolipasa D.

Una enzima que presenta la actividad PLA1 y PLA2 se denomina una fosfolipasa B. En una modalidad, la enzima para usar en la presente invención puede ser una fosfolipasa B.

En otra modalidad, la enzima de acuerdo con la presente
5 invención no es una enzima fosfolipasa B.

En consecuencia, la enzima para usar en la presente invención es una enzima fosfolipasa A1. Las enzimas fosfolipasa A1 pueden clasificarse como E.C. 3.1.1.32.

En consecuencia, la enzima para usar en la presente
10 invención es una enzima fosfolipasa A2. Las enzimas fosfolipasa A2 pueden clasificarse como E.C. 3.1.1.4.

En consecuencia, la enzima para usar en la presente invención es una enzima fosfolipasa B. Las enzimas fosfolipasa B pueden clasificarse como E.C. 3.1.1.5.

En consecuencia, la enzima para usar en la presente
15 invención es una enzima fosfolipasa D. Las enzimas fosfolipasa D pueden clasificarse como E.C. 3.1.4.4.

En una modalidad la enzima puede seleccionarse del grupo que consiste en Lecitase Ultra (una enzima fosfolipasa
20 A1) disponible de Novozymes A/S, Lipopan F (una fosfolipasa A1) disponible de Novozymes A/S, PLA2 Nagase (disponible de Nagase Chemtex Corporation, 1-1-17, Shinmachi, Nishi-ku, Osaka 550-8668, Japón), GL541 PLA2 (que tiene la secuencia de aminoácidos (que se muestra como la sec. con núm. de
25 ident. 124 en la Figura 76)

APADKPQVLASFTQTSASSQNAWLAANRNQSAWAAYEFDWSTDLCQAPDNPFPGFPFNTA
 CARHDFGYRNYKAAGSFDANKSRIDSAFYEDMKRVCTGYTGEKNTACNSTAWTTYQAVKI
 FG), Maxapal™ o Cakezyme™ (ambas PLA2 pancreática expresada
 en *Apspergillus* como se enseña en la patente núm.
 5 WO2010/124975) disponible de DSM, Panamore™ (una PLA1)
 disponible de DSM, Lipomod 699™ (una fosfolipasa 2
 pancreática de cerdo [PLA2]) disponible de Biocatalysts,
 Rohalase™ PL-XTRA (una PLA1) disponible de AB Enzymes, o
 YieldMax™ (PLA1) disponible de Chr Hansen y Novozymes.

10 En una modalidad, la enzima para usar en la presente
 invención puede (opcionalmente en combinación con cualquier
 mencionada anteriormente) seleccionarse del grupo que
 consiste en: G-ZYME™ G999 (disponible de DANISCO A/S) (PLB) o
 Rohalase®F (disponible de AB Enzymes GmbH, Feldbergstrasse
 15 78, 64293 Darmstadt, Alemania).

La fosfolipasa D de acuerdo con la presente invención
 puede ser cualquier fosfolipasa D disponible públicamente.
 En una modalidad, la fosfolipasa D puede ser la fosfolipasa
 D de *Streptomyces* sp. (disponible de Sigma, P4912).

20 Las enzimas fosfolipasa A1 o A2 pueden seleccionarse
 mediante el uso del ensayo que se enseña a continuación:

DETERMINACIÓN DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA

(ENSAYO TIPU-K):

Sustrato:

1,75 % de lecitina Avanti (núm. 441601), 6,3 % de Triton X-100 (Sigma núm. T9284, libre de peróxido), 50 mM de HEPES, pH de 7,0 y 5,0 mM de CaCl_2 .

Procedimiento del ensayo:

5 Se agregó 34 μl de sustrato en una cubeta con el uso de un analizador automático KoneLab. Al tiempo $T=0$ min, se agregó 4 μl de solución enzimática. Además, se analizó un vacío con agua en lugar de la enzima. La muestra se mezcló y se incubó a 30 °C durante 10 minutos.

10 El contenido de ácido graso libre de una muestra se analiza mediante el uso del kit NEFA-HR de WAKO GmbH. La actividad enzimática TIPU con un pH de 7 se calcula como ácido graso en micromoles producido por minuto en condiciones de ensayo.

15 Las enzimas fosfolipasa B pueden seleccionarse mediante el uso del ensayo que se enseña a continuación:

DETERMINACIÓN DEL ENSAYO DE ACTIVIDAD DE FOSFOLIPASA

(ENSAYO TIPU-K):

Sustrato:

20 1,25 % de liso-fosfatidilcolina Avanti (núm. 845875P), 6,3 % de Triton X-100 (Sigma núm. T9284, libre de peróxido), 50 mM de HEPES, pH de 7,0 y 5,0 mM de CaCl_2 .

Procedimiento del ensayo:

25 Se agregó 34 μl de sustrato en una cubeta con el uso de un analizador automático KoneLab. Al tiempo $T=0$ min, se

agregó 4 µl de solución enzimática. Además, se analizó un vacío con agua en lugar de la enzima. La muestra se mezcló y se incubó a 30 °C durante 10 minutos.

El contenido de ácido graso libre de una muestra se
5 analiza mediante el uso del kit NEFA-HR de WAKO GmbH. La actividad enzimática TIPU con un pH de 7 se calcula como ácido graso en micromoles producido por minuto en condiciones de ensayo.

Combinaciones de enzimas

10 Además, puede ser favorable combinar el uso de la lípido aciltransferasa con una fosfolipasa, tal como una fosfolipasa A1 y/o una fosfolipasa A2 y/o una fosfolipasa B y/o una fosfolipasa D.

En una modalidad preferida una lípido aciltransferasa
15 puede combinarse con una fosfolipasa A1 y/o una fosfolipasa A2.

El uso combinado se puede llevar a cabo secuencial o simultáneamente, por ejemplo, el tratamiento con lípido aciltransferasa puede ocurrir antes de o durante el tratamiento con enzimas adicionales. Alternativamente, el
20 tratamiento con enzimas adicionales puede ocurrir antes de o durante el tratamiento con la lípido aciltransferasa.

En el caso de los tratamientos enzimáticos secuenciales, en algunas modalidades puede ser favorable eliminar la primera enzima usada, por ejemplo, por desactivación por

calor o con el uso de una enzima inmovilizada, antes del tratamiento con la segunda (y/o tercera, etc.) enzima.

Dosificación

Una o más enzimas para usar en los métodos y/o usos de la presente invención pueden dosificarse en cantidades prefdeterminadas en el tratamiento del fruto de la palma o una porción de este o el extracto del fruto de la palma.

En una modalidad, una o más enzimas pueden dosificarse en 0,5 a 500 mg/kg de fruto de palma o extracto.

En otra modalidad, una o más enzimas pueden dosificarse en 1 a 200 mg/kg de fruto de palma o extracto.

Aun en otra modalidad, una o más enzimas pueden dosificarse en 1 a 100 mg/kg de fruto de palma o extracto. Aun en otras modalidades, una o más enzimas pueden dosificarse en 1 a 50 mg/kg de fruto de palma o extracto.

Aun en una modalidad adicional, una o más enzimas pueden dosificarse en 1 a 10 mg/kg de fruto de palma o extracto.

Célula huésped

El organismo huésped puede ser un organismo procariota o eucariota.

En una modalidad de la presente invención, la lípido aciltransferasa de acuerdo con la presente invención se expresa en una célula huésped, por ejemplo, una célula bacteriana, tal como *Bacillus* spp, por ejemplo, una célula huésped de *Bacillus licheniformis*.

Las células huésped alternas pueden ser, por ejemplo, hongos, levaduras o plantas.

Se ha descubierto que el uso de una célula huésped de *Bacillus licheniformis* produce una expresión aumentada de una lípido aciltransferasa en comparación con otros organismos, tales como *Bacillus subtilis*.

En una modalidad, preferentemente, la lípido aciltransferasa se expresa en *Bacillus licheniformis* tal como se enseña en las patentes núm. WO2008/090395 o WO2011/061657, cuyas referencias se incorporan en la presente descripción como referencia.

Se ha insertado una lípido aciltransferasa de *Aeromonas salmonicida* en diversos vectores de expresión convencionales, diseñada para ser óptima para la expresión en *Bacillus subtilis*, *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Aspergillus tubigensis*, respectivamente. Sin embargo, se detectaron solamente niveles muy bajos en *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Aspergillus tubigensis*. Los niveles de expresión fueron menores que 1 µg/ml y no fue posible seleccionar células que produjeran suficiente proteína para iniciar una producción comercial (no se muestra los resultados). En contraste, el *Bacillus licheniformis* tuvo la capacidad de producir niveles de proteína los cuales resultan atractivos para una producción económicamente factible.

Particularmente, se ha descubierto que la expresión en *B. licheniformis* es aproximadamente 100 veces mayor que la expresión en *B. subtilis* bajo el control del promotor aprE o es aproximadamente 100 veces mayor que la expresión en *S. lividans* bajo el control de un promotor A4 y fusionado a celulosa (los resultados no se muestran en la presente descripción).

La célula huésped puede ser cualquier célula de *Bacillus* distinta a *B. subtilis*. Preferentemente, la célula huésped de *Bacillus* es de una de las siguientes especies: *Bacillus licheniformis*; *B. alkalophilus*; *B. amyloliquefaciens*; *B. circulans*; *B. clausii*; *B. coagulans*; *B. firmus*; *B. lautus*; *B. lentus*; *B. megaterium*; *B. pumilus* o *B. stearothermophilus*.

El término “célula huésped”, en relación con la presente invención, incluye cualquier célula que comprende ya sea una secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa o una fosfolipasa como se define en la presente descripción o un vector de expresión como se define en la presente descripción y que se usa en la producción recombinante de una lípido aciltransferasa o fosfolipasa que tiene las propiedades específicas como se define en la presente descripción.

En consecuencia, la célula huésped puede ser una cepa con proteasa insuficiente o sin proteasa y/o una cepa con α -amilasa insuficiente o sin α -amilasa.

El término “heteróloga”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una secuencia derivada de una especie o fuente genética separada. Una secuencia heteróloga es una secuencia no huésped, una secuencia modificada, una
5 secuencia de una cepa de células huésped diferente o una secuencia homóloga de una ubicación cromosómica diferente de la célula huésped.

Una secuencia “homóloga” es una secuencia que se encuentra en la misma especie o fuente genética, es decir, que es de
10 origen natural en las especies relevantes de la célula huésped.

El término “lípidio aciltransferasa recombinante” o “fosfolipasa recombinante”, como se usa en la presente descripción, se refiere a que la lípidio aciltransferasa o fosfolipasa se ha producido por medio de recombinación
15 genética. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos que codifica la lípidio aciltransferasa o fosfolipasa se ha insertado en un vector de clonación, lo que da como resultado una célula de *B. licheniformis* caracterizada por la presencia de la lípidio aciltransferasa o fosfolipasa heteróloga.

20 Secuencias reguladoras

En algunas aplicaciones, una secuencia de lípidio aciltransferasa o fosfolipasa para usar en los métodos y/o usos de la presente invención puede obtenerse al unir operativamente una secuencia de nucleótidos que la codifica a una secuencia

reguladora que tiene la capacidad de facilitar la expresión de la secuencia de nucleótidos, tal como por la célula huésped seleccionada (tal como una célula de *B. licheniformis*).

De manera ilustrativa, se puede usar un vector que
5 comprende la secuencia de nucleótidos de la presente invención unido operativamente a esa secuencia reguladora, es decir, el vector es un vector de expresión.

El término “unido operativamente” se refiere a una yuxtaposición, en donde los componentes descritos están en
10 una relación que les permite funcionar en su forma prevista. Una secuencia reguladora “unida operativamente” a una secuencia codificante está ligada de tal manera que la secuencia codificante se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias control.

15 El término “secuencias reguladoras” incluye promotores y potenciadores y otras señales de regulación de expresión.

El término “promotor” se usa en el sentido normal de la materia, por ejemplo, un sitio de unión de la ARN-polimerasa.

La expresión mejorada de la secuencia de nucleótidos que
20 codifica la enzima que tiene las propiedades específicas, como se define en la presente invención, se puede lograr, además, por la selección de regiones reguladoras, por ejemplo, regiones promotoras, regiones líder de secreción y regiones

terminadoras que no son regiones reguladoras para la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima de naturaleza.

En consecuencia, la secuencia de nucleótidos de la presente invención puede estar unida operativamente a al menos
5 un promotor.

En consecuencia, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa o fosfolipasa puede unirse operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia terminadora. Los ejemplos de secuencias terminadoras
10 adecuadas para usar en cualquiera de los vectores, células huésped, métodos y/o usos de la presente invención incluyen: una secuencia terminadora de α -amilasa (p. ej., CGGGACTTACCGAAAGAAACCATCAATGATGGTTTCTTTTTTGTTTCATAAA - sec. con
núm. de ident. 64), una secuencia terminadora de proteasa
15 alcalina (p. ej., CAAGACTAAAGACCGTTCGCCCGTTTTTGCAATAAGCGGGCGAATCTTACATAAAAATA -
sec. con núm. de ident. 65), una secuencia terminadora específica de ácido glutámico (p. ej., ACGGCCGTTAGATGTGACAGCCCGTTCCAAAAGGAAGCGGGCTGTCTTCGTGTATTATTGT -
20 sec. con núm. de ident. 66), una secuencia terminadora de levanasa (p. ej., TCTTTTAAAGGAAAGGCTGGAATGCCCGGCATTCCAGCCACATGATCATCGTTT - sec.
con núm. de ident. 67) y una secuencia terminadora de subtilisina E (p. ej.,
25 GCTGACAAATAAAAAGAAGCAGGTATGGAGGAACCTGCTTCTTTTTACTATTATTG - sec.

con núm. de ident. 119). En consecuencia, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa o fosfolipasa puede unirse operativamente a un terminador de α -amilasa, tal como un terminador de α -amilasa de *B. licheniformis*.

Promotor

La secuencia promotora para usar de acuerdo con la presente invención puede ser heteróloga u homóloga a la secuencia que codifica una lípido aciltransferasa o fosfolipasa.

La secuencia promotora puede ser cualquier secuencia promotora con la capacidad de dirigir la expresión de una lípido aciltransferasa o fosfolipasa en la célula huésped de elección.

En consecuencia, la secuencia promotora puede ser homóloga a una especie de *Bacillus*, por ejemplo, *B. licheniformis*. Preferentemente, la secuencia promotora es homóloga a la célula huésped de elección.

En consecuencia, la secuencia promotora puede ser homóloga a la célula huésped. "Homóloga a la célula huésped" significa que se origina dentro del organismo huésped; es decir, una secuencia promotora que se encuentra naturalmente en el organismo huésped.

En consecuencia, la secuencia promotora se puede seleccionar del grupo que consiste en una secuencia de

nucleótidos que codifica: un promotor de α -amilasa, un promotor de proteasa, un promotor de subtilisina, un promotor de proteasa específico de ácido glutámico y un promotor de levansucrosa.

5 En consecuencia, la secuencia promotora puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica: LAT (p. ej., el promotor de alfa-amilasa de *B. licheniformis*, conocido, además, como AmyL), AprL (p. ej., el promotor de subtilisina Carlsberg), EndoGluC (p. ej., el promotor específico de ácido glutámico de
10 *B. licheniformis*), AmyQ (p. ej., el promotor de alfa-amilasa de *B. amyloliquefaciens*) y SacB (p. ej., el promotor de levansucrosa de *B. subtilis*).

Otros ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de una secuencia de ácido nucleico en los
15 métodos de la presente invención incluyen: el promotor del gen de proteasa alcalina de *Bacillus lentus* (aprH); el promotor del gen de alfa-amilasa de *Bacillus subtilis* (amyE); el promotor del gen de amilasa maltogénica de *Bacillus stearothermophilus* (amyM); el promotor del gen de penicilinasa
20 de *Bacillus licheniformis* (penP); los promotores de los genes xylA y xylB de *Bacillus subtilis*; y/o el promotor del gen CryIIIA de *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*.

En una modalidad preferida, la secuencia promotora es un promotor de α -amilasa (tal como un promotor de α -amilasa
25 de *Bacillus licheniformis*). Preferentemente, la secuencia

promotora comprende la secuencia -35 a -10 del promotor de α -amilasa de *B. licheniformis*, ver las Figuras 53 y 55.

La “secuencia -35 a -10” describe la posición con relación al sitio de inicio de la transcripción. Tanto “-35” como “-10” son bloques, es decir, un número de nucleótidos; cada uno comprende 6 nucleótidos y estos bloques están separados por 17 nucleótidos. Estos 17 nucleótidos se denominan, frecuentemente, como un “separador”. Esto se ilustra en la Figura 47, en donde los bloques -35 y -10 aparecen subrayados. Para evitar dudas, cuando se usa la “secuencia -35 a -10 ” en la presente descripción, se refiere a una secuencia desde el comienzo del bloque -35 hasta el extremo del bloque -10, es decir, que incluye tanto el bloque -35, el separador largo de 17 nucleótidos, como el bloque -10.

15 Péptido señal

La lípido aciltransferasa o fosfolipasa producida por una célula huésped mediante la expresión de la secuencia de nucleótidos que codifica la lípido aciltransferasa puede secretarse o puede contenerse intracelularmente en función de la secuencia y/o el vector que se use.

Se puede usar una secuencia señal para dirigir la secreción de las secuencias codificantes a través de una membrana celular particular. Las secuencias señal pueden ser naturales o extrañas para la secuencia codificante de la

lípido aciltransferasa. Por ejemplo, la secuencia codificante del péptido señal puede obtenerse a partir de un gen de amilasa o proteasa de una especie de *Bacillus*, preferentemente, de *Bacillus licheniformis*.

5 Las secuencias codificantes del péptido señal se pueden obtener a partir de uno o más de los siguientes genes: gen maltogénico de α -amilasa, gen de subtilisina, gen de beta-lactamasa, gen de proteasa neutra, gen prsA y/o gen de aciltransferasa.

10 Preferentemente, el péptido señal es un péptido señal de α -amilasa de *B. licheniformis*, aciltransferasa de *Aeromonas* (p. ej., mkkwfvcllglialtvqa - sec. con núm. de ident. 21), subtilisina de *B. subtilis* (p. ej., mrskklwisllfaltliftmafsnmsaqa - sec. con núm. de ident. 22)
 15 o subtilisina de *B. licheniformis* (p. ej., mmrkksfwfgmltafmlvftmefdsdsasa - sec. con núm. de ident. 23). En consecuencia, el péptido señal puede ser el péptido señal de α -amilasa de *B. licheniformis*.

Sin embargo, puede usarse cualquier secuencia
 20 codificante de péptido señal con la capacidad de dirigir la lípido aciltransferasa expresada en la vía secretora de una célula huésped de *Bacillus* (preferentemente, una célula huésped de *B. licheniformis*) de elección.

En algunas modalidades de la presente invención, una
 25 secuencia de nucleótidos que codifica una péptido señal puede

unirse operativamente a una secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa o fosfolipasa de elección.

La lípido aciltransferasa o fosfolipasa de elección puede expresarse en una célula huésped tal como se define en
5 la presente descripción como una proteína de fusión.

Vector de expresión

El término “vector de expresión” se refiere a un constructo con la capacidad de expresión *in vivo* o *in vitro*.

Preferentemente, el vector de expresión se incorpora en
10 el genoma del organismo, tal como un huésped de *B. licheniformis*. El término “incorporado” incluye, preferentemente, la incorporación estable en el genoma.

La secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa o fosfolipasa, tal como se define en la
15 presente descripción, puede estar presente en un vector en el que la secuencia de nucleótidos se une operativamente a secuencias reguladoras de tal manera que las secuencias reguladoras tienen la capacidad de proporcionar la expresión de la secuencia de nucleótidos mediante un organismo huésped
20 adecuado (tal como *B. licheniformis*), es decir, el vector es un vector de expresión.

Los vectores de la presente invención pueden transformarse en una célula huésped adecuada, tal como se describió anteriormente, para proporcionar la expresión de

un polipéptido que tiene actividad de lípido aciltransferasa o fosfolipasa tal como se define en la presente descripción.

La elección del vector, por ejemplo, plásmido, cósmido, virus o un vector del fago, inserto genómico, depende,
5 frecuentemente, de la célula huésped en la que se va a introducir. La presente invención puede abarcar otras formas de vectores de expresión que prestan funciones equivalentes y que son, o se vuelven, conocidos en la materia.

Una vez transformado en la célula huésped de elección,
10 el vector se puede replicar y funcionar independientemente del genoma de la célula huésped o se puede integrar en el genoma en sí.

Los vectores pueden contener uno o más genes marcadores seleccionables, tales como un gen que confiere resistencia a
15 antibióticos, por ejemplo, resistencia a la ampicilina, canamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Alternativamente, la selección puede realizarse por cotransformación (tal como se describe en la patente núm. WO 91/17243).

Los vectores pueden usarse *in vitro*, por ejemplo, para
20 la producción de ARN o se usan para transfectar o transformar una célula huésped.

El vector puede comprender, además, una secuencia de nucleótidos que permite al vector replicarse en la célula huésped en cuestión. Los ejemplos de tales secuencias son

los orígenes de replicación de los plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

Modificaciones postranscripcionales y postraslacionales

En consecuencia, la lípido aciltransferasa o
5 fosfolipasa de acuerdo con la presente invención puede codificarse por cualquier secuencia de nucleótidos que se enseñan en la presente descripción.

Según la célula huésped usada, se puede realizar modificaciones postranscripcionales y/o postraslacionales.
10 Se prevé que las enzimas (p. ej., la lípido aciltransferasa o fosfolipasas) para usar en los métodos y/o usos presentes abarcan las enzimas (p. ej., las lípido aciltransferasas o fosfolipasas) que han experimentado una modificación postranscripcional y/o postraslacional.

15 De manera ilustrativa solamente, la expresión de la secuencia de nucleótidos que se muestra en la presente descripción como la sec. con núm. de ident. 49 (ver la Figura 48) en una célula huésped (tal como *Bacillus licheniformis*, por ejemplo) produce modificaciones postranscripcionales y/o
20 postraslacionales que llevan a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la presente descripción como la sec. con núm. de ident. 68 (ver la Figura 73) que codifica una lípido aciltransferasa funcional.

La sec. con núm. de ident. 68 es la misma que la sec.
25 con núm. de ident. 16 (que se muestra en la presente

descripción en la Figura 3), excepto que la sec. con núm. de ident. 68 ha experimentado una modificación postraslacional y/o postranscripcional para eliminar 38 aminoácidos.

Además, la sec. con núm. de ident. 16 se puede
5 modificar postranscripcional y/o postraslacionalmente para eliminar 39, 40 o 41 aminos, tal como se muestra en las sec. con núm. de ident. 121, 122 y 123, respectivamente.

Aislado

En un aspecto, la enzima (p. ej., lípido aciltransferasa o
10 fosfolipasa) es una enzima recuperada/aislada (p. ej., lípido aciltransferasa o fosfolipasa). Por lo tanto, la enzima (p. ej., lípido aciltransferasa o fosfolipasa) producida puede estar en una forma aislada.

En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos que
15 codifica una enzima (p. ej., lípido aciltransferasa o fosfolipasa) para usar en la presente invención puede estar en una forma aislada.

El término “aislada” significa que la secuencia o proteína
está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente
20 con el que la secuencia o proteína se asocia naturalmente de naturaleza y como se encuentra de naturaleza.

Purificada

En un aspecto, la enzima (p. ej., lípido aciltransferasa o
fosfolipasa) puede estar en una forma purificada.

En otro aspecto, la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima (p. ej., lípido aciltransferasa o fosfolipasa) para usar en la presente invención puede estar en una forma purificada.

5 El término “purificada” significa que la secuencia se encuentra en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente 51 % de pureza o al menos aproximadamente 75 % o al menos aproximadamente 80 % o al menos aproximadamente 90 % de pureza o al menos
10 aproximadamente 95 % de pureza o al menos aproximadamente 98 % de pureza.

Clonación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de acuerdo con la presente invención

Una secuencia de nucleótidos que codifica ya sea un
15 polipéptido que tiene las propiedades específicas como se definen en la presente descripción o un polipéptido que es adecuado para la modificación se puede aislar de cualquier célula u organismo que produce el polipéptido. En la materia se conoce varios métodos para el aislamiento de secuencias
20 de nucleótidos.

Por ejemplo, una genoteca de ADN genómico y/o de ADNc puede construirse mediante el uso de ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce el polipéptido. Si se conoce la secuencia de aminoácidos del polipéptido, pueden
25 sintetizarse y usarse sondas de oligonucleótidos marcadas para

identificar los clones que codifican polipéptidos de la genoteca preparada a partir del organismo. Alternativamente, se podría usar una sonda de oligonucleótidos etiquetada que contiene secuencias homólogas a otro gen de polipéptido conocido para identificar los clones que codifican polipéptidos. En el último caso, se usan condiciones de hibridación y lavado de menor rigurosidad.

Alternativamente, los clones que codifican polipéptidos podrían identificarse al insertar fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformar las bacterias sin enzimas con la genoteca de ADN genómico resultante y, después, sembrar las bacterias transformadas sobre agar que contiene una enzima inhibida por el polipéptido para permitir que se identifiquen los clones que expresan el polipéptido.

En otra alternativa adicional, la secuencia de nucleótidos que codifican el polipéptido puede prepararse, sintéticamente, mediante métodos estándares establecidos, por ejemplo, el método de la fosforoamidita descrito por Beucage S.L. *et al* (1981) Tetrahedron Letters 22, págs. 1859-1869 o el método descrito por Matthes *et al* (1984) EMBO J. 3, págs. 801-805. En el método de la fosforoamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, purificado, templado, ligado y clonado en vectores adecuados.

La secuencia de nucleótidos puede ser de origen mixto genómico y sintético, de origen mixto sintético y de ADNc o de origen mixto genómico y de ADNc, que se prepara al ligar fragmentos de origen sintético, genómico o ADNc (según
5 convenga) de acuerdo con técnicas estándar. Cada fragmento ligado corresponde a varias partes de la secuencia completa de nucleótidos. La secuencia de ADN puede prepararse, además, por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con el uso de iniciadores específicos, por
10 ejemplo, como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 4.683.202 o en Saiki R K et al (Science (1988) 239, págs. 487-491).

Secuencias de nucleótidos

La presente invención abarca, además, secuencias de
15 nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen las propiedades específicas tal como se define en la presente descripción. El término “secuencia de nucleótidos”, como se usa en la presente descripción, se refiere a una secuencia de oligonucleótidos o secuencia de polinucleótidos y variantes,
20 homólogos, fragmentos y derivados de estas (tales como porciones de estas). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, sintético o recombinante, puede ser bicatenaria o monocatenaria ya sea que represente la cadena codificante o la cadena no codificante.

El término “secuencia de nucleótidos” en relación a la presente invención incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferentemente, se refiere a ADN, con mayor preferencia, ADNc para la secuencia codificante.

5 En una modalidad preferida la secuencia de nucleótidos que codifica en sí un polipéptido que tiene las propiedades específicas como se define en la presente descripción no comprende la secuencia de nucleótidos natural en su ambiente natural cuando se une a su secuencia o secuencias naturalmente
10 asociada(s) que se encuentra(n), además, en su ambiente natural. Para hacer más fácil la referencia, se denominará a esta modalidad preferida “secuencia de nucleótidos no natural”. En este sentido, el término “secuencia de nucleótidos natural” se refiere a una secuencia total de nucleótidos en su ambiente
15 natural y, cuando se une operativamente a un promotor completo con el que se relaciona naturalmente, el promotor se encuentra, además, en su ambiente natural. Por lo tanto, el polipéptido de la presente invención se puede expresar por una secuencia de nucleótidos en su organismo natural pero en donde la secuencia
20 de nucleótidos no se encuentra bajo control del promotor con el que se relaciona naturalmente dentro de ese organismo.

Preferentemente, el polipéptido no es un polipéptido natural. En este sentido, el término “polipéptido natural” se refiere a un polipéptido completo que se encuentra en su

ambiente natural y cuando ha sido expresado por su secuencia de nucleótidos natural.

Típicamente, la secuencia de nucleótidos que codifica polipéptidos con las propiedades específicas tal como se define
5 en la presente descripción se prepara con el uso de técnicas de ADN recombinante (p. ej., ADN recombinante). Sin embargo, en una modalidad alternativa de la invención la secuencia de nucleótidos podría sintetizarse, completa o parcialmente, mediante el uso de métodos químicos muy conocidos en la materia
10 (ver Caruthers MH *et al* (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 y Horn T *et al* (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

Evolución molecular

Una vez que se ha aislado una secuencia de nucleótidos que codifica enzimas o se ha identificado una secuencia de
15 nucleótidos putativa que codifica enzimas, se puede preferir modificar la secuencia de nucleótidos seleccionada, por ejemplo, se puede preferir mutar la secuencia para preparar una enzima de acuerdo con la presente invención.

Es posible introducir mutaciones con el uso de
20 oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados.

Un método adecuado se describe en Morinaga *et al* (Biotechnology (1984) 2, págs. 646-649). Otro método para
25 introducir mutaciones en secuencias de nucleótidos que

codifican enzimas se describe en Nelson and Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, págs. 147-151).

En vez de mutagénesis sitio dirigida, tal como se describió anteriormente, es posible introducir mutaciones aleatoriamente, por ejemplo, con el uso de un kit comercial, tal como el kit de mutagénesis de PCR GeneMorph de Stratagene o el kit de mutagénesis aleatoria de PCR Diversify de Clontech. La patente europea núm. EP 0 583 265 se refiere a métodos para optimizar la mutagénesis a base de PCR, que se puede combinar, además, con el uso de análogos de ADN mutagénico, tales como los descritos en la patente europea núm. EP 0 866 796. Las tecnologías de PCR propensa a errores son adecuadas para la producción de variantes de lípido aciltransferasas con las características preferidas. La patente núm. WO0206457 se refiere a la evolución molecular de las lipasas.

Un tercer método para obtener secuencias nuevas consiste en fragmentar secuencias de nucleótidos no idénticas, ya sea con el uso de cualquier número de enzimas de restricción o una enzima, tal como DNasa I, y reensamblar secuencias de nucleótidos completas que codifican proteínas funcionales. Alternativamente, es posible usar una o múltiples secuencias de nucleótidos no idénticas e introducir mutaciones durante el reensamblaje de la secuencia de nucleótidos completa. El barajado de ADN y las tecnologías de barajado son adecuados para la producción de

variantes de lípido aciltransferasas con las características preferidas. Los métodos adecuados para llevar a cabo el 'barajado' se pueden encontrar en las patentes europeas núm. EP0 752 008, EP1 138 763 y EP1 103 606. Además, el barajado
5 puede combinarse con otras formas de mutagénesis de ADN, tal como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 6.180.406 y en la patente núm. WO 01/34835.

Por lo tanto, es posible producir numerosas mutaciones de sitio dirigidas o aleatorias en una secuencia de nucleótidos,
10 ya sea *in vivo* o *in vitro*, y evaluarlas, posteriormente, para detectar una funcionalidad mejorada del polipéptido codificado por diversos medios. Con el uso de métodos de recombinación mediados *in silicio* y *ex vivo* (ver la patente núm. WO 00/58517, las patentes de los Estados Unidos núm. 6.344.328, 6.361.974), por
15 ejemplo, la evolución molecular puede realizarse cuando la variante producida retiene una homología muy baja con enzimas o proteínas conocidas. Tales variantes obtenidas de esta manera pueden tener una analogía estructural significativa con enzimas transferasa conocidas, pero tienen una homología de secuencias
20 de aminoácidos muy baja.

Adicionalmente, como un ejemplo no limitante, las mutaciones o variantes naturales de una secuencia de polinucleótidos se pueden recombinar con mutaciones de tipo silvestre o de otro tipo o con variantes naturales para
25 producir variantes nuevas. Tales variantes nuevas se pueden

evaluar, además, para detectar una funcionalidad mejorada del polipéptido codificado.

La aplicación de los métodos de evolución molecular mencionados anteriormente y de métodos similares permite la
5 identificación y selección de las variantes de las enzimas de la presente invención que tienen las características preferidas sin conocimiento anterior de la estructura o función proteica, y permite la producción de mutaciones o variantes no predecibles pero beneficiosas. Hay numerosos
10 ejemplos de la aplicación de la evolución molecular en la materia para optimizar o alterar la actividad enzimática, tales ejemplos incluyen, pero no se limitan a, uno o más de los siguientes: expresión y/o actividad optimizada en una célula huésped o in vitro, actividad enzimática incrementada,
15 especificidad alterada del sustrato y/o producto, estabilidad enzimática o estructural incrementada o reducida, actividad/especificidad enzimática alterada en condiciones ambientales preferidas, por ejemplo, temperatura, pH, sustrato

Como resultará evidente para un experto en la materia,
20 con el uso de herramientas de evolución molecular una enzima se puede alterar para mejorar la funcionalidad de la enzima.

En consecuencia, la secuencia de nucleótidos que codifica una enzima (p. ej., lípido aciltransferasa o fosfolipasa) usada en la presente invención puede codificar
25 una variante de la enzima (p. ej., lípido aciltransferasa o

fosfolipasa), es decir, la enzima (p. ej., lípido aciltransferasa o fosfolipasa) puede contener al menos una sustitución, delección o adición de aminoácidos, en comparación con una enzima genitora. Las variantes de las enzimas retienen al menos 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % de homología con la enzima genitora. Las enzimas genitoras adecuadas pueden incluir cualquier enzima con actividad de esterasa o lipasa. Preferentemente, la enzima genitora se alinea con la secuencia consenso de pfam00657.

En una modalidad preferida, una variante de la enzima lípido aciltransferasa retiene o incorpora al menos uno o más de los residuos de aminoácidos de la secuencia consenso de pfam00657 que se encuentran en los bloques GDSx, GANDY y HPT.

Las enzimas, tales como lipasas sin actividad de lípido aciltransferasa en un ambiente acuoso pueden mutarse mediante el uso de las herramientas de evolución molecular para introducir o mejorar la actividad de transferasa, para producir una enzima lípido aciltransferasa con una actividad de transferasa significativa adecuada para usar en las composiciones y métodos de la presente invención.

En consecuencia, la secuencia de nucleótidos que codifica una lípido aciltransferasa para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención puede codificar una lípido aciltransferasa que puede ser una variante con una

actividad enzimática mejorada en lípidos polares, preferentemente, en comparación con la enzima genitora. Las variantes de las lípido aciltransferasas pueden tener una actividad reducida sobre los triglicéridos y/o monoglicéridos y/o diglicéridos en comparación con la enzima genitora.

En consecuencia, es posible que la variante de la enzima no tenga actividad sobre los triglicéridos y/o monoglicéridos y/o diglicéridos.

Alternativamente, la variante de la enzima puede tener una actividad aumentada en uno o más de los siguientes, lípidos polares, fosfolípidos, lecitina, fosfatidilcolina.

Las variantes de lípido aciltransferasas son conocidas y una o más de tales variantes pueden ser adecuadas para usar en los métodos y usos de acuerdo con la presente invención y/o en las composiciones enzimáticas de acuerdo con la presente invención. De manera ilustrativa solamente, las variantes de lípido aciltransferasas que se describen en las siguientes referencias pueden usarse de acuerdo con la presente invención: Hilton & Buckley *J. Biol. Chem.* 1991 Jan 15: 266 (2): 997-1000; Robertson et al *J. Biol. Chem.* 1994 Jan 21; 269(3):2146-50; Brumlik et al *J. Bacteriol.* 1996 Apr; 178 (7): 2060-4; Peelman et al *Protein Sci.* 1998 Mar; 7(3):587-99, patente núm. WO2011/045629.

Secuencias de aminoácidos

La presente invención incluye, además, el uso de secuencias de aminoácidos codificadas por una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima (p. ej., lípido
5 aciltransferasa o fosfolipasa) para usar en cualquier método y/o usos de la presente invención.

Como se usa en la presente descripción, el término “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “polipéptido” y/o del término “proteína”. En algunos casos, el término
10 “secuencia de aminoácidos” es sinónimo del término “péptido”.

La secuencia de aminoácidos puede prepararse/aislarse de una fuente adecuada o puede elaborarse sintéticamente o puede prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

En consecuencia, las secuencias de aminoácidos se
15 pueden obtener de los polipéptidos aislados que se enseñan en la presente descripción mediante técnicas estándar.

Un método adecuado para determinar las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos aislados consiste en lo siguiente:

20 El polipéptido purificado se puede liofilizar y 100 µg del material liofilizado se pueden disolver en 50 µl de una mezcla de urea 8 M e hidrocarbonato amónico 0.4 M, pH 8.4. La proteína disuelta puede desnaturalizarse y reducirse durante 15 minutos a 50 °C después del recubrimiento con

nitrógeno y la adición de 5 µl de ditioneitol 45 mM. Después de enfriar hasta temperatura ambiente, se puede agregar 5 µl de yodoacetamida 100 mM para modificar los residuos de cisteína durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad en presencia de nitrógeno.

135 µl de agua y 5 µg de endoproteinasa Lys-C en 5 µl de agua pueden añadirse a la mezcla de reacción mencionada anteriormente y la digestión puede realizarse a 37 °C en presencia de nitrógeno durante 24 horas.

10 Los péptidos resultantes pueden separarse mediante HPLC en fase inversa en una columna VYDAC C18 (0,46x15 cm;10 µm; The Separation Group, California, Estados Unidos) mediante el uso del disolvente A: 0.1 % TFA en agua y disolvente B: 0.1 % TFA en acetonitrilo. Los péptidos seleccionados se
15 pueden someter nuevamente a cromatografía en una columna Develosil C18 con el mismo sistema de solventes, antes de la secuenciación N-terminal. La secuenciación se puede llevar a cabo con el uso de un secuenciador 476A de Applied Biosystems con el uso de ciclos rápidos de pulsado de
20 líquido de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems, California, Estados Unidos).

Identidad de secuencias u homología de secuencias

La presente invención abarca, además, el uso de secuencias que tienen un grado de identidad de secuencias u
25 homología de secuencias con la o las secuencia(s) de

aminoácido(s) de un polipéptido cuyas propiedades específicas están definidas en la presente descripción o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifica dicho polipéptido (mencionada de aquí en adelante como una o varias
5 “secuencia(s) homóloga(s)”). En la presente descripción, el término “homóloga” se refiere a una entidad que tiene cierta homología con las secuencias de aminoácidos sujeto y las secuencias de nucleótidos sujeto. En la presente descripción, el término “homología” puede igualarse a la “identidad”.

10 La secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos homóloga debe proporcionar y/o codificar un polipéptido que retiene la actividad funcional y/o mejora la actividad de la enzima.

En el presente contexto, se considera que una secuencia
15 homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos 75, 85 o 90 % idéntica, preferentemente, al menos 95 o 98 % idéntica a la secuencia sujeto. Por ejemplo, típicamente, las secuencias homólogas comprenden los mismos sitios activos, etc. que la secuencia de
20 aminoácidos sujeto. Aunque la homología puede considerarse, además, en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención la homología se expresa en términos de identidad de secuencias.

En una modalidad, se considera que una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos o una secuencia de nucleótidos que tiene una o varias adiciones, deleciones y/o sustituciones en comparación con la secuencia sujeto.

5 En una modalidad, la presente invención se relaciona con una proteína cuya secuencia de aminoácidos se representa en la presente descripción o una proteína derivada de esta proteína (parental) por sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
10 aminoácidos, o más aminoácidos, tales como 10 o más de 10 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que tiene la actividad de la proteína parental.

En una modalidad, la presente invención se relaciona con una secuencia de ácidos nucleicos (o gen) que codifica una
15 proteína cuya secuencia de aminoácidos se representa en la presente descripción o que codifica una proteína derivada de esta proteína (parental) por sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 aminoácidos, o más aminoácidos, tales como 10 o más de 10
20 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína parental y que tiene la actividad de la proteína parental.

En este contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos 75, 85 o 90 % idéntica, preferentemente, al menos 95 o 98 %
25 idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica un

polipéptido de la presente invención (la secuencia sujeto). Típicamente, los homólogos comprenden las mismas secuencias que codifican para los sitios activos, etc. como la secuencia sujeto. Aunque la homología puede considerarse, además, en
5 términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de la presente invención se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencias.

Las comparaciones de homología pueden hacerse a ojo o,
10 más usualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas de programación disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología se puede calcular en secuencias
15 contiguas, por ejemplo, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo a la vez. Esto se denomina alineamiento "sin interrupciones". Típicamente, tales
20 alineamientos sin interrupciones se realizan únicamente en un número relativamente bajo de residuos.

Aunque este es un método muy simple y consistente, no toma en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias idénticas de cualquier otra manera, una inserción
25 o delección provocará que los siguientes residuos de

aminoácidos queden fuera de alineamiento y esto produce, potencialmente, una gran reducción en el % de homología cuando se realiza un alineamiento global. En consecuencia, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineamientos óptimos que toman en consideración las posibles inserciones y deleciones sin penalizar indebidamente la puntuación de homología total. Esto se logra al insertar “interrupciones” en el alineamiento de secuencias para tratar de maximizar la homología local.

10 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan “penalizaciones por interrupciones” a cada interrupción que se produce en el alineamiento de manera que, para la misma cantidad de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con la cantidad menor de interrupciones posible, 15 que refleja una relación mayor entre las dos secuencias comparadas, alcanza un puntaje más alto que un alineamiento con muchas interrupciones. Típicamente, se usa “costos de interrupciones afines” que cargan un costo relativamente alto por la existencia de una interrupción y una 20 penalización menor por cada residuo posterior en la interrupción. Este es el sistema de puntajes de interrupciones usado más comúnmente. Por supuesto, las penalizaciones de interrupciones altas producen alineamientos optimizados con menos interrupciones. La

mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por interrupciones. Sin embargo, se prefiere usar los valores predeterminados cuando se usa un programa para comparaciones de secuencias.

5 Por lo tanto, el cálculo del % máximo de homología requiere, en primer lugar, la producción de un alineamiento óptimo tomando en consideración las penalizaciones de interrupciones. Un programa informático adecuado para llevar a cabo tal alineamiento es el Vector NTI (Invitrogen Corp.). Los
10 ejemplos de programas útiles que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan a, el paquete BLAST (ver Ausubel et al. 1999 Short Protocols in Molecular Biology, 4.º ed - capítulo 18), BLAST 2 (ver FEMS Microbiol Lett 1999 174(2): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y
15 tatiana@ncbi.nlm.nih.gov), FASTA (Altschul et al 1990 J. Mol. Biol. 403-410) y AlignX, por ejemplo. Al menos BLAST, BLAST 2 y FASTA se encuentran disponibles para búsquedas fuera de línea y en línea (ver Ausubel et al 1999, páginas 7-58 a 7-60).

 Aunque el % final de homología puede determinarse en
20 términos de identidad, el proceso de alineamiento en sí no se basa, típicamente, en una comparación de pares de todo o nada. En lugar de eso, se usa, generalmente, una matriz graduada de puntajes de similitud que asigna puntajes a cada comparación de pares en función de la similitud química o
25 distancia evolutiva. Un ejemplo de tal matriz que se usa

comúnmente es la matriz BLOSUM62, la matriz predeterminada para el paquete integrado de programas BLAST. Los programas Vector NTI usan, generalmente, los valores predeterminados públicos o una tabla de comparación de símbolos
 5 personalizados, si se proporciona (ver el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores predeterminados para el paquete Vector NTI.

Alternativamente, el porcentaje de homología puede calcularse con el uso de la función de alineamientos
 10 múltiples en Vector NTI (Invitrogen Corp.), basada en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG & Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

Una vez que el programa ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología,
 15 preferentemente, el % de identidad de secuencias. El programa hace esto, típicamente, como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

Si se usan las penalizaciones por interrupciones al determinar la identidad de secuencias, entonces se usan,
 20 preferentemente, los siguientes parámetros para el alineamiento de pares:

PARA BLAST	
APERTURA DE INTERRUPCIÓN	0
EXTENSIÓN DE LA INTERRUPCIÓN	0

PARA CLUSTAL	ADN	PROTEÍNA	
TAMAÑO DE PALABRA	2	1	K triple
PENALIZACIÓN DE INTERRUPCIÓN	15	10	
EXTENSIÓN DE LA INTERRUPCIÓN	6,66	0,1	

En una modalidad, CLUSTAL puede usarse con la penalización de interrupción y extensión de la interrupción, tal como se definieron anteriormente.

En consecuencia, el grado de identidad con respecto a una
5 secuencia de nucleótidos se determina en al menos 20
nucleótidos contiguos, preferentemente, en al menos 30
nucleótidos contiguos, preferentemente, en al menos 40
nucleótidos contiguos, preferentemente, en al menos 50
nucleótidos contiguos, preferentemente, en al menos 60
10 nucleótidos contiguos, preferentemente, en al menos 100
nucleótidos contiguos.

En consecuencia, el grado de identidad con respecto a una secuencia de nucleótidos se puede determinar sobre la secuencia completa.

15 En una modalidad el grado de identidad de secuencias de aminoácidos de acuerdo con la presente invención se puede determinar adecuadamente por medio de programas informáticos

conocidos en la materia, tales como Vector NTI 10
(Invitrogen Corp.). Para el alineamiento de pares la matriz
usada es, preferentemente, BLOSUM62 con una penalización de
apertura de interrupciones de 10,0 y una penalización de
5 extensión de interrupciones de 0,1.

En consecuencia, el grado de identidad con respecto a una
secuencia de aminoácidos se determina sobre al menos 20
aminoácidos contiguos, preferentemente, sobre al menos 30
aminoácidos contiguos, preferentemente, sobre al menos 40
10 aminoácidos contiguos, preferentemente, sobre al menos 50
aminoácidos contiguos, preferentemente, sobre al menos 60
aminoácidos contiguos.

En consecuencia, el grado de identidad con respecto a
una secuencia de aminoácidos se puede determinar sobre la
15 secuencia completa.

Las secuencias pueden tener, además, delecciones,
inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que
producen un cambio silencioso y resultan en una sustancia
funcionalmente equivalente. Las sustituciones deliberadas de
20 aminoácidos pueden realizarse en función de la similitud en
polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad
y/o la naturaleza anfipática de los residuos, siempre que se
retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por
ejemplo, los aminoácidos con carga negativa incluyen ácido
25 aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados

positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos principales polares no cargados que tienen valores similares de hidrofiliicidad incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

Las sustituciones conservadoras se pueden llevar a cabo, por ejemplo, de acuerdo con la Tabla 2 a continuación. Los aminoácidos en el mismo bloque en la segunda columna y, preferentemente, en la misma línea en la tercera columna pueden sustituirse entre sí:

ALIFÁTICOS	No polares	G A P
		I L V
	Polares - sin carga	C S T M
		N Q
	Polares - con carga	D E
		K R
AROMÁTICOS		H F W Y

Tabla 2

La presente invención abarca, además, la sustitución homóloga ("sustitución" y "reemplazo" se usan en la presente descripción para indicar el intercambio de un residuo de aminoácidos existente con un residuo alterno) que puede producirse, es decir, la sustitución de igual a igual, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc.

Además, puede producirse la sustitución no homóloga, es decir, de una clase de residuo a otro o que implica, alternativamente, la inclusión de aminoácidos no naturales, tales como ornitina (de aquí en adelante mencionada como Z), ornitina de ácido 5 diaminobutírico (de aquí en adelante mencionada como B), norleucina ornitina (de aquí en adelante mencionada como O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Además, los reemplazos se pueden hacer por aminoácidos no naturales.

10 Las variantes de secuencias de aminoácidos pueden incluir grupos de separadores adecuados que pueden insertarse entre cualquier par de residuos de aminoácidos de la secuencia que incluye grupos alquilo, tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de los separadores de 15 aminoácidos, tales como residuos de glicina o de β -alanina. Los experimentados en la materia comprenderán bien una forma adicional de variación que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide. Para evitar dudas, “la forma peptoide” se usa para referirse a variantes de 20 residuos de aminoácidos, en donde el grupo sustituyente α -carbono se encuentra en el átomo de nitrógeno del residuo en lugar del α -carbono. Los procesos para preparar péptidos en la forma peptoide se conocen en la materia, por ejemplo,

Simon RJ et al., *PNAS* (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, *Trends Biotechnol.* (1995) 13(4), 132-134.

Las secuencias de nucleótidos para usar en la presente invención o que codifican un polipéptido con las propiedades
5 específicas definidas en la presente invención pueden incluir dentro de estas nucleótidos sintéticos o modificados. En la materia se conocen varios tipos distintos de modificaciones a oligonucleótidos. Estos incluyen cadenas principales de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición
10 de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de la presente invención, debe entenderse que las secuencias de nucleótidos descritas en la presente invención pueden modificarse con cualquier método disponible en la materia. Tales
15 modificaciones se realizan para mejorar la actividad *in vivo* o la duración de las secuencias de nucleótidos.

La presente invención abarca, además, el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias descritas en la presente invención o cualquier
20 derivado, fragmento o derivado de estos. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de esta, entonces esa secuencia puede usarse como una sonda para identificar secuencias codificantes similares en otros organismos, etc.

Los polinucleótidos que no son 100 % homólogos a las
25 secuencias de la presente invención, pero que se encuentran

dentro del alcance de la presente invención, pueden obtenerse de distintas maneras. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente descripción pueden obtenerse, por ejemplo, por sondeo de genotecas de ADN que se elaboran a partir de una variedad de individuos, por ejemplo, individuos de distintas poblaciones. Adicionalmente, es posible obtener otros homólogos virales/bacterianos o celulares, particularmente, homólogos celulares que se encuentran en células de mamíferos (p. ej., células de rata, de ratón, células bovinas y de primates), y tales homólogos y fragmentos de los estos tendrán la capacidad, generalmente, de hibridizarse selectivamente en las secuencias que se muestran en el listado de secuencias de la presente invención. Tales secuencias pueden obtenerse mediante el sondeo de las genotecas de ADNc elaboradas de o genotecas de ADN de otras especies animales y el sondeo de tales genotecas con sondas que comprenden la totalidad o parte de cualquier secuencia en la lista de secuencias adjunta en condiciones de rigurosidad media a alta. Consideraciones similares aplican para obtener especies homólogas y variantes alélicas de las secuencias de polipéptidos o de nucleótidos de la presente invención.

Además, es posible obtener variantes y cepas/especies homólogas con el uso de PCR con iniciadores degenerados diseñados para dirigir las secuencias dentro de las variantes y homólogos que codifican secuencias de

aminoácidos conservadas dentro de las secuencias de la presente invención. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, al alinear las secuencias de aminoácidos de múltiples variantes/homólogos. Los
5 alineamientos de secuencias pueden realizarse con el uso de programas informáticos conocidos en la materia. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp es muy usado.

Los iniciadores degenerados usados en la PCR contienen una o más posiciones degeneradas y se usan en condiciones de
10 rigurosidad menor en comparación con las condiciones usadas para clonar secuencias con iniciadores de secuencias individuales contra secuencias conocidas.

Alternativamente, tales polinucleótidos pueden obtenerse mediante mutagénesis sitio dirigida de secuencias
15 caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieren cambios silenciosos de secuencias de codones para optimizar las preferencias codónicas para una célula huésped particular en la que se expresan las secuencias de polinucleótidos. Se puede desear otros cambios de secuencia
20 para introducir sitios de restricción de reconocimiento de polipéptidos o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) de la presente invención pueden usarse para producir un iniciador,
25 por ejemplo, un iniciador de PCR, un iniciador para una

reacción de amplificación alterna, una sonda, por ejemplo, marcada con un marcador revelador por medios convencionales con el uso de marcadores radiactivos o no radiactivos, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Tales
5 iniciadores, sondas y otros fragmentos tienen al menos 15, preferentemente, al menos 20, por ejemplo, al menos 25, 30 o 40 nucleótidos de longitud y están incluidos, además, en el término polinucleótidos de la presente invención, como se usa en la presente descripción.

10 Los polinucleótidos, tales como los polinucleótidos y sondas de ADN de acuerdo con la presente invención, pueden producirse de manera recombinante, sintética o por cualquier método disponible para los experimentados en la materia. Además, pueden clonarse mediante técnicas estándar.

15 Generalmente, los iniciadores se producen por medios sintéticos, que implican una elaboración gradual de la secuencia de ácido nucleico deseada, un nucleótido por vez. Las técnicas para lograr esto mediante el uso de técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la materia.

20 Generalmente, los polinucleótidos más largos se producen con el uso de medios recombinantes, por ejemplo, con el uso de técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Esto implica elaborar un par de iniciadores (p. ej., de aproximadamente 15 a 30 nucleótidos) que flanquean una
25 región de la secuencia de acceso de lípidos que se desea

clonar, poner en contacto los iniciadores con el ARNm o el ADNc obtenido de una célula animal o humana, realizar una reacción en cadena de la polimerasa bajo condiciones que dan lugar a la amplificación de la región deseada, aislar el
5 fragmento amplificado (p. ej., mediante la purificación de la mezcla de reacción en un gel de agarosa) y recuperar el ADN amplificado. Los iniciadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de manera que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector
10 de clonación adecuado.

Hibridación

La presente invención abarca, además, el uso de secuencias que son complementarias a las secuencias de la presente invención o secuencias que tienen la capacidad de
15 hibridizarse ya sea en las secuencias de la presente invención o en secuencias complementarias a estas.

El término “hibridación”, como se usa en la presente descripción, incluirá “el proceso por el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria por
20 medio de coincidencia de bases”, así como el proceso de amplificación como se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La presente invención abarca, además, el uso de secuencias de nucleótidos que tienen la capacidad de

hibridizarse en las secuencias complementarias a las secuencias sujeto descritas en la presente invención o cualquier derivado, fragmento o derivado de estos.

La presente invención abarca, además, secuencias que
5 son complementarias a secuencias que tienen la capacidad de hibridizarse en las secuencias de nucleótidos descritas en la presente invención.

Las condiciones de hibridación se basan en la temperatura de fusión (T_m , por sus siglas en inglés) del
10 complejo de unión del nucleótido, como se enseña en Berger y Kimmel (1987, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology, Vol. 152, Academic Press, San Diego CA) y confieren una "rigurosidad" definida tal como se explica a continuación.

15 Típicamente, la rigurosidad máxima se produce a aproximadamente una $T_m - 5^\circ\text{C}$ (5°C menos que la T_m de la sonda); la rigurosidad alta a aproximadamente 5°C a 10°C menos que la T_m ; la rigurosidad intermedia a aproximadamente 10°C a 20°C menos que la T_m ; y la rigurosidad baja a
20 aproximadamente 20°C a 25°C menos que la T_m . Como comprenderán los expertos en la materia, se puede usar una hibridación de rigurosidad máxima para identificar o detectar secuencias de nucleótidos idénticas, mientras que una hibridación de rigurosidad intermedia (o baja) se puede

usar para identificar o detectar secuencias de polinucleótidos similares o relacionadas.

Preferentemente, la presente invención abarca el uso de secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces
5 de hibridizarse bajo condiciones de rigurosidad alta o condiciones de rigurosidad intermedia en secuencias de nucleótidos que codifican polipéptidos que tienen las propiedades específicas, tal como se define en la presente descripción.

10 Con mayor preferencia, la presente invención abarca el uso de secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridizarse en condiciones de rigurosidad alta (p. ej., 65 °C y 0,1xSSC {1xSSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M citrato de Na, pH de 7,0}) en las secuencias de nucleótidos que
15 codifican polipéptidos que las tienen propiedades específicas, tal como se define en la presente descripción.

La presente invención se relaciona, además, con el uso de secuencias de nucleótidos que pueden hibridizarse en las secuencias de nucleótidos descritas en la presente
20 descripción (que incluyen secuencias complementarias a las descritas en la presente descripción).

La presente invención se relaciona, además, con el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias que pueden hibridizarse en las secuencias de
25 nucleótidos descritas en la presente descripción (que

incluyen secuencias complementarias a las descritas en la presente descripción).

Además, el alcance de la presente invención incluye el uso de secuencias de polinucleótidos que tienen la capacidad de hibridizarse en las secuencias de nucleótidos descritas en la presente descripción en condiciones de rigurosidad intermedia a máxima.

En un aspecto preferido, la presente invención incluye el uso de secuencias de nucleótidos que pueden hibridizarse en las secuencias de nucleótidos descritas en la presente descripción o en el complemento de estas, en condiciones rigurosas (p. ej., 50 °C y 0,2xSSC).

En un aspecto con mayor preferencia, la presente invención incluye el uso de secuencias de nucleótidos que pueden hibridizarse en las secuencias de nucleótidos descritas en la presente descripción o en el complemento de estas, en condiciones de rigurosidad alta (p. ej., 65 °C y 0,1xSSC).

Expresión de polipéptidos

Una secuencia de nucleótidos para usar en la presente invención o para codificar un polipéptido que tiene las propiedades específicas, tal como se define en la presente descripción, se puede incorporar en un vector reproducible recombinante. El vector se puede usar para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos, en forma de polipéptidos, en y/o a partir de una célula huésped

compatible. La expresión se puede controlar con el uso de secuencias control que incluyen promotores/potenciadores y otras señales de regulación de expresión. Se puede usar promotores procariotas y promotores funcionales en células eucariotas. Se puede usar promotores específicos de tejido o específicos de estímulos. Además, se puede usar promotores quiméricos que comprenden elementos de secuencias a partir de dos o más promotores distintos descritos anteriormente.

El polipéptido producido por una célula recombinante huésped por expresión de la secuencia de nucleótidos se puede secretar o puede estar contenido intracelularmente, según la secuencia y/o vector que se use. Las secuencias codificantes se pueden diseñar con secuencias señal que dirigen la secreción de la sustancia de las secuencias codificantes a través de una membrana celular procariota o eucariota determinada.

Constructos

El término “constructo”, que es sinónimo de términos como “conjugado”, “casete” e “híbrido”, incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades específicas tal como se define en la presente descripción para usar de acuerdo con la presente invención con una unión directa o indirecta con un promotor. Un ejemplo de una unión indirecta es la provisión de un grupo de separadores adecuados, tal como una secuencia de intrones, tal como el

Sh1-intrón o el intrón ADH, intermedio del promotor y la secuencia de nucleótidos de la presente invención. Lo mismo es válido para el término “fusionada” en relación con la presente invención que incluye una unión directa o indirecta. En
5 algunos casos, los términos no incluyen la combinación natural de la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína asociada normalmente con el promotor del gen silvestre y cuando ambos se encuentran en su ambiente natural.

El constructo puede, además, contener o expresar un
10 marcador que permite la selección de la construcción genética.

Para algunas aplicaciones el constructo comprende, preferentemente, al menos una secuencia de nucleótidos de la presente invención o una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que tiene las propiedades
15 específicas tal como se define en la presente descripción unido operativamente a un promotor.

Proteínas de fusión

La enzima para usar en la presente invención puede producirse como una proteína de fusión, por ejemplo, para
20 ayudar en la extracción y purificación de esta. Los ejemplos de colaboradores de proteínas de fusión incluyen glutatión-S-transferasa (GST), 6xHis, GAL4 (dominios de enlace a ADN y/o de activación transcripcional) y β -galactosidasa. Además, puede ser conveniente incluir un sitio de clivaje
25 proteolítico entre el colaborador de las proteínas de fusión

y la secuencia de interés de la proteína para permitir la eliminación de las secuencias de proteínas de fusión. Preferentemente, la proteína de fusión no impedirá la actividad de la secuencia de proteínas.

5 Los sistemas de expresión de fusión de genes en *E. coli* se han revisado en *Curr. Opin. Biotechnol.* (1995) 6(5):501-6.

La secuencia de aminoácidos de un polipéptido que tiene las propiedades específicas, tal como se define en la presente invención, puede estar unida a una secuencia no
10 natural para codificar una proteína de fusión. Por ejemplo, para la evaluación de las bibliotecas de péptidos para analizar agentes capaces de afectar la actividad de la sustancia puede ser útil codificar una sustancia quimérica que expresa un epítipo no natural que es reconocido por un
15 anticuerpo disponible comercialmente.

Ventajas

El método de la presente invención tiene muchas ventajas sobre el proceso de la materia anterior, que incluyen:

- Rendimiento de aceite mejorado a partir del
20 procesamiento del fruto de la palma;
- Rendimiento de aceite mejorado a partir del lodo después de la clarificación y/o decantación;
- Formación de lodo reducida, lo cual mejora la productividad de la planta y mejora el índice
25 de extracción de aceite;

- Una separación mejorada del aceite de palma crudo del lodo;
- La capacidad de hacer funcionar el clarificador o decantador a una temperatura inferior, lo que proporciona, por lo tanto, un consumo de energía reducido para el proceso;
- La disposición de un proceso más compatible con el medio ambiente (p. ej., se requieren menos hectáreas de tierra para plantaciones debido a los rendimientos aumentados);
- Pérdida reducida de aceite con respecto al extracto de fibra durante el procesamiento; y/o
- Viscosidad reducida del extracto del fruto de la palma prensado, lo que reduce, por lo tanto, el requerimiento de agua que se añadirá. Por lo tanto, la presente invención puede conducir a un proceso que consume menos agua.

Sin desear estar limitados por la teoría, se cree que los rendimientos de aceite altos pueden lograrse mediante el método de la presente invención debido a que desestabiliza o rompe la emulsión que se forma durante el procesamiento del extracto del fruto de la palma (p. ej., extracto del fruto de la palma prensado). Una emulsión se forma entre el aceite y el agua en el extracto, la emulsión puede ser relativamente estable. Al desestabilizar o romper esta emulsión puede recuperarse más

aceite. Sorprendentemente, se ha descubierto que el uso de las enzimas de acuerdo con la presente invención es una manera muy eficaz y eficiente (así como compatible con el medio ambiente) de mejorar significativamente los rendimientos del aceite de palma crudo de los extractos del fruto de la palma (tales como extractos del fruto de la palma prensados).

Una ventaja adicional es que el aceite obtenible (p. ej., obtenido) de los métodos y usos de acuerdo con la presente invención se separa más fácilmente y más rápido del líquido de palma prensado lo que reduce, por lo tanto, la cantidad de aceite en la corriente de residuos. Ventajosamente, esto permite que la capacidad de producción aumente. Otra ventaja es que el lodo contiene menos aceite, de manera que el aceite restante puede separarse más fácilmente en el separador.

La presente invención se describirá ahora, de manera ilustrativa solamente, con referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

EJEMPLOS

20

Ejemplo 1

Materiales y métodos

Aceite de palma crudo prensado de Paloh Palm Oil Mill,
Malasia

25 Obtenido del mesocarpio de palma prensado y digerido.

Contenido de agua: 64.6 %

Frutos de palma obtenidos de Dupont, Singapur

Enzimas:

5 Lysomax oil, lote. 1781679258, DuPont Industrial
Biosciences

Lecitase Ultra, producida por Novozymes, DK

Lipopan F, producida por Novozymes, DK

Fosfolipasa PLA2 Nagase, producida por Nagase, Japón

10 Lipomod 699L, fosfolipasa PLA2 pancreática, producidos
por Biocatalysts, Reino Unido

Fosfolipasa GL541, fosfolipasa PLA2 de Streptomyces
coelicolor expresada en Bacillus subtilis.

PLDa, fosfolipasa D de Streptomyces racemochromogenes,
expresada en Bacillus subtilis

15 PLDb, fosfolipasa D de Streptomyces avermitilis,
expresada en Bacillus subtilis

Procedimiento experimental

En los siguientes experimentos, se simuló el efecto de la
enzima en la separación de aceite de palma crudo. Se graduó
20 10 gramos de aceite de palma crudo en una vaso Wheaton. Se
añadió una barra magnética y la muestra se calentó hasta 50 °C
en un bloque de calentamiento, cuando la temperatura alcanzó
50 °C se añadió la enzima. Para la comparación experimental se
añadió un volumen pequeño de agua para obtener el mismo
25 volumen total de enzima + agua añadida. La muestra se incubó

durante 2 horas a 50 °C con agitación magnética, 450 rpm. Después de 2 horas de incubación la muestra se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 ml. La muestra se calentó hasta 95 °C en un baño de agua durante 10 minutos para inactivar la
 5 enzima. Después de la inactivación de la enzima, las muestras se evaluaron visualmente y se midió el volumen de la fase oleosa separada. El efecto del tratamiento con enzima se calculó como el % de aceite separado.

Experimento 1

10 En este experimento se probó una cantidad de enzimas comerciales, Lipopan F, Lecitase Ultra, PLA2 Nagase y una PLA 2 (GL541) experimental de *Streptomyces violaceoruber* en aceite de palma crudo prensado, y se comparó con el efecto de una aciltransferasa, LysoMax Oil (Tabla 1)

Tabla 1 Prueba de enzimas con actividad sobre fosfolípidos en aceite de palma crudo

		1	2	3	4	5	6	7	8
Crude Palm Oil	g	10	10	10	10	10	10	10	10
LysoMax Oil,	μl		200	20					
diluted 1:10									
Lecitase Ultra	μl				200				
1:10									
Lipopan F 1:10	μl					200			
Nagase	μl						200	20	

Phospholipase PLA2

Phospholipase µl 200

GL541

Water µl 200 0 180 0 0 0 180 0

Los procedimientos experimentales se realizaron tal como se describe en el Procedimiento experimental.

El efecto de la aciltransferasa y las diferentes fosfolipasas en la separación de aceite se ilustra en la Figura 5 68, y la cantidad de aceite separado se calcula en la Tabla 2.

Tabla 2 Separación de aceite de muestras de aceite de palma crudo (ver la Tabla 5)

	LysoMax	Lecitase	Lipopan	PLA2	GL541,	Capa de
	Oil	Ultra	F	Nagase	PLA2	aceite
muestra	%	%	%	%	%	%
1						9,1
2	0,2					28,0
3	0,02					21,0
4		0,2				10,0
5			0,2			23,0
6				2		22,0
7				0,2		24,0
8					2	18,0

Los resultados en la Figura 68 y la Tabla 2 confirman que las diferentes fosfolipasas, PLA1 y PLA2, tienen un

impacto en la separación de aceite de palma crudo prensado con hasta 24 % de fase oleosa libre, pero estas enzimas no fueron tan eficaces como LysoMax Oil que proporcionó 28 % de fase oleosa libre. La Lecitase Ultra tuvo, además, un
 5 impacto en la separación de aceite de palma crudo prensado.

Experimento 2

En este experimento se probaron otros tipos de fosfolipasas, que incluyen la fosfolipasa D, en aceite de palma crudo prensado y se compararon con aciltransferasa
 10 Lysomax Oil de acuerdo con las fórmulas en la Tabla 3.

Tabla 3 Prueba de fosfolipasas en aceite de palma crudo

		1	2	3	4	5
Crude Palm Oil	g	10	10	10	10	
LysoMax Oil,	μl		200			
diluted 1:10						
PLDa	μl			200		
PLDb	μl				200	
Lipomod 699L	μl					200
Water	μl	200	0	0	0	0

Los procedimientos experimentales se realizaron tal como se describe en el Procedimiento experimental.

15 El efecto de la enzima probada se muestra en la Figura 69 y la Tabla 4.

Tabla 4. Separación de aceite de muestras de aceite de palma crudo

Muestra	LysoMax Oil	PLDa	PLDb	Lipomod 600L	Capa de aceite
	%	%	%	%	%
1					7,9
2	0,2				27,5
3		2			8,9
4			2		11,0
5				2	26,5

Los resultados del experimento (Figura 69, Tabla 4) confirmaron que aciltransferasa, LysoMax Oil y fosfolipasa PLA2, Lipomod 699L tienen un fuerte impacto en la separación de aceite. La fosfolipasa D tiene, además, un efecto en la separación de aceite.

Experimento 3

En este experimento la Lecitase Ultra se probó en diferentes dosificaciones (Tabla 5), y las muestras de aceite después de la inactivación de la enzima se almacenaron a 60 °C durante 2 horas y se midió la separación de aceite.

Tabla 5

		1	2	3
Aceite de palma crudo	g	10	10	10
Lecitase ultra, núm. 3108	µl	0	10	5

Lecitase Ultra	%	0	0,1	0,05
----------------	---	---	-----	------

La cantidad de aceite separado después de la inactivación térmica y después del almacenamiento a 60 °C se midió con los resultados en la Tabla 6 y la Figura 70.

5 Tabla 6.

Separación de aceite		1	2	3
Después de la inactivación				
térmica	%	7,6	14,0	13,2
Después de 60 min a 60 °C	%	11,0	15,7	14,0
Después de 120 min a 60 °C	%	10,8	16,8	13,3

Los resultados indican que una dosificación de 0,1 % de Lecitase Ultra es la mejor en condiciones de prueba. Se observa, además, que en esta dosificación de enzimas la separación de aceite aumenta ligeramente durante el almacenamiento a 60 °C

Conclusión

Las diferentes fosfolipasas comerciales PLA1 y PLA2, y las muestras experimentales de PLD se probaron en aceite de palma crudo prensado con respecto al impacto en la separación de aceite y se compararon con el efecto de la aciltransferasa Lysomax Oil.

El experimento confirmó que Lysomax Oil tiene un fuerte impacto en la capacidad del aceite de separarse del fluido

prensado por la gravedad. La fosfolipasa comercial Lipopan F, Lipomod 699 y PLA2 Nagase tuvieron, además, un fuerte impacto en la separación de aceite. La Lecitasa Ultra, otra fosfolipasa comercialmente disponible tiene, además, un
 5 impacto en la separación de aceite. Además, la PLD tuvo un impacto en la capacidad del aceite de separarse del aceite de palma crudo prensado.

Ejemplo 2

10 Materiales y métodos

Aceite de palma crudo prensado de Malasia

Obtenido del mesocarpio de palma prensado y digerido

Contenido de agua 64,6 %

Frutos de palma obtenidos de Dupont Singapur

15 Contenido de agua 35 %.

Enzimas:

Lysomax oil, lote. 1781679258, DuPont Industrial Biosciences

Protex 15L, lote 1681480658, DuPont Industrial Biosciences

20 G-ZYME G999, lote 4862079064, DuPont Industrial Biosciences

Protex 50FP, lote A011161002, DuPont Industrial Biosciences

Procedimiento experimental

En los siguientes experimentos, se simuló el efecto de la enzima en la separación de aceite de palma crudo. Se graduó 10 gramos de aceite de palma crudo en una vaso Wheaton. Se
 5 añadió una barra magnética y la muestra se calentó hasta 50 °C en un bloque de calentamiento. Cuando la temperatura alcanzó 50 °C se añadió la enzima. Para la comparación experimental se añadió un volumen pequeño de agua para obtener el mismo volumen total. La muestra se incubó durante 2 horas a 50 °C con
 10 agitación magnética, 450 rpm. Después de 2 horas de incubación la muestra se transfirió a un tubo de centrífuga de 15 ml. La muestra se calentó hasta 95 °C en un baño de agua durante 10 minutos para inactivar la enzima. Después de la inactivación de la enzima, las muestras se evaluaron visualmente y se midió
 15 el volumen de la fase oleosa separada. El efecto del tratamiento con enzima se calculó como el % de aceite separado.

Experimento 1

En el primer experimento, una lípido aciltransferasa (LysoMax Oil), una proteasa (Protex 15L) y una
 20 lisofosfolipasa (G-ZYME G999) se probaron en un diseño de factor, tal como se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7

1	2	3	4	5	6	7	8
---	---	---	---	---	---	---	---

Aceite de palma crudo	g	10	10	10	10	10	10	10	10
LysoMax Oil	μl		100		100		100		100
Protex 15L	μl			100	100			100	100
G-ZYME G999	μl					100	100	100	100
Agua	μl	300	200	200	100	200	100	100	0

Las muestras se prepararon de acuerdo con el procedimiento mencionado en el procedimiento experimental.

Después de la inactivación térmica de las enzimas, las muestras se compararon visualmente (Figura 71) y se midió el % de volumen de aceite separado (Tabla 8)

Tabla 8 Evaluación de la separación de aceite después de la inactivación de la enzima

Muestra No	LysoMax Oil, %	Protex 15L, %	G-ZYME G999, %	Capa de aceite, %
1	0	0	0	5,0
2	1	0	0	25,0
3	0	1	0	8,2
4	1	1	0	18,0
5	0	0	1	6,6
6	1	0	1	11,5
7	0	1	1	6,7
8	1	1	1	7,4

Los resultados que se muestran en la Tabla 8 y la Figura 71 indican, claramente, que el tratamiento con

enzimas tuvo un impacto en la separación de aceite. La muestra tratada con LysoMax Oil mostró resultados mucho mejores que las muestras tratadas con otras enzimas.

Experimento 2

5 El efecto de LysoMax Oil en la separación de aceite de aceite de palma crudo se investigó con una dosificación de enzima inferior de 1 % hasta 0,01 %. En este experimento se probó, además, otra proteasa, Protex 50FP, en las fórmulas que se muestran en la Tabla 9.

10

Tabla 9

		1	2	3	4	5	6	7
Aceite de palma crudo	g	10	10	10	10	10	10	10
LysoMax Oil	μl		100					
Lysomax Oil diluido 1:10	μl			200	100	50	10	
Protex 50 FP diluido 1:10	μl							100
Agua	μl	200	100	0	100	150	190	100

LysoMax Oil	%	0	1	0,2	0,1	0,05	0,01
-------------	---	---	---	-----	-----	------	------

Los procedimientos experimentales se realizaron tal como se describe en el Procedimiento experimental.

15 El efecto del tratamiento con enzimas en la separación de aceite se ilustra en la Figura 72 y la cantidad de aceite separado se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10 Separación de aceite de aceite de palma crudo
después de la inactivación de la enzima

Muestra	LysoMax Oil, %	Protex 50FP %	% Aceite
1	0		8,3
2	1		29,0
3	0,2		27,4
4	0,1		28,4
5	0,05		28,6
6	0,01		20,6
7		0,1	9,6

Los resultados en la Figura 72 y la Tabla 10 confirmaron que LysoMax Oil tuvo un impacto significativo en la separación de aceite. La dosificación inferior de enzima proporcionó la misma separación de aceite hasta 0,05 % de LysoMax Oil.

Experimento 3

En este experimento se investigó el efecto de LysoMax Oil en la separación de aceite como una función de almacenamiento a 60 °C (Tabla 11). En este experimento no se añadió agua para ajustar volúmenes diferentes de adición de enzima.

Tabla 11.

		1	2	3	4	5
Aceite de palma crudo	g	10	10	10	10	10
LysoMax Oil	μl	0	100	50	10	5

Los procedimientos experimentales se realizaron tal como se describe en Procedimientos experimentales mencionado anteriormente con la modificación de que, después de la inactivación de la enzima, las muestras se colocaron en una cabina de calentamiento a 60 °C, y la cantidad de aceite separado se midió después de 1 y 2 horas.

El efecto de Lysomax Oil en la separación de aceite se ilustra en la Figura 73.

Se midió la cantidad de aceite separado después de la
10 inactivación térmica, después del almacenamiento a 60 °C y
con los resultados en la Tabla 12.

Tabla 12.

Separación de aceite	1	2	3	4	5
Después de la inactivación térmica	% 7,6	29,3	29,7	14,1	16,5
Después de 60 min a 60 °C	% 11,0	30,7	30,1	16,5	20,7
Después de 120 min a 60 °C	% 10,8	30,2	30,2	17,6	23,0

El experimento confirmó que Lysomax Oil tiene un fuerte
15 impacto en la capacidad del aceite de separarse del fluido
prensado por la gravedad. La mayor parte del aceite (29,3 %) ya se separa después de 10 minutos de inactivación térmica y durante el almacenamiento a 60 °C no se separa mucho más aceite. El control sin enzima añadida solamente proporcionó

7,6 % de separación de aceite, pero durante el almacenamiento esta aumentó a aproximadamente 11 %.

La adición de 1 % o 0,5 % de LysoMax Oil proporcionó la misma separación de aceite. Los resultados confirmaron que el
5 aceite prensado tratado con Lysomax Oil proporcionó una separación de aceite mejorada significativa e inmediata.

Conclusión

La aciltransferasa, liso-fosfolipasa y proteasa, se probaron en aceite de palma crudo con respecto al impacto en
10 la separación de aceite.

Los experimentos mostraron que la aciltransferasa, LysoMax Oil, tuvo sorprendentemente un fuerte impacto en la separación de aceite. Sin desear estar limitados por la teoría, el efecto altamente ventajoso de la aciltransferasa
15 LysoMax Oil podría explicarse por el hecho de que esta enzima en lugar de producir ácidos grasos libres cataliza una reacción de transferencia a otros componentes en el aceite de palma crudo, tales como fitosteroles.

20 Ejemplo 3

Materiales

Lodo de la palma, 'flujo inferior' obtenido de Malasia

Enzimas:

LysoMax Oil, lote 1781679258, DuPont Industrial
25 Biosciences

G-ZYME G999, lote 4862079064, DuPont Industrial Biosciences

Procedimientos experimentales

Se graduó 10 gramos de flujo inferior de lodo en un vaso
5 Wheaton de 20 ml y se calentó hasta 50 °C con agitación magnética.

Se añadieron las enzimas y la muestra se incubó a 50 °C durante 2 horas con agitación.

La muestra se transfirió a un tubo de centrífuga de
10 15 ml y se centrifugó a 48 rcf y 60 °C durante 5 minutos. La muestra se evaluó visualmente.

La muestra se centrifugó, después, a 3050 rcf durante 10 minutos.

La muestra se evaluó visualmente y se midió la
15 separación de aceite.

Después de la centrifugación se drenó la capa de líquido superior y se aisló el sedimento.

El peso del sedimento se determinó gravimétricamente.

Experimento 1

20 El efecto de la aciltransferasa, LysoMax Oil y la lisofosfolipasa G-ZYME G99 se probó en un diseño factorial como se muestra en la Tabla 13.

La prueba se realizó tal como se describe en los Procedimientos experimentales (mencionados anteriormente).

Tabla 13.

		1	2	3
Flujo inferior, lodo	g	10	10	10
LysoMax Oil	μl		100	
G-ZYME G999	μl			100
Agua	μl	300	200	200

Después de la reacción enzimática, las muestras se transfirieron a tubos de centrifuga de 15 ml. La viscosidad de las muestras fue, sin embargo, muy diferente, por lo que para las muestras con alta viscosidad se transfirió menos producto a los tubos debido a que era difícil vaciar el vaso Wheaton.

Las muestras se muestran en la Figura 75 después de una primera centrifugación a 48 rcf durante 5 minutos.

LysoMax Oil y G-ZYME G999 tuvieron, además, un efecto positivo en la separación de aceite.

Después de una segunda centrifugación a 3050 rcf durante 10 min a 60 °C (Figura 76) el volumen del aceite se midió en relación con el volumen total. La fase líquida superior se drenó del sedimento. Y el peso del sedimento se determinó en relación con la cantidad total de la muestra.

La cantidad de aceite separado del lodo se ve afectada por el tratamiento con enzimas, y G-zyne G999 y LysoMax contribuyeron a una mayor separación de aceite ver la Figura 76 y (Tabla 14).

Tabla 14. Separación de aceite después del tratamiento con enzimas del lodo de palma.

Test no	LysoMax Oil %	G-ZYME G999 %	Capa de aceite %
1	0	0	3,9
2	1	0	5,0
3	0	1	4,4

Experimento 2

El efecto de la enzima en la viscosidad del flujo inferior de lodo de palma se probó de acuerdo con las fórmulas de la Tabla 15.

Tabla 15

		1	2
Flujo inferior, lodo.	g	10	10
LysoMax Oil	μl		100
Agua	μl	100	0
Viscosidad, 24 °C	mPa.s	2,31	1,98

El experimento se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito en los Procedimientos experimentales (mencionado anteriormente).

Después de 2 horas de incubación, las enzimas en las muestras se inactivaron al colocar las muestras en un baño

de agua a 95 °C durante 10 minutos. Después de enfriar hasta temperatura ambiente las muestras se centrifugaron a 15 rcf durante 5 minutos. La viscosidad de la fase acuosa se midió a 24 °C.

5 El lípido en las muestras tratadas con enzimas se analizó por cromatografía en capa fina (TLC, por sus siglas en inglés) y se determinó la cantidad de fosfolípidos en el lodo (Tabla 16).

10 Tabla 16 Determinación por TLC de fosfatidilcolina (PC) fosfatidilinositol (PI), ácido fosfatídico (PA) y fosfatidiletanolamina (PE) en lodo tratado con enzimas.

		PC	PI	PA	PE
Prueba		ppm	ppm	ppm	ppm
1	Control	65,3	12,0	20,8	18,5
2	LysoMax Oil	0,0	0,0	0,0	0,0

El análisis por TLC confirma que el lodo de palma contiene fosfolípidos y que LysoMax Oil tiene la capacidad de degradar completamente los fosfolípidos.

Conclusión

Uno de los desafíos en la producción de aceite de palma es aislar el aceite del agua y de otros materiales en el clarificador. El aceite crudo procedente de la prensa de aceite contiene aceite, agua y otro material vegetal lo cual puede crear una emulsión bastante estable. Esta emulsión

puede retrasar, o incluso evitar la separación de aceite, y provocará la pérdida de aceite.

En el estudio actual se investigó el efecto de diferentes enzimas en la separación de aceite de la fase
5 acuosa (lodo). Aciltransferasa (LysoMax Oil) y lisofosfolipasa (G-Zyme G999) mejoraron la separación de aceite.

Todas las publicaciones mencionadas en la especificación anterior se incorporan en la presente descripción como referencia. Varias modificaciones y
10 variaciones de los métodos y el sistema descritos en la presente invención resultarán evidentes para los experimentados en la materia sin apartarse del alcance y espíritu de la presente invención. Aunque la presente invención se ha descrito en relación con modalidades
15 preferidas específicas, debe comprenderse que la invención tal como se reivindica no debe limitarse indebidamente a tales modalidades específicas. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la presente invención que son obvias para los expertos en
20 bioquímica y biotecnología o campos relacionados pretenden estar dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente
25 descripción de la invención.