

**MODIFICACIÓN ENZIMÁTICA MEJORADA DE FOSFOLÍPIDOS EN ALIMENTOS****CAMPO TÉCNICO**

La presente invención se refiere a fosfolipasas y a su uso en la fabricación de alimentos. La presente invención se refiere además a métodos de preparación de masa y productos horneados usando fosfolipasas.

**ANTECEDENTES**

Se conoce bien el uso de lipasas en la masa del pan. Por ejemplo, en el documento de patente EP0585988 se muestra que la adición de lipasa a la masa proporcionó un efecto anti-enranciamiento en el pan horneado a partir de la misma. El documento de patente WO94/04035 enseña que se puede obtener una blandura mejorada añadiendo una lipasa a la masa. También se ha mostrado que las lipasas exógenas pueden modificar el volumen del pan.

Aunque se han descrito lipasas, que incluyen fosfolipasas, por sus propiedades positivas en la preparación de masa y productos horneados, el rendimiento de las lipasas del estado de la técnica tiene muchos inconvenientes debido a que las lipasas del estado de la técnica han tenido, en general, múltiples actividades, que reducen o eliminan el posible efecto beneficioso de la lipasa. Por tanto, hoy en día, todavía existe la necesidad en algunas aplicaciones para alimentos, en particular, en el horneado, de lipasas mejoradas que tengan mayor especificidad.

**SUMARIO DE LA INVENCION**

Según un aspecto de la presente invención, se presenta un polipéptido aislado que comprende una fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde dicha fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.02 y/o una relación de actividad NALPE/NAPE inferior a 0.12. Opcionalmente, la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5 o 99/1. Opcionalmente, la relación de

especificidad sn1/sn2 es entre 65-85/20-30 o entre 75-95/5-15. Opcionalmente, la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 74/26 o 89/11.

Opcionalmente, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 o 0.001. Opcionalmente, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es entre 65-85/15-35. Opcionalmente, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5 o 99/1. Opcionalmente, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 74/26. Opcionalmente, la relación de actividad NALPE/NAPE es inferior a 0.12 y la relación de especificidad sn1/sn2 es entre 75-95/5-25. Opcionalmente, la relación de actividad NALPE/NAPE es inferior a 0.12 y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 89/11.

Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6

Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta un método de preparación de una masa, comprendiendo el método mezclar un componente de masa seleccionado del grupo que consiste en harina, sal, agua, azúcar, grasa, lecitina, aceite, emulsionante y levadura con un polipéptido aislado que comprende una fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde dicha fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.02, preferentemente inferior a 0.01 y/o una relación de actividad NALPE/NAPE inferior a 0.12. Opcionalmente, la relación de especificidad sn1/sn2 es entre 65-85/15-35 o entre 75-95/5-25. Opcionalmente, la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5 o 99/1. Opcionalmente, la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 74/26 o 89/11. Opcionalmente, el emulsionante se selecciona del grupo que consiste en i) emulsionantes de fosfolípido tales como lecitina o lisolecitina; o ii) un emulsionante no de fosfolípido tal como DATEM, un monoglicérido o un diglicérido.

Opcionalmente, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 o 0.001. Opcionalmente, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es entre 70-80/20-30. Opcionalmente, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5 o 99/1. Opcionalmente, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 74/26. Opcionalmente, la relación de actividad NALPE/NAPE es inferior a 0.12 y la relación de especificidad sn1/sn2 es entre 85-95/5-15. Opcionalmente, la relación de actividad NALPE/NAPE es inferior a 0.12 y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 89/11.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta una masa que comprende una enzima fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde la fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.02, preferentemente inferior a 0.01 y/o una relación de actividad NALPE/NAPE inferior a 0.12. Opcionalmente, la masa tiene extensibilidad y/o estabilidad mejoradas, por ejemplo cuando se compara con una masa que no comprende una enzima fosfolipasa A1 de la presente invención. En otro aspecto, se proporciona una masa que comprende una enzima como se describe en el presente documento.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta un método de preparación de un producto horneado, en el que se hornea una masa como se ha descrito anteriormente. En otro aspecto de la presente invención, se presenta un producto horneado. Opcionalmente, el producto horneado tiene al menos una propiedad mejorada seleccionada del grupo que consiste en tamaño de poro de la miga mejorado, uniformidad mejorada de las burbujas de gas,

ausencia de separación entre la corteza y la miga, elevado volumen, elevada cualidad de crujiente de la corteza y leva en el horno mejorada. Opcionalmente, la propiedad mejorada es la elevada cualidad de crujiente de la corteza. Opcionalmente, dicha propiedad mejora cuando se compara con un producto horneado preparado a partir de una masa que no comprende una enzima fosfolipasa A1 de la presente invención. En otro aspecto, se proporciona un producto horneado que comprende una enzima como se describe en el presente documento, o que se prepara a partir de una masa que comprende una enzima como se describe en el presente documento.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta una premezcla para hornear que comprende harina y una enzima fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde la fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.02, preferentemente inferior a 0.01 y/o una relación de actividad NALPE/NAPE inferior a 0.12. En otro aspecto, se proporciona una premezcla para hornear que comprende una enzima como se describe en el presente documento. En otro aspecto de la presente invención, se presenta un mejorador del horneado que comprende un granulado o polvo aglomerado que comprende una enzima fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde la fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.02, preferentemente inferior a 0.01 y/o una relación de actividad NALPE/NAPE inferior a 0.12. En otro aspecto, se proporciona un mejorador del horneado que comprende un granulado o polvo aglomerado que comprende una enzima como se describe en el presente documento.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta un método de preparación de una masa como se expone anteriormente, pero en el que se incluye al menos una enzima adicional útil para

mejorar la masa y/o un producto horneado fabricado a partir de la misma. Opcionalmente, la enzima adicional se selecciona del grupo que consiste en amilasa, ciclodextrina glucanotransferasa, peptidasa, transglutaminasa, lipasa, galactolipasa, fosfolipasa que es diferente de dicha fosfolipasa A1, celulasa, hemicelulasa, proteasa, proteína disulfuro isomerasa, glucosiltransferasa, peroxidasa, lipoxigenasa, lacasa y oxidasa. Opcionalmente, la amilasa es una exoamilasa. Opcionalmente, la exoamilasa es una amilasa maltogénica. Opcionalmente, la exoamilasa es una amilasa no maltogénica. Opcionalmente, la amilasa no maltogénica hidroliza el almidón por escisión de uno o más malto-oligosacáridos lineales, que comprenden predominantemente cuatro a ocho unidades de D-glucopiranosilo, desde los extremos no reductores de las cadenas laterales de amilopectina. Opcionalmente, la enzima adicional es una fosfolipasa. Opcionalmente, la enzima adicional tiene actividad de galactolipasa. Opcionalmente, la enzima adicional es una fosfolipasa que comprende SEQ ID NO: 17 y/o SEQ ID NO: 18.

En otro aspecto de la presente invención, un método de modificación de un emulsionante de fosfolípido que comprende tratamiento del emulsionante con una enzima fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde la fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.01. Opcionalmente, el emulsionante de fosfolípido es lecitina o lisolecitina.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta un método de creación de un lisofosfolípido en una matriz alimentaria que contiene lípidos que comprende añadir a la matriz alimentaria que contiene lípidos una enzima fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde la fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.01. Opcionalmente, la matriz alimentaria que contiene lípidos se

selecciona del grupo que consiste en huevos y productos alimenticios que contienen huevos, masa para artículos de pastelería, carne procesada, productos basados en leche, aceite vegetal y artículos de pastelería, que incluyen pasteles y galletas.

Opcionalmente, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.019, 0.018, 0.017, 0.016, 0.015, 0.014, 0.013, 0.012, 0.011 o 0.010.

Opcionalmente, la relación de actividad relación de actividad NALPE/NAPE es inferior a 0.11, 0.10, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 o 0.001.

En otro aspecto de la invención, se presenta un método de preparación de una masa como antes, pero que tiene además la etapa de añadir un emulsionante. Opcionalmente, el emulsionante se selecciona del grupo que consiste en i) emulsionantes de fosfolípido tales como lecitina o lisolecitina; o ii) un emulsionante no de fosfolípido tal como DATEM, un monoglicérido o un diglicérido. DATEM está disponible, por ejemplo, con el nombre comercial Panodan®.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido aislado que comprende una enzima fosfolipasa A1 que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que

comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Opcionalmente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6. Opcionalmente, la enzima fosfolipasa A1 puede consistir en o consistir esencialmente en SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS SECUENCIAS BIOLÓGICAS**

**SEQ ID NO: 1** expone la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la variante de fosfolipasa de *Trichoderma harzianum* (CRC08310 de longitud completa).

**SEQ ID NO: 2** expone la secuencia de aminoácidos madura predicha de la variante de fosfolipasa de *Trichoderma harzianum* (CRC08310 madura predicha).

**SEQ ID NO: 3** - expone la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la variante de fosfolipasa de *Pestalotiopsis fici* (CRC08316 de longitud completa).

**SEQ ID NO: 4** expone la secuencia de aminoácidos madura predicha de la variante de fosfolipasa de *Pestalotiopsis fici* (CRC08316 madura predicha).

**SEQ ID NO: 5** - expone la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la variante de fosfolipasa de *Metarhizium guizhouense* (también conocido como *Metarhizium anisopliae*) (CRC08319 de longitud completa).

**SEQ ID NO: 6** expone la secuencia de aminoácidos madura predicha de la variante de fosfolipasa de *Metarhizium guizhouense* (también conocida como *Metarhizium anisopliae*) (CRC08319 madura predicha).

**SEQ ID NO: 7** - expone la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la variante de fosfolipasa de *Diaporthe ampelina* (CRC08405 de longitud completa).

**SEQ ID NO: 8**: expone la secuencia de aminoácidos madura predicha de la variante de fosfolipasa de *Diaporthe ampelina* (CRC08405 madura predicha).

**SEQ ID NO: 9** - expone la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la variante de fosfolipasa de *Magnaporthe oryzae* (CRC08418 de longitud completa).

**SEQ ID NO: 10** expone la secuencia de aminoácidos madura predicha de la variante de fosfolipasa de *Magnaporthe oryzae* (CRC08418 madura predicha).

**SEQ ID NO: 11** - expone la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la variante de fosfolipasa de *Neonectria ditissima* (CRC08826 de longitud completa).

**SEQ ID NO: 12** expone la secuencia de aminoácidos madura predicha de la variante de fosfolipasa de *Neonectria ditissima* (CRC08826 madura predicha).

**SEQ ID NO: 13** expone la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la variante de fosfolipasa de *Trichoderma gamsii* (CRC08833 de longitud completa).

**SEQ ID NO: 14** expone la secuencia de aminoácidos madura predicha de la variante de fosfolipasa de *Trichoderma gamsii* (CRC08833 madura predicha).

**SEQ ID NO: 15** - expone la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la variante de fosfolipasa de *Metarhizium anisopliae* (CRC08845 de longitud completa).

**SEQ ID NO: 16** expone la secuencia de aminoácidos madura predicha de la variante de fosfolipasa de *Metarhizium anisopliae* (CRC08845 madura predicha).

**SEQ ID NO: 17** - expone la secuencia de aminoácidos madura de una fosfolipasa A1 usada en el producto comercial Powerbake 4080.

**SEQ ID NO: 18** - expone la secuencia de aminoácidos de longitud completa de una fosfolipasa A1 usada en el producto comercial Lipopan F.

**SEQ ID NO: 19** - expone la secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de CRC08310 de longitud completa.

**SEQ ID NO: 20** - expone la secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de CRC08316 de longitud completa.

**SEQ ID NO: 21** - expone la secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de CRC08319 de longitud completa.

**SEQ ID NO: 22** - expone la secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de CRC08405 de longitud completa.

**SEQ ID NO: 23** - expone la secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de CRC08418 de longitud completa.

**SEQ ID NO: 24** - expone la secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de CRC08826 de longitud completa.

**SEQ ID NO: 25** - expone la secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de CRC08833 de longitud completa.

**SEQ ID NO: 26** - expone la secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de CRC08845 de longitud completa.

#### **DESCRIPCIÓN DE FIGURAS**

La Figura 1A representa el volumen específico de panecillos ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) presentado en función de la dosis óptima de Lipopan F (dosis relativa basada en mg de proteína/kg de harina).

La Figura 1B representa el volumen específico de panecillos ( $\text{cm}^3/\text{g}$ ) presentado en función de la dosis de CRC08319.

**¡Error! Fuente de referencia no encontrada.**A representa el perfil de lípidos de la masa usando Lipopan F.

**¡Error! Fuente de referencia no encontrada.**B representa el perfil de lípidos de la masa usando CRC08319.

La Figura 3 representa el volumen específico relativo de esponja y masa como efecto de 'CRC08319 + Powerbake 4080' con y sin presencia de SOLEC F

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

La práctica de las presentes enseñanzas empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular y bioquímica, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook et al., 1989); Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, ed., 1984; Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel et al., eds., 1994); PCR: The Polymerase Chain Reaction (Mullis et al., eds., 1994); Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual (Kriegler, 1990) y The Alcohol Textbook (Ingledew et al., eds., Quinta Edición, 2009), y Essentials of Carbohydrate Chemistry and Biochemistry (Lindhorste, 2007).

A menos que se defina de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenecen las presentes enseñanzas. Singleton, et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology, segunda ed., John Wiley and Sons, New York (1994), y Hale & Markham, The Harper Collins Dictionary of Biology, Harper Perennial, NY (1991), proporcionan a un experto un diccionario general de muchos de los términos usados en la presente invención. Se puede usar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de las presentes enseñanzas.

Los intervalos numéricos proporcionados en el presente documento incluyen los números que definen el intervalo.

**ABREVIATURAS**

NAPE - N-acilfosfatidiletanolamina

NALPE - N-acil-lisofosfatidiletanolamina

NAGPE - N-acilglicerofosfoetanolamina

DGDG - digalactosildiglicérido

DGMG - digalactosilmonoglicérido

MGDG - monogalactosildiglicérido

MGMG - monogalactosilmonoglicérido

PC - fosfatidilcolina

LPC - lisofosfatidilcolina

PLA - fosfolipasa A

DATEM - éster de ácido diacetiltartárico de mono- y diglicéridos

**DEFINICIONES**

Los términos "no mutante", "parental" o "referencia", con respecto a un polipéptido, se refieren a un polipéptido que existe de forma natural que no incluye una sustitución, inserción o delección artificial en una o más posiciones de aminoácidos. Similarmente, los términos "no mutante", "parental" o "referencia", con respecto a un polinucleótido, se refieren a un polinucleótido que existe de forma natural que no incluye un cambio de nucleósido artificial. Sin embargo, obsérvese que un polinucleótido que codifica un polipéptido no mutante, parental o de referencia no se limita a un polinucleótido que ocurre naturalmente, y engloba cualquier polinucleótido que codifique el polipéptido no mutante, parental o de referencia.

Se entiende que referencia al polipéptido no mutante incluye la forma madura del polipéptido. Un polipéptido "maduro" o variante del mismo es uno en el que una secuencia señal está ausente, por ejemplo, escindida de una forma inmadura del polipéptido durante o tras la expresión del polipéptido.

El término "variante", con respecto a un polipéptido, se refiere a un polipéptido que se diferencia de un polipéptido no mutante, parental o de referencia especificado en el que se incluye una o más sustituciones, inserciones o deleciones que existen de forma natural o artificiales de un aminoácido. Similarmente, el término "variante", con respecto a un polinucleótido, se refiere a un polinucleótido que se diferencia en la secuencia de nucleótidos de un polinucleótido no mutante, parental o de referencia especificado. La identidad del polipéptido o polinucleótido no mutante, parental o de referencia será evidente del contexto.

El término "recombinante", cuando se usa en referencia a una célula del sujeto, ácido nucleico, proteína o vector, indica que el sujeto se ha modificado de su estado nativo. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos en diferentes niveles o en diferentes condiciones a las encontradas en la naturaleza. Los ácidos nucleicos recombinantes se diferencian de una secuencia nativa por uno o más nucleótidos y/o están operativamente unidos a secuencias heterólogas, por ejemplo, un promotor heterólogo en un vector de expresión. Las proteínas recombinantes se pueden diferenciar de una secuencia nativa por uno o más aminoácidos y/o están fusionadas con secuencias heterólogas. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa es un vector recombinante.

Los términos "recuperado", "aislado" y "separado" se refieren a un compuesto, proteína (polipéptidos), célula, ácido nucleico, aminoácido, u otro material o componente especificado que se retira de al menos otro material o componente con el que está naturalmente asociado como se encuentra en la naturaleza. Un polipéptido "aislado" del mismo incluye, pero no se limita a, un

caldo de cultivo que contiene polipéptido secretado expresado en una célula hospedadora heteróloga.

El término "purificado" se refiere a material (por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido aislado) que está en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente 90 % puro, al menos aproximadamente 95 % puro, al menos aproximadamente 98 % puro, o incluso al menos aproximadamente 99 % puro.

El término "enriquecido" se refiere a material (por ejemplo, un polipéptido o polinucleótido aislado) que es aproximadamente 50 % puro, al menos aproximadamente 60 % puro, al menos aproximadamente 70 % puro, o incluso al menos aproximadamente 70 % puro.

Un "intervalo de pH", con referencia a una enzima, se refiere al intervalo de valores de pH bajo el que la enzima presenta actividad catalítica.

Los términos "pH estable" y "estabilidad de pH", con referencia a una enzima, se refieren a la capacidad de la enzima para retener la actividad durante un amplio intervalo de valores de pH durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 15 min, 30 min, 1 hora).

El término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo de los términos "polipéptido", "proteína" y "péptido", y se usan indistintamente. Donde dichas secuencias de aminoácidos presenten actividad, se pueden denominar una "enzima". Se usan los códigos convencionales de una letra o tres letras para restos de aminoácidos convencionales, estando las secuencias de aminoácidos presentadas en la orientación estándar de extremo amino a carboxi (es decir, N→C).

El término "ácido nucleico" engloba ADN, ARN, heterodúplex y moléculas sintéticas capaces de codificar un polipéptido. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, y pueden ser modificaciones químicas. Los términos "ácido nucleico" y "polinucleótido" se usan indistintamente. Debido a que el código

genético está degenerado, se puede usar más de un codón para codificar un aminoácido particular, y las presentes composiciones y métodos engloban secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos particular. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de ácidos nucleicos se presentan en la orientación 5' a 3'.

"Hibridación" se refiere al proceso por el que una cadena de ácido nucleico forma un dúplex con, es decir, pares de bases con, una cadena complementaria, como ocurre durante las técnicas de hibridación por transferencia y las técnicas de PCR. Se ejemplifican condiciones de hibridación rigurosas por hibridación en las siguientes condiciones: 65 °C y 0.1X SSC (donde 1X SSC = NaCl 0.15 M, citrato de Na<sub>3</sub> 0.015 M, pH 7.0). Los ácidos nucleicos dúplex hibridados se caracterizan por una temperatura de fusión ( $T_m$ ), donde la mitad de los ácidos nucleicos hibridados no están apareados con la cadena complementaria. Los nucleótidos desapareados dentro del dúplex reducen la  $T_m$ . Condiciones de hibridación muy rigurosas implican 68 °C y 0.1X SSC

Se produce una molécula "sintética" por síntesis química o enzimática *in vitro* en vez de por un organismo.

Los términos "transformado", "establemente transformado" y "transgénico", usados con referencia a una célula, significan que la célula contiene una secuencia de ácidos nucleicos no nativa (por ejemplo, heteróloga) integrada en su genoma o llevada como un episoma que se mantiene a través de múltiples generaciones.

El término "introducido", en el contexto de insertar una secuencia de ácidos nucleicos en una célula, significa "transfección", "transformación" o "transducción", como se conoce en la técnica.

Una "cepa hospedadora" o "célula hospedadora" es un organismo en el que se ha introducido un vector de expresión, fago, virus, u otra construcción de ADN, que incluye un polinucleótido que codifica un polipéptido de interés (por ejemplo, una fosfolipasa).

Las cepas hospedadoras a modo de ejemplo son células de microorganismos (por ejemplo, bacterias, hongos filamentosos y levadura) capaces de expresar el polipéptido de interés. El término "célula hospedadora" incluye protoplastos creados a partir de células.

El término "heterólogo", con referencia a un polinucleótido o proteína, se refiere a un polinucleótido o proteína que no ocurre naturalmente en una célula hospedadora.

El término "endógeno", con referencia a un polinucleótido o proteína, se refiere a un polinucleótido o proteína que ocurre naturalmente en la célula hospedadora.

El término "expresión" se refiere al proceso por el que un polipéptido se produce basándose en una secuencia de ácidos nucleicos. El proceso incluye tanto transcripción como traducción.

Un "marcador selectivo" o "marcador de selección" se refiere a un gen capaz de ser expresado en un hospedador para facilitar la selección de células hospedadoras que llevan el gen. Los ejemplos de marcadores de selección incluyen, pero no se limitan a, antimicrobianos (por ejemplo, higromicina, bleomicina o cloranfenicol) y/o genes que confieren una ventaja metabólica, tal como una ventaja nutricional a la célula hospedadora.

Un "vector" se refiere a una secuencia de polinucleótidos diseñada para introducir ácidos nucleicos en uno o más tipos de células. Los vectores incluyen vectores de clonación, vectores de expresión, vectores lanzadera, plásmidos, partículas de fago, casetes y similares.

Un "vector de expresión" se refiere a una construcción de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un polipéptido de interés, secuencia codificante que está operativamente unida a una secuencia de control adecuada capaz de efectuar la expresión del ADN en un hospedador adecuado. Dichas secuencias de control pueden incluir un promotor para efectuar la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia

que codifica sitios de unión al ribosoma adecuados en el ARNm, potenciadores y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción.

El término "operativamente unido" significa que componentes especificados están en una relación (que incluye, pero no se limita a, yuxtaposición) que les permite funcionar de una manera prevista. Por ejemplo, una secuencia reguladora está operativamente unida a una secuencia codificante de forma que la expresión de la secuencia codificante esté bajo el control de las secuencias reguladoras.

Una "secuencia señal" es una secuencia de aminoácidos unida a la porción del extremo N de una proteína, que facilita la secreción de la proteína fuera de la célula. La forma madura de una proteína extracelular carece de la secuencia señal, que se escinde durante el proceso de secreción.

"Biológicamente activo" se refiere a una secuencia que tiene una actividad biológica especificada, tal como una actividad enzimática.

El término "actividad específica" se refiere al número de moles de sustrato que se pueden convertir en producto por una enzima o preparación de enzima por unidad tiempo en condiciones específicas. La actividad específica se expresa, en general, como unidades (U)/mg de proteína. Alternativamente, actividad específica se puede referir al número de moles de producto generados por una enzima de la preparación de enzima por unidad de tiempo en condiciones específicas.

Como se usa en el presente documento, "porcentaje de identidad de secuencia" significa que una secuencia particular tiene al menos un cierto porcentaje de restos de aminoácidos idéntico a aquellos en una secuencia de referencia especificada, cuando se alinea usando el algoritmo CLUSTAL W con parámetros por defecto. Véase Thompson et al. (1994) Nucleic Acids Res. 22:4673-4680. Los parámetros por defecto para el algoritmo CLUSTAL W son:

Penalización por abertura de hueco: 10.0  
Penalización por extensión de hueco: 0.05  
Matriz de peso de proteína: serie BLOSUM  
Matriz de peso de ADN: IUB  
% de retraso de secuencias divergentes: 40  
Distancia de separación de huecos: 8  
Peso de transiciones de ADN: 0.50  
Lista de restos hidrófilos: GPSNDQEKR  
Uso de matriz negativa: DESACTIVADO  
Alternar penalizaciones específicas por restos: ACTIVADO  
Alternar penalizaciones hidrófilas: ACTIVADO  
Alternar penalización por separación de huecos terminales:  
DESACTIVADO

Las deleciones se cuentan como restos no idénticos, en comparación con una secuencia de referencia. Están incluidas las deleciones que ocurren en cualquier extremo. Por ejemplo, una variante con deleciones de cinco aminoácidos del extremo C del polipéptido maduro de 617 restos tendría un porcentaje de identidad de secuencia de 99 % (612 / 617 restos idénticos x 100, redondeado al número entero más próximo) con respecto al polipéptido maduro. Dicha variante estaría englobada por una variante que tiene "al menos 99 % de identidad de secuencia" con un polipéptido maduro.

Secuencias de polipéptidos "fusionadas" están conectadas, es decir, operativamente unidas, por un enlace peptídico entre dos secuencias de polipéptidos objeto.

El término "hongos filamentosos" se refiere a todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycotina, particularmente especies de Pezizomycotina.

Como se usa en el presente documento, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen tanto referentes singulares como plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo.

Los términos "que comprende", "comprende" y "comprendido de", como se usan en el presente documento, son sinónimos de "que incluye", "incluye" o "que contiene", "contiene", y son inclusivos o de extremos abiertos y no excluyen miembros adicionales no citados, elementos o etapas del método. Se apreciará que los términos "que comprende", "comprende" y "comprendido de", como se usan en el presente documento, comprenden los términos "que consiste en", "consiste" y "consiste en".

La relación de intervalos numéricos por puntos extremos incluye todos los números y fracciones incorporados dentro de los intervalos respectivos, así como los puntos extremos enumerados.

El término "alrededor de" o "aproximadamente", como se usa en el presente documento cuando se refiere a un valor medible tal como un parámetro, una cantidad, una duración temporal, y similares, significa que engloba variaciones de  $\pm 10\%$  o menos, preferentemente  $\pm 5\%$  o menos, más preferentemente  $\pm 1\%$  o menos, y todavía más preferentemente  $\pm 0.1\%$  o menos de y desde el valor especificado, en la medida en que dichas variaciones son apropiadas para llevar a cabo la invención desvelada. Se debe entender que el valor al que se refiere el modificador "alrededor de" o "aproximadamente" también se desvela en sí mismo específicamente, y preferentemente.

Aunque los términos "uno o más" o "al menos uno", tal como uno o más o al menos un miembro(s) de un grupo de miembros, es en sí evidente, por medio de ejemplificación adicional, el término engloba, entre otros, una referencia a uno cualquiera de dichos miembros, o a cualesquiera dos o más de dichos miembros, tales como, por ejemplo, cualquiera  $>3$ ,  $>4$ ,  $>5$ ,  $>6$  o  $>7$ , etc., de dichos miembros, y hasta todos los miembros dichos.

Todas las referencias citadas en la presente memoria descriptiva se incorporan por este documento como referencia en su totalidad. En particular, se incorporan como referencia las

enseñanzas de todas las referencias denominadas específicamente en el presente documento.

A menos que se defina de otro modo, todos los términos usados en desvelar la invención, que incluyen términos técnicos y científicos, tienen el significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente invención. Por medio de orientación adicional, se incluyen definiciones de términos para apreciar mejor la enseñanza de la presente invención.

Como se usa en el presente documento, el término "lipasa" se refiere a triacilglicerol lipasas como se definen por la entrada de enzimas EC 3.1.1.3. Las lipasas catalizan la hidrólisis de los triacilgliceroles dando ácidos grasos libres (saturados o insaturados), diacilgliceroles, monoacilgliceroles y glicerol.

Como se usa en el presente documento, el término "fosfolipasa" se refiere a una enzima que hidroliza fosfolípidos en ácidos grasos (saturados o insaturados), lisofosfolípidos, diacilgliceroles, fosfato de colina y fosfatidatos, dependiendo del sitio de hidrólisis. Las fosfolipasas se clasifican adicionalmente en los tipos A, B, C y D.

Como se usa en el presente documento, el término "fosfolipasa A" se refiere a enzimas que catalizan la hidrólisis del enlace éster de los componentes de ácido graso de fosfolípidos. Existen dos tipos diferentes de actividad de fosfolipasa A que se pueden distinguir. La fosfolipasa A1, como se define en la entrada de enzima EC 3.1.1.32, y la fosfolipasa A2, como se define en la entrada de enzima EC 3.1.1.4, catalizan la desacilación de un grupo acilo graso en las posiciones sn1 y sn2, respectivamente, de un diacilglicerofosfolípido para producir lisofosfolípido.

La fosfolipasa A1 y A2 catalizan la desacilación de un grupo ácido graso en las posiciones sn1 y sn2, respectivamente. Por tanto, la fosfolipasa A1 (también denominada algunas veces en el presente documento PLA1) hidroliza el grupo 1-acilo de un

fosfolípido, hidrolizando el enlace entre el ácido graso y el resto de glicerina en la posición uno. La fosfolipasa A2 (también denominada algunas veces en el presente documento PLA2) cataliza la hidrólisis del grupo 2-acilo.

La hidrólisis de un fosfolípido por una fosfolipasa produce un compuesto denominado un lisofosfolípido. Así, la hidrólisis selectiva de un fosfolípido con una fosfolipasa A1 produce un 2-acil-lisofosfolípido. La hidrólisis de un fosfolípido con una fosfolipasa A2 produce un 1-acil-lisofosfolípido. Otra fosfolipasa es una "lisofosfolipasa" que cataliza la hidrólisis del grupo acilo graso restante en el lisofosfolípido.

Como se usa en el presente documento, la expresión "una relación de especificidad sn1/sn2" se define aquí como la actividad relativa de PLA1 dividida entre la actividad relativa de PLA2 como se expone más completamente más adelante.

Como se usa en el presente documento, la expresión "una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa" significa (LPC-U/mg de proteína) / (PC-U/mg de proteína) como se expone más completamente más adelante.

Como se usa en el presente documento, la expresión "una relación de actividad NALPE/NAPE" significa (NALPE-U/mg de proteína) / (NAPE-U/mg de proteína) como se expone más completamente más adelante.

Otras definiciones se exponen más adelante.

### **Mutaciones adicionales**

En algunas realizaciones, las presentes fosfolipasas incluyen además una o más mutaciones que proporcionan un beneficio de rendimiento o de estabilidad adicional. Los beneficios de rendimiento a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, aumento de la estabilidad térmica, aumento de la estabilidad durante el almacenamiento, aumento de la solubilidad, un perfil de pH alterado, aumento de la actividad específica, especificidad por sustrato modificada, unión a sustrato modificada, actividad

dependiente del pH modificada, estabilidad dependiente del pH modificada, aumento de la estabilidad oxidativa y aumento de la expresión. En algunos casos, el beneficio del rendimiento se realiza a una temperatura relativamente baja. En algunos casos, el beneficio del rendimiento se realiza a temperatura relativamente alta.

Además, las presentes fosfolipasas pueden incluir cualquier número de sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones de aminoácidos conservativas a modo de ejemplo se enumeran en la Tabla 1.

| <i>Para el aminoácido</i> | <i>Código</i> | <i>Sustituir con cualquiera de</i>                                        |
|---------------------------|---------------|---------------------------------------------------------------------------|
| Alanina                   | A             | D-Ala, Gly, beta-Ala, L-Cys, D-Cys                                        |
| Arginina                  | R             | D-Arg, Lys, D-Lys, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, Ile, D-Met, D-Ile, Om, D-Om |
| Asparagina                | N             | D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln                                 |
| Ácido aspártico           | D             | D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln                                 |
| Cisteína                  | C             | D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr                                   |
| Glutamina                 | Q             | D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp                                 |
| Ácido glutámico           | E             | D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln                                 |
| Glicina                   | G             | Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, b-Ala, Acp                                        |
| Isoleucina                | I             | D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met                                 |
| Leucina                   | L             | D-Leu, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met                                 |

|              |   |                                                                                                           |
|--------------|---|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Lisina       | K | D-Lys, Arg, D-Arg, homo-Arg, D-homo-Arg, Met, D- Met, Ile, D-Ile, Om, D-Om                                |
| Metionina    | M | D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val                                                       |
| Fenilalanina | F | D-Phe, Tyr, D-Thr, L-Dopa, His, D-His, Trp, D-Trp, Trans-3,4, o 5-fenilprolina, cis-3,4, o 5-fenilprolina |
| Prolina      | P | D-Pro, ácido L-I-tioazolidin-4-carboxílico, ácido D- o L-1-oxazolidin-4-carboxílico                       |
| Serina       | S | D-Ser, Thr, D-Thr, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), L-Cys, D-Cys                                   |
| Treonina     | T | D-Thr, Ser, D-Ser, allo-Thr, Met, D-Met, Met(O), D-Met(O), Val, D-Val                                     |
| Tirosina     | Y | D-Tyr, Phe, D-Phe, L-Dopa, His, D-His                                                                     |
| Valina       | V | D-Val, Leu, D-Leu, lie, D-Ile, Met, D-Met                                                                 |

**Tabla 1.** Sustituciones de aminoácidos conservativas

El lector apreciará que algunas de las mutaciones conservativas anteriormente mencionadas se pueden producir por manipulación genética, mientras que otras se producen introduciendo aminoácidos sintéticos en un polipéptido por genética u otros medios.

La presente fosfolipasa puede ser "precursora", "inmadura" o "de longitud completa", en cuyo caso incluyen una secuencia señal, o "madura", en cuyo caso carecen de una secuencia señal y pueden estar además truncadas en el extremo N y/o C por procesamiento

proteolítico y/o no proteolítico. En general, las formas maduras de los polipéptidos son generalmente las más útiles. A menos que se indique lo contrario, la numeración de restos de aminoácidos usada en el presente documento se refiere a las formas maduras de los polipéptidos de fosfolipasa respectivos. Los presentes polipéptidos de fosfolipasa también pueden estar truncados para retirar los extremos N o C, mientras que los polipéptidos resultantes retienen la actividad de fosfolipasa. Además, las enzimas fosfolipasa pueden ser fragmentos activos derivados de una secuencia de aminoácidos más larga. Los fragmentos activos se caracterizan por retener alguna o toda la actividad de la enzima de longitud completa, pero tienen deleciones desde el extremo N, desde el extremo C, o internamente, o combinaciones de los mismos.

La presente fosfolipasa puede ser un polipéptido "quimérico" o "híbrido", en el que se incluye al menos una porción de un primer polipéptido de fosfolipasa, y al menos una porción de un segundo polipéptido de fosfolipasa. La presente fosfolipasa puede incluir además secuencia señal heteróloga, un epítotope para permitir el seguimiento o purificación, o similares. Las secuencias señal heterólogas a modo de ejemplo son de amilasa de *B. licheniformis* (LAT), *B. subtilis* (AmyE o AprE) y CelA de *Streptomyces*.

#### **Producción de fosfolipasas de variante**

La presente fosfolipasa se puede producir en células hospedadoras, por ejemplo, por secreción o expresión intracelular. Se puede obtener un material de célula cultivada (por ejemplo, un caldo de células completas) que comprende una fosfolipasa tras la secreción de la fosfolipasa en el medio celular. Opcionalmente, la fosfolipasa se puede aislar de las células hospedadoras, o incluso aislar del caldo celular, dependiendo de la pureza deseada de la fosfolipasa final. Se puede clonar y expresar un gen que codifica una fosfolipasa según métodos bien conocidos en la técnica. Las células hospedadoras adecuadas incluyen células bacterianas,

fúngicas (que incluyen levadura y hongos filamentosos) y vegetales (que incluyen algas). Las células hospedadoras particularmente útiles incluyen *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* o *Trichoderma reesei*. Otras células hospedadoras incluyen células bacterianas, por ejemplo, *Bacillus subtilis* o *B. licheniformis*, así como *Streptomyces*, *E. coli*.

La célula hospedadora puede expresar además un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa homóloga o heteróloga, es decir, una fosfolipasa que no es de la misma especie que la célula hospedadora, o una o varias de otras enzimas. La fosfolipasa puede ser una fosfolipasa de variante. Además, el hospedador puede expresar una o más enzimas accesorias, proteínas, péptidos.

### **Vectores**

Se puede construir una construcción de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa para ser expresada en una célula hospedadora. Debido a la degeneración bien conocida en el código genético, se pueden diseñar y preparar con habilidad rutinaria polinucleótidos de variante que codifican una secuencia de aminoácidos idéntica. También es muy conocido en la técnica optimizar el uso de codones para una célula hospedadora particular. Se pueden incorporar en un vector ácidos nucleicos que codifican fosfolipasa. Se pueden preferir vectores a una célula hospedadora usando técnicas de transformación bien conocidas, tales como las desveladas más adelante.

El vector puede ser cualquier vector que se pueda transformar en y replicar dentro de una célula hospedadora. Por ejemplo, un vector que comprende un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa se puede transformar y replicar en una célula hospedadora bacteriana como medio de propagación y amplificación del vector. El vector también se puede transformar en un hospedador de expresión, de manera que los ácidos nucleicos codificantes se puedan expresar en fosfolipasa funcional. Células hospedadoras que sirven de hospedadores de la expresión pueden

incluir hongos filamentosos, por ejemplo. El Catálogo de Cepas del Fungal Genetics Stock Center (FGSC) lista vectores adecuados para la expresión en células hospedadoras fúngicas. Véase FGSC, Catalogue of Strains, Universidad de Missouri, en [www.fgsc.net](http://www.fgsc.net) (última modificación 17 de enero de 2007). Un vector representativo es pJG153, un vector de expresión Cre sin promotor que puede ser replicado en un hospedador bacteriano. Véase Harrison et al. (junio de 2011) *Applied Environ. Microbiol.* 77: 3916-22. pJG153 se puede modificar con habilidad rutinaria para comprender y expresar un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa.

Un ácido nucleico que codifica una fosfolipasa se puede unir operativamente a un promotor adecuado, que permite la transcripción en la célula hospedadora. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que muestre actividad transcripcional en la célula hospedadora de elección y se puede obtener de genes que codifican proteínas ya sean homólogas o heterólogas a la célula hospedadora. Los promotores a modo de ejemplo para dirigir la transcripción de la secuencia de ADN que codifica una fosfolipasa, especialmente en un hospedador bacteriano, son el promotor del operón lac de *E. coli*, los promotores del gen *dagA* o *celA* del gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de  $\alpha$ -amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, los promotores de  $\alpha$ -amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, etc. Para la transcripción en un hospedador fúngico, ejemplos de promotores útiles son los derivados del gen que codifica TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*,  $\alpha$ -amilasa neutra de *Aspergillus niger*,  $\alpha$ -amilasa estable ácida de *A. niger*, glucoamilasa de *A. niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *A. oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *A. oryzae*, o acetamidasa de *A.*

*nidulans*. Cuando un gen que codifica una fosfolipasa se expresa en una especie bacteriana tal como *E. coli*, se puede seleccionar un promotor adecuado, por ejemplo, de un promotor de bacteriófago que incluye un promotor T7 y un promotor de fago lambda. Los ejemplos de promotores adecuados para la expresión en una especie de levadura incluyen, pero no se limitan a, los promotores Gal 1 y Gal 10 de *Saccharomyces cerevisiae* y los promotores AOX1 o AOX2 de *Pichia pastoris*. *cbhI* es un promotor inducible endógeno de *Trichoderma reesei*. Véase Liu et al. (2008) "Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*cbhI*) promoter optimization", *Acta Biochim. Biophys. Sin (Shanghai)* 40(2): 158-65.

La secuencia codificante puede estar operativamente unida a una secuencia señal. El ADN que codifica la secuencia señal puede ser la secuencia de ADN naturalmente asociada al gen de fosfolipasa a expresar o de un género o especie diferente. Se puede introducir una secuencia señal y una secuencia promotora que comprende una construcción de ADN o vector en una célula hospedadora fúngica y se puede obtener de la misma fuente. Por ejemplo, la secuencia señal es la secuencia señal de *cbhI* que está operativamente unida a un promotor de *cbhI*.

Un vector de expresión también puede comprender un terminador de la transcripción adecuado y, en eucariotas, secuencias de poliadenilación operativamente unidas a la secuencia de ADN que codifica una fosfolipasa de variante. Las secuencias de terminación y de poliadenilación se pueden obtener adecuadamente de las mismas fuentes que el promotor.

El vector puede comprender además una secuencia de ADN que permite que el vector se replique en la célula hospedadora. Los ejemplos de dichas secuencias son los orígenes de replicación de plásmidos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 y pIJ702.

El vector también puede comprender un marcador de selección, por ejemplo, un gen cuyo producto complementa un defecto en la

célula hospedadora aislada, tal como los genes *dal* de *B. subtilis* o *B. licheniformis*, o un gen que confiere resistencia a antibióticos tal como, por ejemplo, resistencia a ampicilina, kanamicina, cloranfenicol o tetraciclina. Además, el vector puede comprender marcadores de selección de *Aspergillus* tales como *amdS*, *argB*, *niaD* y *xxsC*, un marcador que da lugar a resistencia a higromicina, o la selección se puede llevar a cabo por cotransformación, tal como se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, la solicitud PCT internacional WO 91/17243.

Puede ser ventajosa la expresión intracelular en algunos aspectos, por ejemplo, cuando se usan ciertas bacterias u hongos como células hospedadoras para producir grandes cantidades de fosfolipasa para el posterior enriquecimiento o purificación. También se puede usar la secreción extracelular de fosfolipasa en el medio de cultivo para hacer que un material de célula cultivada comprenda la fosfolipasa aislada.

El vector de expresión normalmente incluye los componentes de un vector de clonación, tales como, por ejemplo, un elemento que permite la replicación autónoma del vector en el organismo hospedador seleccionado y uno o más marcadores fenotípicamente detectables para fines de selección. El vector de expresión normalmente comprende secuencias de nucleótidos de control tales como un promotor, operador, sitio de unión al ribosoma, señal de inicio de la traducción y opcionalmente un gen represor o uno o más genes activadores. Además, el vector de expresión puede comprender una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos capaz de dirigir la fosfolipasa a un orgánulo de célula hospedadora tal como un peroxisoma, o a un compartimento particular de la célula hospedadora. Dicha secuencia de direccionamiento incluye, pero no se limita a, la secuencia SKL. Para la expresión bajo la dirección de secuencias de control, la secuencia de ácidos nucleicos de la fosfolipasa está

operativamente unida a las secuencias de control en un modo apropiado con respecto a la expresión.

Los procedimientos usados para ligar la construcción de ADN que codifica una fosfolipasa, el promotor, terminador y otros elementos, respectivamente, y para insertarlos en vectores adecuados que contienen la información necesaria para la replicación, se conocen bien por expertos en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2<sup>a</sup> ed., Cold Spring Harbor, 1989, y 3<sup>a</sup> ed., 2001).

#### **Transformación y cultivo de células hospedadoras**

Se usa ventajosamente una célula aislada, tanto que comprende una construcción de ADN como un vector de expresión, como célula hospedadora en la producción recombinante de una fosfolipasa. La célula se puede transformar con la construcción de ADN que codifica la enzima, convenientemente por integración de la construcción de ADN (en una o más copias) en el cromosoma del hospedador. Esta integración se considera que es, en general, una ventaja, ya que es lo más probable que la secuencia de ADN sea establemente mantenida en la célula. La integración de las construcciones de ADN en el cromosoma del hospedador se puede realizar según métodos convencionales, por ejemplo, por recombinación homóloga o heteróloga. Alternativamente, la célula se puede transformar con un vector de expresión como se ha descrito anteriormente a propósito de los diferentes tipos de células hospedadoras.

Los ejemplos de organismos hospedadores bacterianos adecuados son especies bacterianas Gram-positivas tales como Bacillaceae que incluyen *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Geobacillus* (anteriormente *Bacillus*) *stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis*; especies de *Streptomyces* tales como *Streptomyces murinus*; especies lácticas y bacterianas

que incluyen *Lactococcus* sp. tales como *Lactococcus lactis*; *Lactobacillus* sp. que incluyen *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc* sp.; *Pediococcus* sp.; y *Streptococcus* sp. Alternativamente, se pueden seleccionar como organismo hospedador cepas de una especie bacteriana Gram-negativa que pertenece a *Enterobacteriaceae* que incluyen *E. coli*, o a *Pseudomonadaceae*.

Se puede seleccionar un organismo hospedador de levadura adecuado de especies de levadura biotecnológicamente relevantes tales como, pero no se limitan a, especies de levadura tales como especies de *Pichia* sp., *Hansenula* sp. o *Kluyveromyces*, *Yarrowinia*, *Schizosaccharomyces* o una especie de *Saccharomyces*, que incluye *Saccharomyces cerevisiae* o una especie que pertenece a *Schizosaccharomyces* tal como, por ejemplo, especies de *S. pombe*. Se puede usar una cepa de la especie de levaduras metilotróficas, *Pichia pastoris*, como organismo hospedador. Alternativamente, el organismo hospedador puede ser una especie de *Hansenula*. Los organismos hospedadores adecuados entre los hongos filamentosos incluyen especies de *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tubingensis*, *Aspergillus awamori* o *Aspergillus nidulans*. Alternativamente, se pueden usar como organismo hospedador cepas de una especie de *Fusarium*, por ejemplo, *Fusarium oxysporum* o de una especie de *Rhizomucor* tal como *Rhizomucor miehei*. Otras cepas adecuadas incluyen especies de *Thermomyces* y *Mucor*. Además, se puede usar *Trichoderma* sp. como hospedador. Un procedimiento adecuado para la transformación de células hospedadoras de *Aspergillus* incluye, por ejemplo, el descrito en el documento de patente EP 238023. Una fosfolipasa expresada por una célula hospedadora fúngica puede estar glucosilada, es decir, comprenderá un resto glucosilo. El patrón de glucosilación puede ser igual o diferente al presente en la fosfolipasa no mutante. El tipo y/o grado de glucosilación puede conferir cambios en propiedades enzimáticas y/o bioquímicas.

Puede ser ventajoso delecionar genes de hospedadores de la expresión, donde la deficiencia de genes se puede curar por el vector de expresión transformado. Se pueden usar métodos conocidos para obtener una célula hospedadora fúngica que tiene uno o más genes inactivados. La inactivación génica se puede llevar a cabo por delección completa o parcial, por inactivación por inserción o por cualquier otro medio que convierta un gen no funcional para su fin previsto, de forma que se prevenga que el gen exprese una proteína funcional. Se puede delecionar cualquier gen de un hospedador fúngico filamentoso de *Trichoderma sp.* u otro hospedador fúngico filamentoso que se haya clonado, por ejemplo, los genes *cbh1*, *cbh2*, *egl1* y *egl2*. Se puede llevar a cabo la delección génica insertando una forma del gen que se desea inactivar en un plásmido por métodos conocidos en la técnica.

La introducción de una construcción de ADN o vector en una célula hospedadora incluye técnicas tales como transformación; electroporación; microinyección nuclear; transducción; transfección, por ejemplo, transfección mediada por lipofección y mediada por DEAE-dextrina; incubación con precipitado de fosfato de calcio-ADN; bombardeo a alta velocidad con microproyectiles recubiertos de ADN; y fusión de protoplastos. Se conocen en la técnica técnicas de transformación general. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. (2001), arriba. La expresión de proteína heteróloga en *Trichoderma* se describe, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N° 6,022,725. También se hace referencia a Cao et al. (2000) Science 9:991-1001 para la transformación de cepas de *Aspergillus*. Se pueden construir transformantes genéticamente estables con sistemas de vector por el cual el ácido nucleico que codifica una fosfolipasa se integra establemente en un cromosoma de la célula hospedadora. Entonces se seleccionan transformantes y se purifican por técnicas conocidas.

La preparación de *Trichoderma sp.* para la transformación puede implicar, por ejemplo, la preparación de protoplastos de

micelios fúngicos. Véase Campbell et al. (1989) Curr. Genet. 16: 53-56. Los micelios se pueden obtener de esporas vegetativas germinadas. Los micelios se tratan con una enzima que digiere la pared celular, dando como resultado protoplastos. Los protoplastos se protegen por la presencia de un estabilizador osmótico en el medio de suspensión. Estos estabilizadores incluyen sorbitol, manitol, cloruro de potasio, sulfato de magnesio y similares. Normalmente, la concentración de estos estabilizadores varía entre 0.8 M y 1.2 M, por ejemplo, se puede usar una disolución 1.2 M de sorbitol en el medio de suspensión.

La captación de ADN en la cepa hospedadora de *Trichoderma sp.* depende de la concentración de ion calcio. En general, se usa  $\text{CaCl}_2$  entre aproximadamente 10-50 mM en una disolución de captación. Compuestos adecuados adicionales incluyen un sistema tampón, tal como tampón TE (Tris 10 mM, pH 7.4; EDTA 1 mM) o MOPS 10 mM, pH 6.0 y polietilenglicol. Se cree que el polietilenglicol fusiona las membranas celulares, permitiendo así administrar el contenido del medio en el citoplasma de la cepa de *Trichoderma sp.* Esta fusión deja frecuentemente múltiples copias del ADN de plásmido integradas en el cromosoma del hospedador.

Normalmente, la transformación de *Trichoderma sp.* usa protoplastos o células que han sido sometidas a un tratamiento de permeabilidad, normalmente a una densidad de  $10^5$  a  $10^7/\text{ml}$ , particularmente  $2 \times 10^6/\text{ml}$ . Se puede mezclar un volumen de 100  $\mu\text{l}$  de estos protoplastos o células en una disolución apropiada (por ejemplo, sorbitol 1.2 M y  $\text{CaCl}_2$  50 mM) con el ADN deseado. En general, se añade una alta concentración de PEG a la disolución de captación. Se pueden añadir desde 0.1 hasta 1 volumen de 25 % de PEG 4000 a la suspensión de protoplastos; sin embargo, es útil añadir aproximadamente 0.25 volúmenes a la suspensión de protoplastos. También se pueden añadir aditivos, tales como sulfóxido de dimetilo, heparina, espermidina, cloruro de potasio y similares, a la disolución de captación para facilitar la

transformación. Están disponibles procedimientos similares para otras células hospedadoras fúngicas. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 6,022,725.

### **Expresión**

Un método de producción de una fosfolipasa puede comprender cultivar una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente en condiciones propicias para la producción de la enzima y la recuperación de la enzima de las células y/o medio de cultivo.

El medio usado para cultivar las células puede ser cualquier medio convencional adecuado para cultivar la célula hospedadora en cuestión y obtener la expresión de una fosfolipasa. Están disponibles medios adecuados y componentes de medios de proveedores comerciales, o se pueden preparar según recetas publicadas (por ejemplo, como se describe en los catálogos de la Colección Americana de Cultivos Tipo).

Se puede usar una enzima secretada de las células hospedadoras en un caldo preparación completo. En los presentes métodos, se puede lograr la preparación de un caldo de fermentación completo gastado de un microorganismo recombinante usando cualquier método de cultivo conocido en la técnica que dé como resultado la expresión de una fosfolipasa. Por tanto, se puede entender que la fermentación comprende cultivo en matraz oscilante, fermentación a pequeña o gran escala (incluyendo fermentaciones continuas, discontinuas, de lotes alimentados o en estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizadas en un medio adecuado y en condiciones que permiten que la fosfolipasa se exprese o aísle. El término "caldo de fermentación completo gastado" se define en el presente documento como los contenidos no fraccionados de material de fermentación que incluye medio de cultivo, proteínas extracelulares (por ejemplo, enzimas) y biomasa celular. Se entiende que el término "caldo de fermentación completo gastado" también engloba biomasa

celular que ha sido lisada o permeabilizada usando métodos bien conocidos en la técnica.

Una enzima secretada de las células hospedadoras se puede recuperar convenientemente del medio de cultivo por procedimientos bien conocidos, que incluyen separar las células del medio por centrifugación o filtración, y precipitar los componentes proteínicos del medio por medio de una sal tal como sulfato de amonio, seguido por el uso de procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, o similares. El polinucleótido que codifica una fosfolipasa en un vector se puede unir operativamente a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificante por la célula hospedadora, es decir, el vector es un vector de expresión. Las secuencias de control se pueden modificar, por ejemplo, mediante la adición de elementos reguladores de la transcripción adicionales para hacer que el nivel de transcripción dirigido por las secuencias de control sea más sensible a moduladores transcripcionales. Las secuencias de control pueden comprender en particular promotores.

Se pueden cultivar células hospedadoras en condiciones adecuadas que permiten la expresión de una fosfolipasa. La expresión de las enzimas puede ser constitutiva de forma que sean continuamente producidas, o inducible, que requiere un estímulo para iniciar la expresión. En el caso de expresión inducible, la producción de proteínas se puede iniciar cuando se requiera por, por ejemplo, la adición de una sustancia inductora al medio de cultivo, por ejemplo dexametasona o IPTG o Sophorose. También se pueden producir recombinantemente polipéptidos en un sistema sin células *in vitro*, tal como el sistema de reticulocitos de conejo TNT™ (Promega).

También se puede cultivar un hospedador de la expresión en el medio apropiado para el hospedador, en condiciones aerobias. Se puede proporcionar agitación o una combinación de agitación y

aireación, ocurriendo la producción a la temperatura apropiada para ese hospedador, por ejemplo, desde aproximadamente 25 °C hasta aproximadamente 75 °C (por ejemplo, 30 °C hasta 45 °C), dependiendo de las necesidades del hospedador y la producción de la fosfolipasa deseada. El cultivo puede ocurrir desde aproximadamente 12 hasta aproximadamente 100 horas o más (y cualquier valor de horas entremedias, por ejemplo, desde 24 hasta 72 horas). Normalmente, el caldo de cultivo está a un pH de aproximadamente 4.0 a aproximadamente 8.0, nuevamente dependiendo de las condiciones de cultivo necesarias para el hospedador con respecto a la producción de una fosfolipasa.

#### **Métodos de enriquecimiento y purificación de fosfolipasas**

Se conocen bien en la técnica las técnicas de fermentación, separación y concentración y se pueden usar métodos convencionales para preparar una disolución que contiene polipéptidos de fosfolipasa.

Después de la fermentación, se obtiene un caldo de fermentación, se retiran las células microbianas y diversos sólidos suspensos, que incluyen materiales de fermentación en bruto residuales, por técnicas de separación convencionales para obtener una disolución de fosfolipasa. En general, se usan filtración, centrifugación, microfiltración, filtración en tambor giratorio a vacío, ultrafiltración, centrifugación seguido por ultrafiltración, extracción, o cromatografía, o similares.

Se desea concentrar una disolución que contiene polipéptido de fosfolipasa para optimizar la recuperación. El uso de disoluciones no concentradas requiere un elevado tiempo de incubación para recoger el precipitado de enzimas enriquecido o purificado.

Se concentra la disolución que contiene enzima usando técnicas de concentración convencionales hasta que se obtiene el nivel de enzima deseado. La concentración de la disolución que contiene enzima se puede lograr por cualquiera de las técnicas

tratadas en el presente documento. Los métodos de enriquecimiento y purificación a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, filtración y/o ultrafiltración a vacío giratoria.

La disolución de enzima se concentra en una disolución concentrada de enzima hasta que la actividad enzimática de la disolución concentrada que contiene polipéptido de fosfolipasa esté a un nivel deseado.

La concentración se puede realizar usando, por ejemplo, un agente de precipitación, tal como un agente de precipitación de haluro metálico. Los agentes de precipitación de haluro metálico incluyen, pero no se limitan a, cloruro de metal alcalino, bromuros de metal alcalino y mezclas de dos o más de estos haluros metálicos. Los haluros metálicos a modo de ejemplo incluyen cloruro sódico, cloruro de potasio, bromuro sódico, bromuro de potasio y mezclas de dos o más de estos haluros metálicos. También se puede usar como conservante el agente de precipitación de haluros metálicos, cloruro sódico.

El agente de precipitación de haluros metálicos se usa en una cantidad eficaz para precipitar una fosfolipasa. La selección de al menos una cantidad eficaz y una cantidad óptima de haluro metálico eficaz para provocar la precipitación de la enzima, así como las condiciones de la precipitación para la recuperación máxima que incluyen tiempo de incubación, pH, temperatura y concentración de enzima, serán rápidamente evidentes para un experto habitual en la técnica, después de pruebas rutinarias.

Generalmente, se añaden al menos aproximadamente 5 % p/v (peso/volumen) a aproximadamente 25 % p/v de haluro metálico a la disolución concentrada de enzima, y normalmente al menos 8 % p/v. En general, se añaden no más de aproximadamente 25 % p/v de haluro metálico a la disolución concentrada de enzima y normalmente no más de aproximadamente 20 % p/v. La concentración óptima del agente de precipitación de haluro metálico dependerá, entre otros,

de la naturaleza del polipéptido de fosfolipasa específica y de su concentración en la disolución concentrada de enzima.

Otra forma alternativa para precipitar la enzima es usar compuestos orgánicos. Los agentes precipitantes de compuesto orgánico a modo de ejemplo incluyen: ácido 4-hidroxibenzoico, sales de metales alcalinos de ácido 4-hidroxibenzoico, ésteres alquílicos de ácido 4-hidroxibenzoico, y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. La adición de los agentes de precipitación de compuesto orgánico puede tener lugar antes de, simultáneamente con, o posterior a la adición del agente de precipitación de haluro metálico, y la adición de ambos agentes de precipitación, compuesto orgánico y haluro metálico, se puede llevar a cabo secuencialmente o simultáneamente.

Generalmente, los agentes de precipitación orgánicos se seleccionan del grupo que consiste en sales de metales alcalinos de ácido 4-hidroxibenzoico, tales como sales de sodio o potasio, y ésteres de alquilo lineal o ramificado de ácido 4-hidroxibenzoico, en donde el grupo alquilo contiene desde 1 hasta 12 átomos de carbono, y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. Los agentes de precipitación de compuesto orgánico pueden ser, por ejemplo, ésteres de alquilo lineal o ramificado de ácido 4-hidroxibenzoico, en donde el grupo alquilo contiene desde 1 hasta 10 átomos de carbono, y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. Los compuestos orgánicos a modo de ejemplo son ésteres de alquilo lineal de ácido 4-hidroxibenzoico, en donde el grupo alquilo contiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono, y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. También se pueden usar ésteres metílicos de ácido 4-hidroxibenzoico, ésteres propílicos de ácido 4-hidroxibenzoico, éster butílico de ácido 4-hidroxibenzoico, éster etílico de ácido 4-hidroxibenzoico y mezclas de dos o más de estos compuestos orgánicos. Compuestos orgánicos adicionales también incluyen, pero no se limitan a, éster metílico de ácido 4-hidroxibenzoico (denominado

metilPARABENO), éster propílico de ácido 4-hidroxibenzoico (denominado propilPARABENO), que también son ambos agentes conservantes. Para descripciones adicionales, véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 5,281,526.

La adición del agente de precipitación de compuesto orgánico proporciona la ventaja de alta flexibilidad de las condiciones de precipitación con respecto a pH, temperatura, concentración de fosfolipasa, concentración de agente de precipitación y tiempo de incubación.

El agente de precipitación de compuesto orgánico se usa en una cantidad eficaz para mejorar la precipitación de la enzima por medio del agente de precipitación de haluro metálico. La selección de al menos una cantidad eficaz y una cantidad óptima del agente de precipitación de compuesto orgánico, así como las condiciones de la precipitación para la máxima recuperación, que incluye tiempo de incubación, pH, temperatura y concentración de enzima, serán rápidamente evidentes para un experto habitual en la técnica, en vista de la presente divulgación, después de ensayos rutinarios.

Generalmente, se añade al menos aproximadamente 0.01 % p/v de agente de precipitación de compuesto orgánico a la disolución concentrada de enzima y normalmente al menos aproximadamente 0.02 % p/v. En general, no se añade más de aproximadamente 0.3 % p/v de agente de precipitación de compuesto orgánico a la disolución concentrada de enzima y normalmente no más de aproximadamente 0.2 % p/v.

La disolución concentrada de polipéptido, que contiene el agente de precipitación de haluro metálico, y el agente de precipitación de compuesto orgánico, se puede ajustar a un pH que dependerá, por necesidad, de la enzima a enriquecer o purificar. En general, el pH se ajusta a un nivel próximo al punto isoeléctrico de la fosfolipasa. El pH se puede ajustar a un pH en un intervalo desde aproximadamente 2.5 unidades de pH por debajo

del punto isoeléctrico (pI) hasta aproximadamente 2.5 unidades de pH por encima del punto isoeléctrico.

El tiempo de incubación necesario para obtener un precipitado de enzima enriquecida o purificada depende de la naturaleza de la enzima específica, la concentración de enzima y el (los) agente(s) de precipitación específico y su concentración. En general, el tiempo eficaz para precipitar la enzima es entre aproximadamente 1 y aproximadamente 30 horas; normalmente no supera aproximadamente 25 horas. En presencia del agente de precipitación de compuesto orgánico, el tiempo de incubación se puede reducir todavía a menos de aproximadamente 10 horas y en la mayoría de los casos incluso a aproximadamente 6 horas.

Generalmente, la temperatura durante la incubación es entre aproximadamente 4 °C y aproximadamente 50 °C. Normalmente, el método se lleva a cabo a una temperatura entre aproximadamente 10 °C y aproximadamente 45 °C (por ejemplo, entre aproximadamente 20 °C y aproximadamente 40 °C). La temperatura óptima para inducir la precipitación varía según las condiciones de disolución y la enzima o agente(s) de precipitación usado(s).

La recuperación global de precipitado de enzima enriquecida o purificada, y la eficiencia con la que se realiza el proceso, mejora agitando la disolución que comprende la enzima, el haluro metálico añadido y el compuesto orgánico añadido. La etapa de agitación se hace tanto durante la adición del haluro metálico como el compuesto orgánico, como durante el posterior periodo de incubación. Métodos de agitación adecuados incluyen agitación mecánica o sacudidas, aireación vigorosa, o cualquier técnica similar.

Después del periodo de incubación, la enzima enriquecida o purificada se separa entonces del pigmento disociado y otras impurezas y se recoge por técnicas de separación convencionales, tales como filtración, centrifugación, microfiltración, filtración a vacío giratorio, ultrafiltración, filtración en prensa,

filtración en membrana cruzada, microfiltración en membrana por flujo cruzado, o similares. Se puede obtener enriquecimiento o purificación adicional del precipitado de enzima lavando el precipitado con agua. Por ejemplo, el precipitado de enzima enriquecida o purificada se lava con agua que contiene el agente de precipitación de haluro metálico, o con agua que contiene los agentes de precipitación de haluro metálico y de compuesto orgánico.

Durante la fermentación, se acumula un polipéptido de fosfolipasa en el caldo de cultivo. Para el aislamiento, enriquecimiento o purificación de la fosfolipasa deseada, se centrifuga o filtra el caldo de cultivo para eliminar las células, y se usa el líquido sin células resultante para el enriquecimiento o purificación de la enzima. En una realización, el caldo sin células se somete a precipitación por sales usando sulfato de amonio a aproximadamente 70 % de saturación; entonces se disuelve la fracción de 70 % de precipitación por saturación en un tampón y se aplica a una columna tal como una columna Sephadex G-100, y se eluye para recuperar la fracción activa de enzima. Para enriquecimiento o purificación adicional, se puede usar un procedimiento convencional tal como cromatografía de intercambio iónico. Se pueden transformar enzimas enriquecidas o purificadas en un producto final que es o líquido (disolución, suspensión) o sólido (granular, polvo).

#### **Descripción de las realizaciones preferidas**

Según un aspecto de la presente invención, se presenta un polipéptido aislado que comprende una fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde dicha fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.02 y/o una relación de actividad NALPE/NAPE inferior a 0.12. Preferentemente, la relación de especificidad sn1/sn2 es entre 65-85/15-35, preferentemente entre 65-80/20-35, más preferentemente entre 70-

85/15-30, más preferentemente entre 70-80/20-30; o entre 75-95/5-25, preferentemente entre 80-95/5-20, más preferentemente entre 85-95/5-15. Preferentemente, la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5 o 99/1. En otras realizaciones preferidas, la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 74/26 o 89/11. En otra realización, el polipéptido aislado de la invención puede consistir en o consistir esencialmente en la fosfolipasa A1 presentada en el presente documento. La relación de especificidad sn1/sn2 de entre 65-85/15-35, preferentemente entre 65-80/20-35, más preferentemente entre 70-85/15-30, más preferentemente 70-80/20-30, es con respecto al sustrato de fosfatidilcolina (PC); y la relación de especificidad sn1/sn2 de entre 75-95/5-25, preferentemente entre 80-95/5-20, más preferentemente entre 85-95/5-15, es con respecto al sustrato de NAPE. La relación de especificidad sn1/sn2 de 74/26 es con respecto al sustrato de fosfatidilcolina (PC) y la relación de especificidad sn1/sn2 de 89/11 es con respecto al sustrato de NAPE.

Preferentemente, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 o 0.001. En realizaciones aún más preferidas, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es entre 65-85/15-35, preferentemente entre 65-80/20-35, más preferentemente entre 70-85/15-30, más preferentemente entre 70-80/20-30. En realizaciones aún más preferidas, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5 o 99/1. En realizaciones aún más preferidas, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 74/26.

Preferentemente, la relación de actividad relación de actividad NALPE/NAPE es inferior a 0.11, 0.10, 0.09, 0.08, 0.07,

0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 o 0.001.

Preferentemente, la relación de actividad relación de actividad NALPE/NAPE es inferior a 0.11, 0.10, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 o 0.001 y la y la relación de especificidad sn1/sn2 es entre 75-95/5-25, preferentemente entre 80-95/5-20, más preferentemente entre 85-95/5-15.

Preferentemente, la relación de actividad relación de actividad NALPE/NAPE es inferior a 0.11, 0.10, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 o 0.001 y la y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 89/11.

En otras realizaciones preferidas, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Más preferentemente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otras realizaciones preferidas, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Más preferentemente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otras realizaciones preferidas, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Más preferentemente, la fosfolipasa

A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otras realizaciones preferidas, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Más preferentemente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta un polinucleótido aislado que tiene una secuencia de ácidos nucleicos que codifica el polipéptido aislado como se ha descrito anteriormente. También se presenta un vector de expresión recombinante que tiene el polinucleótido aislado. También se presenta una célula hospedadora que tiene el vector de expresión recombinante.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta un método de preparación de una masa, comprendiendo el método mezclar un componente de masa seleccionado del grupo que consiste en harina, sal, agua, azúcar, grasa, lecitina, aceite, emulsionante y levadura con un polipéptido aislado que comprende una fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor en donde dicha fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.01 y/o una relación de actividad NALPE/NAPE inferior a 0.12. Preferentemente, la relación de especificidad sn1/sn2 es entre 65-85/15-35, preferentemente entre 65-80/20-35, más preferentemente entre 70-85/15-30, más preferentemente entre 70-80/20-30; o entre 75-95/5-25, preferentemente entre 80-95/5-20, más preferentemente entre 85-95/5-15. Preferentemente, la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5 o 99/1. En otras realizaciones preferidas, la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 74/26 o 89/11.

Opcionalmente, el emulsionante se selecciona del grupo que consiste en i) emulsionantes de fosfolípido tales como lecitina o lisolecitina; o ii) un emulsionante no de fosfolípido tal como DATEM, un monoglicérido o un diglicérido.

Preferentemente, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 o 0.001. En realizaciones aún más preferidas, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es entre 65-85/15-35, preferentemente entre 65-80/20-35, más preferentemente entre 70-85/15-30, más preferentemente entre 70-80/20-30. En realizaciones aún más preferidas, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 60/40, 70/30, 80/20, 90/10, 95/5 o 99/1. En realizaciones aún más preferidas, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 74/26. En realizaciones aún más preferidas, la relación de actividad relación de actividad NALPE/NAPE es inferior a 0.11, 0.10, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 o 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es entre 75-95/5-25, preferentemente entre 80-95/5-20, más preferentemente entre 85-95/5-15. En realizaciones aún más preferidas, la relación de actividad relación de actividad NALPE/NAPE es inferior a 0.11, 0.10, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 o 0.001 y la relación de especificidad sn1/sn2 es aproximadamente 89/11.

En otras realizaciones preferidas, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12,

SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Más preferentemente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otras realizaciones preferidas, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Más preferentemente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otras realizaciones preferidas, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Más preferentemente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otras realizaciones preferidas, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Más preferentemente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende una secuencia de proteínas que tiene 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta una masa que comprende una enzima fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde la fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.01. Preferentemente, la masa tiene extensibilidad y/o estabilidad mejoradas. En otro aspecto de la presente invención, la masa adicional tiene al menos una enzima adicional seleccionada del grupo que consiste en amilasa, ciclodextrina glucanotransferasa,

peptidasa, transglutaminasa, lipasa, galactolipasa, fosfolipasa que es diferente de la fosfolipasa A1, celulasa, hemicelulasa, proteasa, proteína disulfuro isomerasa, glucosiltransferasa, peroxidasa, lipoxigenasa, lacasa y oxidasa. Preferentemente, la amilasa es una exoamilasa. Preferentemente, la exoamilasa es una amilasa maltogénica. Preferentemente, la exoamilasa es una amilasa no maltogénica. Más preferentemente, la amilasa no maltogénica hidroliza almidón por escisión de uno o más malto-oligosacáridos lineales, que comprenden predominantemente cuatro a ocho unidades de D-glucopiranosilo, desde los extremos no reductores de las cadenas laterales de amilopectina. En otra realización preferida, la enzima adicional es una fosfolipasa. Más preferentemente, la fosfolipasa tiene actividad de galactolipasa. En otra realización preferida, la fosfolipasa es SEQ ID NO: 17 y/o SEQ ID NO: 18.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta un método de preparación de un producto horneado en el que se hornea una masa como se ha descrito anteriormente. En otro aspecto de la presente invención, se presenta un producto horneado. Preferentemente, el producto horneado tiene al menos una propiedad mejorada seleccionada del grupo que consiste en tamaño de poro de la miga mejorado, uniformidad mejorada de las burbujas de gas, no hay separación entre la corteza y la miga, elevado volumen, elevada cualidad de crujiente de la corteza y leva en el horno mejorada. Más preferentemente, la propiedad mejorada es elevada cualidad de crujiente de la corteza.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta una premezcla para hornear que comprende harina y una enzima fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde la fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.01. En otro aspecto de la presente invención, la premezcla para hornear tiene al menos una enzima adicional seleccionada del grupo que consiste en amilasa,

ciclodextrina glucanotransferasa, peptidasa, transglutaminasa, lipasa, galactolipasa, fosfolipasa que es diferente de la fosfolipasa A1, celulasa, hemicelulasa, proteasa, proteína disulfuro isomerasa, glucosiltransferasa, peroxidasa, lipoxigenasa, lacasa y oxidasa. Preferentemente, la amilasa es una exoamilasa. Preferentemente, la exoamilasa es una amilasa maltogénica. Preferentemente, la exoamilasa es una amilasa no maltogénica. Más preferentemente, la amilasa no maltogénica hidroliza almidón por escisión de uno o más malto-oligosacáridos lineales, que comprenden predominantemente cuatro a ocho unidades de D-glucopiranosilo, desde los extremos no reductores de las cadenas laterales de amilopectina. Preferentemente, la enzima adicional es una fosfolipasa. Más preferentemente, la fosfolipasa tiene actividad de galactolipasa. En otra realización preferida, la fosfolipasa es SEQ ID NO: 17 y/o SEQ ID NO: 18.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta un mejorador del horneado que comprende un granulado o polvo aglomerado que comprende una enzima fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde la fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.01. En otro aspecto de la presente invención, el mejorador del horneado tiene al menos una enzima adicional seleccionada del grupo que consiste en amilasa, ciclodextrina glucanotransferasa, peptidasa, transglutaminasa, lipasa, galactolipasa, fosfolipasa que es diferente de la fosfolipasa A1, celulasa, hemicelulasa, proteasa, proteína disulfuro isomerasa, glucosiltransferasa, peroxidasa, lipoxigenasa, lacasa y oxidasa. Preferentemente, la amilasa es una exoamilasa. Preferentemente, la exoamilasa es una amilasa maltogénica. Preferentemente, la exoamilasa es una amilasa no maltogénica. Más preferentemente, la amilasa no maltogénica hidroliza almidón por escisión de uno o más malto-oligosacáridos lineales, que comprenden predominantemente cuatro a ocho unidades

de D-glucopiranosilo, desde los extremos no reductores de las cadenas laterales de amilopectina. Preferentemente, la enzima adicional es una fosfolipasa. Más preferentemente, la fosfolipasa tiene actividad de galactolipasa. En otra realización preferida, la fosfolipasa es SEQ ID NO: 17 y/o SEQ ID NO: 18.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta un método de preparación de una masa como se expone anteriormente, pero en que se incluye al menos una enzima adicional útil para mejorar la masa y/o un producto horneado fabricado a partir de la misma. Preferentemente, la enzima adicional se selecciona del grupo que consiste en amilasa, ciclodextrina glucanotransferasa, peptidasa, transglutaminasa, lipasa, galactolipasa, fosfolipasa que es diferente de la fosfolipasa A1, celulasa, hemicelulasa, proteasa, proteína disulfuro isomerasa, glucosiltransferasa, peroxidasa, lipoxigenasa, lacasa y oxidasa. Preferentemente, la amilasa es una exoamilasa. Preferentemente, la exoamilasa es una amilasa maltogénica. Preferentemente, la exoamilasa es una amilasa no maltogénica. Más preferentemente, la amilasa no maltogénica hidroliza almidón por escisión de uno o más malto-oligosacáridos lineales, que comprenden predominantemente cuatro a ocho unidades de D-glucopiranosilo, desde los extremos no reductores de las cadenas laterales de amilopectina. Preferentemente, la enzima adicional es una fosfolipasa. Más preferentemente, la fosfolipasa tiene actividad de galactolipasa. En otra realización preferida, la fosfolipasa es SEQ ID NO: 17 y/o SEQ ID NO: 18.

En otro aspecto de la presente invención, un método de modificación de un emulsionante de fosfolípido que comprende tratamiento del emulsionante con una enzima fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde la fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.01. Opcionalmente, el emulsionante de fosfolípido es lecitina o lisolecitina. Opcionalmente, el emulsionante de fosfolípido es

ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina o fosfatidilserina.

En otro aspecto de la presente invención, se presenta un método de creación de un lisofosfolípido en una matriz alimentaria que contiene lípidos que comprende añadir a la matriz alimentaria que contiene lípidos una enzima fosfolipasa A1 caracterizada por tener una relación de especificidad sn1/sn2 de aproximadamente 55/45 o mayor, en donde la fosfolipasa A1 tiene una relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa inferior a 0.01. Preferentemente, la matriz alimentaria que contiene lípidos se selecciona del grupo que consiste en huevos y productos alimenticios que contienen huevos, masa para artículos de pastelería, carne procesada, productos basados en leche, aceite vegetal y artículos de pastelería, que incluyen pasteles y galletas.

En realizaciones aún más preferidas, la relación de actividad lisofosfolipasa/fosfolipasa es inferior a 0.019, 0.018, 0.017, 0.016, 0.015, 0.014, 0.013, 0.012, 0.011 o 0.010.

En aún otras realizaciones preferidas, la relación de actividad relación de actividad NALPE/NAPE es inferior a 0.11, 0.10, 0.09, 0.08, 0.07, 0.06, 0.05, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01, 0.009, 0.008, 0.007, 0.006, 0.005, 0.004, 0.003, 0.002 o 0.001.

En otro aspecto de la invención, se presenta un método de preparación de una masa como antes, pero que tiene además la etapa de añadir un emulsionante. Preferentemente, el emulsionante se selecciona del grupo que consiste en i) emulsionantes de fosfolípido tales como lecitina o lisolecitina; o ii) un emulsionante no de fosfolípido tal como DATEM, un monoglicérido o un diglicérido.

En otro aspecto de la presente invención se proporciona un polipéptido aislado que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en una enzima fosfolipasa A1 que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en una secuencia de

proteínas que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Preferentemente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en una secuencia de proteínas que tiene al menos 80 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otras realizaciones preferidas, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en una secuencia de proteínas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Más preferentemente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en una secuencia de proteínas que tiene al menos 90 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otras realizaciones preferidas, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en una secuencia de proteínas que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Más preferentemente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en una secuencia de proteínas que tiene al menos 95 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otras realizaciones preferidas, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en una secuencia de proteínas que tiene 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16. Más preferentemente, la fosfolipasa A1 es una enzima que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente

en una secuencia de proteínas que tiene 100 % de identidad de secuencia con SEQ ID NO: 6.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un polipéptido aislado que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en una enzima fosfolipasa A1 que comprende, que consiste en o que consiste esencialmente en un fragmento activo de SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 16.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 2 es los aminoácidos 28 a 149 de SEQ ID NO: 1, o Gln28 a Gly149 de SEQ ID NO: 1, o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 4 es los aminoácidos 26 a 149 de SEQ ID NO: 3, o Gln26 a Lys149 de SEQ ID NO: 3, o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 6 es los aminoácidos 28 a 146 de SEQ ID NO: 5, o Gln28 a Thr146 de SEQ ID NO: 5 o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 8 es los aminoácidos 28 a 146 de SEQ ID NO: 7, o Gln28 a Thr149 de SEQ ID NO: 7 o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 10 es los aminoácidos 34 a 157 de SEQ ID NO: 9, o Gln34 a Gly157 de SEQ ID NO: 9 o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 12 es los aminoácidos 30 a 146 de SEQ ID NO: 11, o Ala30 a Asp146 de SEQ ID NO: 11 o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 12 es los aminoácidos 30 a 151 de SEQ ID NO: 11, o Ala30 a Lys151 de SEQ ID NO: 11 o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 14 es los aminoácidos 28 a 124 de SEQ ID NO: 13, o Gln28 a Gln124 de SEQ ID NO: 13 o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 14 es los aminoácidos 28 a 141 de SEQ ID NO: 13, o Gln28 a Phe141 de SEQ ID NO: 13 o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 14 es los aminoácidos 28 a 145 de SEQ ID NO: 13, o Gln28 a Asp145 de SEQ ID NO: 13 o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 14 es los aminoácidos 28 a 149 de SEQ ID NO: 13, o Gln28 a Gly149 de SEQ ID NO: 13 o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

En una realización, el fragmento de SEQ ID NO: 16 es los aminoácidos 29 a 138, 29 a 139, 29 a 140, 29 a 141, 29 a 142, 29 a 143, 29 a 144, 29 a 145, 29 a 146, 29 a 147 o 29 a 148 de SEQ ID NO: 15, o una secuencia que tiene 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de identidad con la misma.

## **ENSAYOS y MÉTODOS**

Ensayos de caracterización de enzimas - Ensayos de actividad y ensayo para la determinación de la especificidad de las posiciones de fosfolipasa

### **Ensayo de PC-P:**

Se puede determinar la actividad de fosfolipasa (PC-U) usando el siguiente ensayo:

Sustrato: Se disolvieron 1.71 % de L- $\alpha$ -fosfatidilcolina de soja (95 %) (Avanti 441601G, Avanti Polar Lipids, EE. UU.), 6.25 % de TRITON™-X 100 (Sigma X-100) y CaCl<sub>2</sub> 5 mM en tampón HEPES 0.05 M a pH 7.

Procedimiento de ensayo:

Se diluyeron las muestras, muestra de calibración y muestra de control en HEPES 10 mM a pH 7.0 que contenía 0.1 % de TRITON™ X-100. El análisis se llevó a cabo usando una placa de microtitulación de 96 pocillos y una ThermoMixer C (Eppendorf, Alemania). El ensayo se realizó a 30 °C. Se termostataron 200  $\mu$ l de sustrato durante 180 segundos a 30 °C, antes de que se añadieran 50  $\mu$ l de muestra de enzima. La enzimación duró 600 s. Se midió la cantidad de ácido graso libre liberada durante la enzimación usando el kit de NEFA obtenido de WakoChemicals GmbH, Alemania).

Este ensayo kit está compuesto por dos reactivos

NEFA-HR(1):

Tampón fosfato 50 mM a pH 7.0 que contiene

0.53 U/ml de acil-CoA sintasa (ACS)

Coenzima A (CoA) 0.31 mM

Sal de disodio de adenosina 5-trifosfato (ATP) 4.3 mM

4-Amino-antipirina (4-AA) 1.5 mM

2.6 U/ml de ascorbato oxidasa (AOD)

0.062 % de azida de sodio

NEFA-HR(2):

3-Metil-N-Etil-N-(E-hidroxietil)-anilina (MEHA) 2.4 mM

12 U/ml de acil-CoA oxidasa (ACOD)

14 U/ml de peroxidasa (POD)

Después de la incubación se transfirieron 10  $\mu$ l de mezcla de enzimación a una nueva placa de microtitulación que contenía 150  $\mu$ l de NEFA-HR(1) y se incubó durante 240 segundos a 30 °C. Después se añadieron 75  $\mu$ l de NEFA-HR(2) y la mezcla se incubó durante 240 segundos a 30 °C. Entonces se midió la DO a 540 nm.

Se calculó la actividad enzimática ( $\mu\text{moles de FFA}/(\text{min} \cdot \text{ml})$ ) basándose en una curva de calibración hecha a partir de ácido oleico. Se calculó la actividad enzimática PC-U como micromol de ácido graso producido por mililitro de volumen de muestra de enzima por minuto en condiciones de ensayo.

$$\text{Actividad enzimática } (\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{ml})) = \frac{\text{DO} * 250 \mu\text{l} * \text{D}}{\text{S} * 50 \mu\text{l} * 10 \text{ min}}$$

DO = DO de la muestra restada la DO de la muestra ciega

250  $\mu\text{l}$  = volumen total de sustrato y enzima

50  $\mu\text{l}$  = Volumen de disolución de enzima

D = dilución de muestra

S = la pendiente de la curva de calibración ( $\text{DO}/(\mu\text{mol}/\text{ml})$ )

10 = tiempo de reacción de la enzimación (minutos (min))

#### **Ensayo de LPC-P:**

Se puede determinar la actividad de lisofosfolipasa (LPC-U) usando el siguiente ensayo:

Sustrato: Se disolvieron 1.18 % de 1-oleoil-2-hidroxi-sn-glicero-3-fosfocolina (Avanti 845875P, Avanti Polar Lipid, EE.UU.), 6.25 % de TRITON™-X 100 (Sigma X-100) y  $\text{CaCl}_2$  5 mM en tampón HEPES 0.05 M pH 7.

Procedimiento de ensayo:

Se diluyeron las muestras, muestra de calibración y muestra de control en HEPES 10 mM a pH 7.0 que contenía 0.1 % de TRITON™ X-100. El análisis se llevó a cabo usando una placa de microtitulación de 96 pocillos y una ThermoMixer C (Eppendorf, Alemania). El ensayo se realizó a 30 °C. Se termostataron 200  $\mu\text{l}$  de sustrato durante 180 segundos a 30 °C, antes de que se añadieran 50  $\mu\text{l}$  de muestra de enzima. La enzimación duró 600 s. Se midió la cantidad de ácido graso libre liberada durante la enzimación usando el kit de NEFA obtenido de WakoChemicals GmbH, Alemania).

Este ensayo kit está compuesto por dos reactivos

NEFA-HR(1):

Tampón fosfato 50 mM a pH 7.0 que contiene  
0.53 U/ml de acil-CoA sintasa (ACS)  
Coenzima A (CoA) 0.31 mM  
Sal de disodio de adenosina 5-trifosfato (ATP) 4.3 mM  
4-Amino-antipirina (4-AA) 1.5 mM  
2.6 U/ml de ascorbato oxidasa (AOD)  
0.062 % de azida de sodio

NEFA-HR(2) :

3-Metil-N-Etil-N-(E-hidroxietil)-anilina (MEHA) 2.4 mM  
12 U/ml de acil-CoA oxidasa (ACOD)  
14 U/ml de peroxidasa (POD)

Después de la incubación se transfirieron 10 µl de mezcla de enzimación a una nueva placa de microtitulación que contenía 150 µl de NEFA-HR(1) y se incubó durante 240 segundos a 30 °C. Después se añadieron 75 µl de NEFA-HR(2) y la mezcla se incubó durante 240 segundos a 30 °C. Entonces se midió la DO a 540 nm.

Se calculó la actividad enzimática (µmoles de FFA/(min·ml)) basándose en una curva de calibración hecha a partir de ácido oleico. Se calculó la actividad enzimática LPC-U como micromol de ácido graso producido por mililitro de volumen de muestra de enzima por minuto en condiciones de ensayo.

$$\text{Actividad enzimática } (\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{ml})) = \frac{\text{DO} * 250 \mu\text{l} * \text{D}}{\text{S} * 50 \mu\text{l} * 10 \text{ min}}$$

DO = DO de la muestra restada la DO de la muestra ciega

250 µl = volumen total de sustrato y enzima

50 µl = Volumen de disolución de enzima

D = dilución de muestra

S = la pendiente de la curva de calibración (DO/(µmol/ml))

10 = tiempo de reacción de la enzimación (minutos (min))

**Ensayo de NAPE-P:**

Se puede determinar la actividad de la lisofosfolipasa de NAPE (NAPE-U) usando el siguiente ensayo:

Sustrato: Se disolvieron 2.25 % de palmitoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-linoleoilo (16:0-18:2 de PE-N18:2) (Avanti 792003, Avanti Polar Lipids, EE. UU.), 6.25 % de TRITON<sup>TM</sup>-X 100 (Sigma X-100) y CaCl<sub>2</sub> 5 mM en tampón HEPES 0.05 M a pH 7.

Procedimiento de ensayo:

Se diluyeron las muestras, muestra de calibración y muestra de control en HEPES 10 mM a pH 7.0 que contenía 0.1 % de TRITON<sup>TM</sup> X-100. El análisis se llevó a cabo usando una placa de microtitulación de 96 pocillos y una ThermoMixer C (Eppendorf, Alemania). El ensayo se realizó a 30 °C. Se termostataron 200 µl de sustrato durante 180 segundos a 30 °C, antes de que se añadieran 50 µl de muestra de enzima. La enzimación duró 600 s. Se midió la cantidad de ácido graso libre liberada durante la enzimación usando el kit de NEFA obtenido de WakoChemicals GmbH, Alemania).

Este ensayo kit está compuesto por dos reactivos

NEFA-HR(1):

Tampón fosfato 50 mM a pH 7.0 que contiene  
0.53 U/ml de acil-CoA sintasa (ACS)  
Coenzima A (CoA) 0.31 mM  
Sal de disodio de adenosina 5-trifosfato (ATP) 4.3 mM  
4-Amino-antipirina (4-AA) 1.5 mM  
2.6 U/ml de ascorbato oxidasa (AOD)  
0.062 % de azida de sodio

NEFA-HR(2):

3-Metil-N-Etil-N-(E-hidroxietil)-anilina (MEHA) 2.4 mM  
12 U/ml de acil-CoA oxidasa (ACOD)  
14 U/ml de peroxidasa (POD)

Después de la incubación se transfirieron 10 µl de mezcla de enzimación a una nueva placa de microtitulación que contenía 150 µl de NEFA-HR(1) y se incubó durante 240 segundos a 30 °C. Después se añadieron 75 µl de NEFA-HR(2) y la mezcla se incubó durante 240 segundos a 30 °C. Entonces se midió la DO a 540 nm.

Se calculó la actividad enzimática ( $\mu\text{moles de FFA}/(\text{min}\cdot\text{ml})$ ) basándose en una curva de calibración hecha a partir de ácido oleico. Se calculó la actividad enzimática NAPE-U a pH 7 como micromol de ácido graso producido por mililitro en condiciones de ensayo.

Se calculó la actividad enzimática ( $\mu\text{moles de FFA}/(\text{min}\cdot\text{ml})$ ) basándose en una curva de calibración hecha a partir de ácido oleico. Se calculó la actividad enzimática NAPE-U como micromol de ácido graso producido por mililitro de volumen de muestra de enzima por minuto en condiciones de ensayo.

$$\text{Actividad enzimática } (\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{ml})) = \frac{\text{DO} * 250 \mu\text{l} * D}{S * 50 \mu\text{l} * 10 \text{ min}}$$

DO = DO de la muestra restada la DO de la muestra ciega

250  $\mu\text{l}$  = volumen total de sustrato y enzima

50  $\mu\text{l}$  = Volumen de disolución de enzima

D = dilución de muestra

S = la pendiente de la curva de calibración ( $\text{DO}/(\mu\text{mol}/\text{ml})$ )

10 = tiempo de reacción de la enzimación (minutos (min))

#### **Ensayo de NALPE-P:**

Se puede determinar la actividad de la fosfolipasa de NALPE (NALPE-U) usando el siguiente ensayo:

Sustrato: Se disolvieron 1.68 % de 1-palmitoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina-N-linoleoil (16:0-NALPE-N18:2), (Avanti 791759, Avanti Polar Lipids, EE. UU.), 6.25 % de TRITON™-X 100 (Sigma X-100) y  $\text{CaCl}_2$  5 mM en tampón HEPES 0.05 M a pH 7.

Procedimiento de ensayo:

Se diluyeron las muestras, muestra de calibración y muestra de control en HEPES 10 mM a pH 7.0 que contenía 0.1 % de TRITON™ X-100. El análisis se llevó a cabo usando una placa de microtitulación de 96 pocillos y una ThermoMixer C (Eppendorf, Alemania). El ensayo se realizó a 30 °C. Se termostataron 200  $\mu\text{l}$  de sustrato durante 180 segundos a 30 °C, antes de que se añadieran 50  $\mu\text{l}$  de muestra de enzima. La enzimación duró 600 s. Se

midió la cantidad de ácido graso libre liberada durante la enzimación usando el kit de NEFA obtenido de WakoChemicals GmbH, Alemania).

Este ensayo kit está compuesto por dos reactivos

NEFA-HR(1):

Tampón fosfato 50 mM a pH 7.0 que contiene

0.53 U/ml de acil-CoA sintasa (ACS)

Coenzima A (CoA) 0.31 mM

Sal de disodio de adenosina 5-trifosfato (ATP) 4.3 mM

4-Amino-antipirina (4-AA) 1.5 mM

2.6 U/ml de ascorbato oxidasa (AOD)

0.062 % de azida de sodio

NEFA-HR(2):

3-Metil-N-Etil-N-(E-hidroxietyl)-anilina (MEHA) 2.4 mM

12 U/ml de acil-CoA oxidasa (ACOD)

14 U/ml de peroxidasa (POD)

Después de la incubación se transfirieron 10 µl de mezcla de enzimación a una nueva placa de microtitulación que contenía 150 µl de NEFA-HR(1) y se incubó durante 240 segundos a 30 °C. Después se añadieron 75 µl de NEFA-HR(2) y la mezcla se incubó durante 240 segundos a 30 °C. Entonces se midió la DO a 540 nm.

Se calculó la actividad enzimática (µmoles de FFA/(min·ml)) basándose en una curva de calibración hecha a partir de ácido oleico. Se calculó la actividad enzimática NALPE-U como micromol de ácido graso producido por mililitro de volumen de muestra de enzima por minuto en condiciones de ensayo.

$$\text{Actividad enzimática } (\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{ml})) = \frac{\text{DO} * 250 \mu\text{l} * D}{S * 50 \mu\text{l} * 10 \text{ min}}$$

DO = DO de la muestra restada la DO de la muestra ciega

250 µl = volumen total de sustrato y enzima

50 µl = Volumen de disolución de enzima

D = dilución de muestra

S = la pendiente de la curva de calibración (DO/(µmol/ml))

10 = tiempo de reacción de la enzimación (minutos (min))

**Ensayo para la determinación de la actividad de fosfolipasa y la especificidad de las posiciones sn1 y sn2 en PC (fosfatidilcolina)**

Sustrato: Se disolvieron 0.6 % de 16:0-18:1 de PC, 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (Avanti 850457, Avanti Polar Lipids, EE. UU.), 0.4 % de TRITON™-X 100 (Sigma, X-100) y  $\text{CaCl}_2$  5 mM en tampón HEPES 0.05 M a pH 7.

**Procedimiento de ensayo:**

Se incubaron 2 ml de sustrato a 30 °C y se añadieron 0.1 ml de una dilución de enzima correspondiente a 2-10 % de sustrato consumido después de 10 minutos de reacción en tampón HEPES 0.05 M (agitación magnética).

Se añadieron 40 µl de HCl 4 M para detener la reacción y para protonar los ácidos grasos libres. Se añadió 1 ml de etanol al 99 % y se mezcló en una mezcladora con vórtex. Se añadieron 5 ml de MTBE (metil terc-butil éter) que contenía 0.5 mg de ácido graso C17:0 (ácido margárico). La muestra se mezcló nuevamente en una mezcladora con vórtex durante 5 s y se extrajo durante 30 minutos en una rotamezcladora (Stuart Rotator SB2) a 25 rpm. La muestra se centrifugó a 1520 g durante 10 minutos.

Se dispuso una columna de 500 mg de amina ( $\text{NH}_2$ ) - Bond Elut SPE (Agilent) en un sistema de vacío Bond Elut. La columna se acondicionó con 8 ml de éter de petróleo. Se aplicó la fase de MTBE de la extracción a la columna y se eluyó con:

1ª fracción 8 ml de disolvente A: MTBE:2-propanol (2:1)

2ª Fracción 8 ml de disolvente B: Acetona:Ácido fórmico (100:2)

Los disolventes se eluyeron con aproximadamente 0.25 ml/min.

Se evaporó a sequedad la fracción de ácidos grasos recogida (fracc. 2) y se analizaron los ácidos grasos por GLC. Basándose en el patrón interno Ácido graso C17:0, se determinó la cantidad de ácidos grasos C16:0 y C18:1.

Se calculó la actividad enzimática como  $\mu$ moles de ácido graso producidos por minutos en condiciones de ensayo.

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{2 \times A \times 1000000 \times D}{100 \times \text{MW} \times 10 \times 0.1}$$

Donde

A = % de ácido graso C16:0 + % de ácidos grasos C18:1

2 = ml de sustrato

1000000 = conversión de moles en  $\mu$ moles

D = factor de dilución de enzima

MW = peso molecular medio de ácidos grasos C16:0 y C18:1 producidos

10 = tiempo de reacción en minutos

0.1 = ml de enzima añadida al ensayo

La actividad enzimática relativa de PLA1 se calculó como:

$$\text{Actividad relativa de PLA1} = \frac{\% \text{ de C16:0} \times 100}{\% \text{ de C16:0} + \% \text{ de C18:1}}$$

La actividad enzimática relativa de PLA2 se calculó como:

$$\text{Actividad relativa de PLA2} = \frac{\% \text{ de C18:1} \times 100}{\% \text{ de C16:0} + \% \text{ de C18:1}}$$

La relación de especificidad sn1/sn2 se presenta como:

Relación de especificidad sn1/sn2 = Actividad relativa de PLA1 / Actividad relativa de PLA2

**Ensayo para la determinación de actividad de fosfolipasa y especificidad de las posiciones sn1 y sn2 en NAPE (N-acilfosfatidiletanolamina)**

Sustrato: Se disolvieron 0.79 % de 16:0-18:2 (PE-N18:2) de NAPE palmitoil-2-linoleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-linoleoil (Avanti 792003, Avanti Polar Lipids, EE. UU.), 0.4 % de TRITON™-X 100 (Sigma, X-100) y CaCl<sub>2</sub> 5 mM en tampón HEPES 0.05 M a pH 7.

Procedimiento de ensayo:

Se incubaron 2 ml de sustrato a 30 °C y se añadieron 0.1 ml de una dilución de enzima correspondiente a 2-10 % de sustrato

consumido después de 10 minutos de reacción en tampón HEPES 0.05 M (agitación magnética).

Se añadieron 40 µl de HCl 4 M para detener la reacción y para protonar los ácidos grasos libres. Se añadió 1 ml de etanol al 99 % y se mezcló en una mezcladora con vórtex. Se añadieron 5 ml de MTBE (metil terc-butil éter) que contenían 0.5 mg de ácido graso C17:0 (ácido margárico). La muestra se mezcló otra vez en una mezcladora con vórtex durante 5 s y se extrajo durante 30 minutos en una rotomezcladora (Stuart Rotator SB2) a 25 rpm. La muestra se centrifugó a 1520 g durante 10 minutos.

Se dispuso una columna de 500 mg de amina (NH<sub>2</sub>) - Bond Elut SPE (Agilent) en un sistema de vacío Bond Elut. La columna se acondicionó con 8 ml de éter de petróleo. Se aplicó la fase de MTBE de la extracción a la columna y se eluyó con:

1<sup>a</sup> fracción 8 ml de disolvente A: MTBE:2-propanol (2:1)

2<sup>a</sup> Fracción 8 ml de disolvente B: Acetona:Ácido fórmico (100:2)

Los disolventes se eluyeron con aproximadamente 0.25 ml/min.

Se evaporó a sequedad la fracción de ácidos grasos recogida (fracc. 2) y se analizaron los ácidos grasos por GLC. Basándose en el patrón interno Ácido graso C17:0, se determinó la cantidad de ácidos grasos C16:0 y C18:2.

Se calculó la actividad enzimática como µmoles de ácido graso producidos por minutos en condiciones de ensayo.

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{2 \times A \times 1000000 \times D}{100 \times \text{MW} \times 10 \times 0.1}$$

Donde

A = % de ácido graso C16:0 + % de ácidos grasos C18:2

2 = ml de sustrato

1000000 = conversión de moles en µmoles

D = factor de dilución de enzima

MW = peso molecular medio de ácidos grasos C16:0 y C18:1 producidos

10 = tiempo de reacción en minutos

0.1 = ml de enzima añadida al ensayo

La actividad enzimática relativa de PLA1 se calculó como:

$$\text{Actividad relativa de PLA1} = \frac{\% \text{ de C16:0} \times 100}{\% \text{ de C16:0} + \% \text{ de C18:2}}$$

La actividad enzimática relativa de PLA2 se calculó como:

$$\text{Actividad relativa de PLA2} = \frac{\% \text{ de C18:2} \times 100}{\% \text{ de C16:0} + \% \text{ de C18:2}}$$

La relación de especificidad sn1/sn2 se presenta como:

Relación de especificidad sn1/sn2 = Actividad relativa de PLA1 / Actividad relativa de PLA2

#### **Cromatografía de gases (GLC):**

Se analizó el ácido graso libre por GLC como derivados de trimetilsililo (TMS).

##### Aparato

- Cromatógrafo de gases capilar Perkin Elmer Clarus 600 equipado con columna de sílice fundida WCOT de 12.5 m x 0.25 mm DI x 0.1 µ de espesor de película de 5 % de fenil-metil-silicona (CP Sil 8 CB de Chrompack).
- Gas portador: Helio.
- Inyector: Inyección dividida en frío PSSI (temp. inicial 90 °C calentado hasta 395 °C), volumen 1.0 µl
- Detector FID: 395 °C

##### Programa del horno:

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

##### Preparación de muestras:

Se disuelve la muestra evaporada en 1.5 ml de heptano:piridina, 2:1. Se transfieren 500 µl de disolución de muestra a un vial plegado, se añaden 100 µl de MSTFA (N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida) y se hacen reaccionar durante 15 minutos a 60 °C.

Aplicaciones de horneado**Configuración de horneado de panecillos**

| Receta                                         | % de panadero |
|------------------------------------------------|---------------|
| Harina de trigo (Reform)                       | 100           |
| Levadura prensada (Malteserkors)               | 4.5           |
| Sal                                            | 1.6           |
| Azúcar                                         | 1.6           |
| Agua (400 BU-2 %)                              | 57            |
| Alfa-amilasa fúngica (16.2 de FAU/g de mezcla) | 0.46          |
| Otras enzimas                                  | variable      |

Amasado en una mezcladora en espiral de Diosna. Absorción de agua para harina según el análisis: 400 BU - 2 %

Procedimiento

Mezclar todos los componentes en un cuenco, 1 minuto a velocidad lenta - añadir agua y amasar 2 minutos a velocidad lenta y 6.5 min a velocidad rápida. La temperatura de la masa debe ser aproximadamente 26 °C. Se pesan 1350 g de masa y se moldea redonda a mano. Se deja reposar la masa en un armario de calentamiento durante 10 minutos a 30 °C.

Se moldea la masa en 30 bolas de masa en una "redondeadora de GLIMIK™" - ajustes según la tabla en la máquina.

La masa fermenta durante 45 minutos a 34 °C, 85 % de HR y se hornea durante 13 minutos a 200 °C / 2 l de vapor + 5 minutos de regulador de tiro abierto (prog. 1 del horno MIWE). Después de hornear los panecillos, se enfrían durante 25 minutos a temperatura ambiente antes pesar y medir el volumen.

Las características de la masa y el pan se evalúan por un experto en la técnica.

**Configuración de horneado de esponja y masa**

| Receta               | % de panadero |
|----------------------|---------------|
| ESPONJA              |               |
| Harina de Polar Bear | 70            |

|                                  |                                               |
|----------------------------------|-----------------------------------------------|
| Levadura prensada (Malteserkors) | 2.25                                          |
| Agua                             | 65 % de cantidad<br>total de agua (400<br>BU) |
| Esponja total                    | 112.55 %                                      |

## MASA

|                                  |                                                                                         |
|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| Harina de Polar Bear             | 30                                                                                      |
| Sal                              | 1.5                                                                                     |
| Levadura prensada (Malteserkors) | 0.67                                                                                    |
| Ácido ascórbico                  | 60 ppm                                                                                  |
| Azúcar                           | 8                                                                                       |
| Aceite de semilla de colza       | 2                                                                                       |
| Agua                             | 35 % de cantidad<br>total de agua (400<br>BU)                                           |
| SUREBake 800 (DuPont)            | 50 ppm                                                                                  |
| Otras enzimas                    | Variable, por<br>ejemplo, una o más<br>de alfa-amilasa,<br>hexosa oxidasa y<br>xilanasa |

Amasado en una mezcladora Hobart.

Procedimiento

Esponja: Mezclar todos los componentes en un cuenco 1 minuto a una 1ª velocidad - 3 minutos a 2ª velocidad. La temperatura de la esponja debe ser aproximadamente 25.5 °C. Fermentar la esponja durante 3 horas a 30 °C, 85 % de HR en un cuenco sin tapa.

Masa: Mezclar la esponja y todos los componentes restantes, excepto la sal, durante 2 minutos a baja velocidad, luego 3 minutos a velocidad media (usar agua con hielo). Añadir sal y mezclar 3 minutos a velocidad media.

Pesar trozos de 450 g de masa y moldear (por debajo de la escala - escala normal 550 g masa). El resto de la masa durante 10 minutos a temperatura ambiente. Moldear en Benier MS500 con el ajuste:

|                              |                        |
|------------------------------|------------------------|
| Preforma                     | -16                    |
| Prensa de tambor             | 3                      |
| Tablero de presión delantero | 4.0 (3.5 para impacto) |
| Tablero de presión trasero   | 3.5 (3.1 para impacto) |
| Anchura delantera            | 330, trasera 290       |

Poner la masa en moldes para hornear engrasados y fermentar 70 minutos (fermentación prolongada - fermentación normal 60 min) a 43 °C, 95 % de HR. Impactar la mitad de las hogazas dejado caer dos veces el molde para hornear que contiene la masa desde una altura de 6.5 cm. Hornear durante 26 minutos a 200 °C (prog. 4 del horno MIWE). Sacar los panes de los moldes para hornear y enfriar durante 70 minutos antes de pesar y medir el volumen. Se evalúan por un experto las características de la masa y del pan.

| <b>Evaluación</b>                          | <b>Método de evaluación</b>                                                                                 | <b>Puntuación más baja=1</b>                            | <b>Puntuación más alta=10</b>                                               |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| <b>Masa</b>                                |                                                                                                             |                                                         |                                                                             |
| Desarrollo de la masa después de la mezcla | Extender la masa con los dedos                                                                              | No se puede estirar la masa sin romperse                | Se puede estirar la masa, obteniendo una masa fina como el papel sin rotura |
| Pegajosidad después de la mezcla           | Cortar una gran ranura en toda la masa, abrir la masa, tocar la superficie de la masa cortada con los dedos | Secar la superficie.<br>La masa se desliza en tus dedos | La masa se pega a tus dedos                                                 |
| Extensibilidad después de reposar          | Extender la masa con los dedos                                                                              | No se puede estirar la masa sin romperse                | La masa se puede estirar obteniendo masa fina como el papel sin romperse    |

| <b>Evaluación</b>                   | <b>Método de evaluación</b>                                                                                 | <b>Puntuación más baja=1</b>                            | <b>Puntuación más alta=10</b>       |
|-------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Pegajosidad después de reposar      | Cortar una gran ranura en toda la masa, abrir la masa, tocar la superficie de la masa cortada con los dedos | Secar la superficie.<br>La masa se desliza en tus dedos | La masa se pega a tus dedos         |
| <b>Corteza</b>                      |                                                                                                             |                                                         |                                     |
| Cualidad de crujiente de la corteza | Fracturar la corteza usando varios dedos                                                                    | Corteza correosa                                        | Corteza crujiente                   |
| <b>Miga</b>                         |                                                                                                             |                                                         |                                     |
| Tamaño de poro de la miga           | Evaluación visual del pan rebanado,                                                                         | Abrir la miga, grandes burbujas de gas                  | Miga fina, pequeñas burbujas de gas |
|                                     | tamaño de las burbujas de gas en la miga                                                                    |                                                         |                                     |
| Homogeneidad del poro de miga       | Evaluación visual del pan rebanado, homogeneidad de las burbujas de gas                                     | Gran variación en los tamaños de las burbujas de gas    | Tamaño de burbujas de gas constante |

| Evaluación                                          | Método de evaluación                                                   | Puntuación más baja=1                                                 | Puntuación más alta=10                                    |
|-----------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Forma del producto                                  |                                                                        |                                                                       |                                                           |
| Apelmazamiento/<br>Orificio debajo<br>de la corteza | Evaluación<br>visual de la<br>superficie<br>cortada<br>vertical        | Un orificio<br>muy grande<br>directamente<br>debajo de la<br>corteza. | No hay<br>separación<br>entre la<br>corteza y la<br>miga. |
| Leva en el<br>horno/Energía                         | Evaluación<br>visual de la<br>cantidad de<br>energía en el<br>producto | Sin energía                                                           | Alto nivel<br>de energía                                  |

#### Extracción de lípidos de masa.

Se congeló y liofilizó muestra de masa completamente fermentada. Se trituro la masa seca y se tamizó. Se mezclaron 1.5 g de muestra molida tamizada con 1.5 g de vehículo (tierra de diatomeas, Thermo Scientific, P/N:60-033854) y se transfirió a un tubo de muestra de 10 ml de ASE. La extracción se llevó a cabo usando Dionex ASE350 (Thermo Scientific) a 40 °C con butanol saturado con agua como disolvente y un tiempo de ejecución estática de 10 minutos. Después de la extracción, se evaporó el disolvente usando Scan Speed 40 (Scanvac, Labogene APS) a 60 °C y 1000 rpm. Se disolvió el lípido seco en 3.75 ml de heptano:isopropanol (3:2).

#### Análisis de HPLC de fosfolípidos extraídos de la masa:

Se analizaron muestras de lípidos de la masa por cromatografía de líquidos usando un detector de aerosol cargado. La columna fue una columna de fase normal (DIOL) y la fase móvil tuvo un gradiente de A: acetona/metanol 96/4 con adición de

formiato de amonio 1 mM y B: acetona/metanol/H<sub>2</sub>O 60/34/6 con adición de formiato de amonio 1 mM.

Se usó NALPE como patrón para la cuantificación.

*Instrumental:*

Dionex Ultimate 3000 UHPLC, Thermo Scientific

Detector VANQOISH, Thermo Scientific

Columna: Fortis HILIC Diol, 1.7 µm, 50 x 2.1 mm

*Cromatográfico:*

| Tiempo (min) | Fase móvil A | Fase móvil B |
|--------------|--------------|--------------|
| 0            | 100 %        | 0 %          |
| 20           | 0 %          | 100 %        |
| 30           | 0 %          | 100 %        |

La temperatura de la columna fue 30 °C y el volumen de inyección fue 4 µL.

*Preparación de muestras:*

Se extrajo lípido de la masa como se describe en 'Extracción de lípidos de masa' y se filtró a través de un filtro de 0.45 µm antes ser inyectado.

*Cálculo:*

Se usó el software Cromeleon para integrar los cromatogramas y se calculó la concentración molar de NAPE, NALPE y NAGPE basándose en una curva patrón de NALPE.

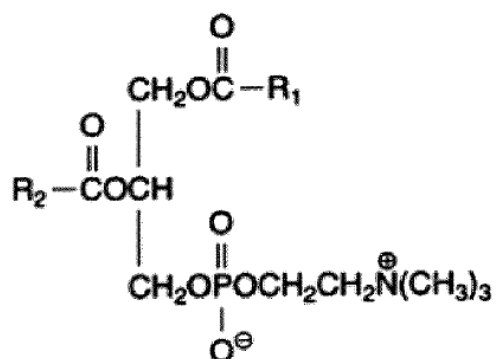
*Presentación de resultados:*

Se obtuvieron niveles de lípidos respectivos de NAPE, NALPE y NAGPE normalizando inicialmente el nivel molar respectivo de cada componente al 'Lípido molar total promedio (NAPE + NALPE + NAGPE)' a través de todas las masas. A continuación, se presentan los niveles de lípidos respectivos con respecto al nivel de NAPE en el control negativo (sin enzima añadida). Así, NAPE empieza (Control negativo) en 1. Se presentan NALPE y NAGPE como niveles generados con respecto al nivel inicial de NAPE.

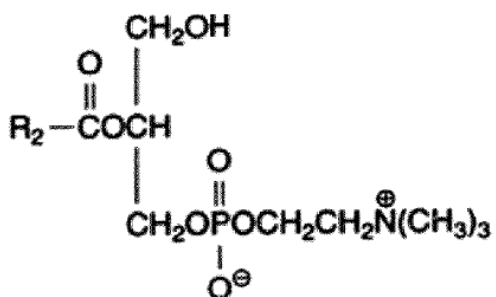
**ESTRUCTURAS QUÍMICAS**

En las siguientes estructuras R1, R2 y R3 son hidrocarburos C12-C24. Los hidrocarburos C12-C24 están o saturados o insaturados. R1, R2 y R3 pueden ser hidrocarburos idénticos o diferentes.

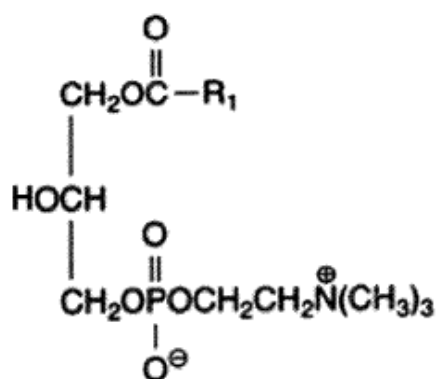
## PC



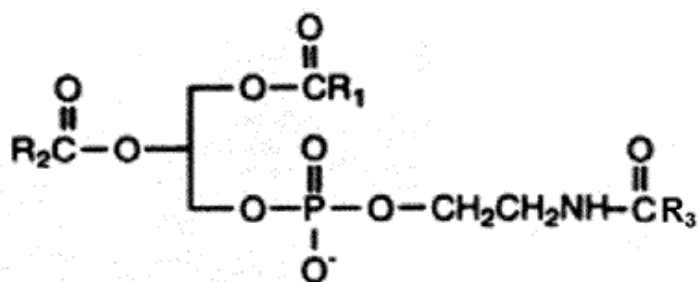
## LPC



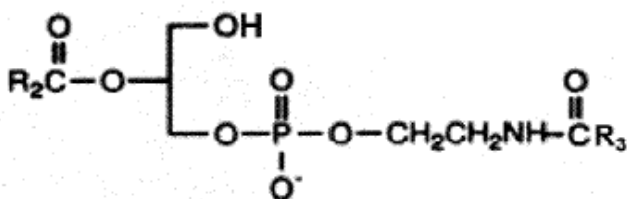
○



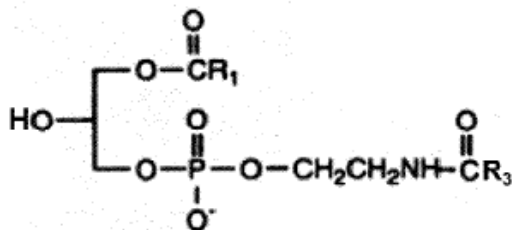
NAPE



NALPE



O



Se debe tener en cuenta que la(s) siguiente(s) realización (realizaciones) descrita(s) solo se presentan a modo de ejemplo y

no se deben interpretar como limitantes del concepto inventivo a cualquier enzima particular.

#### **EJEMPLOS**

##### **EJEMPLO 1 - CRC08310 - *ThaPlal***

##### **Clonación de fosfolipasa *ThaPlal* de *Trichoderma harzianum* (CRC08310)**

Se identificó un supuesto gen de fosfolipasa, designado CRC08310, en *Trichoderma harzianum* y codifica una proteína con 100 % de homología con una secuencia disponible de la base de datos NCBI (N° de acceso de NCBI: KK098756.1) como se determinó de una búsqueda de BLAST (Altschul et al., J Mol Biol, 215: 403-410, 1990). La secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de longitud completa CRC08310 se proporciona en SEQ ID NO: 19. La proteína codificada correspondiente por el gen CRC08310 de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 1. En el extremo N, la proteína tiene un péptido señal con una longitud de 16 aminoácidos como se predijo por SignalP versión 4.0 (Nordahl Petersen et al. (2011) Nature Methods, **8**:785-786). La presencia de una secuencia señal sugiere que CRC08310 es una enzima secretada. La secuencia de proteínas madura predicha de CRC08310 se expone en SEQ ID NO: 2.

##### **EJEMPLO 2 - Expresión de CRC08310**

Se sintetizó la secuencia de ADN sintético de codones optimizados que codifica la proteína CRC08310 de longitud completa (SEQ ID NO: 19) y se insertó en el vector de expresión pGXT de *Trichoderma reesei* (el mismo que el vector pTTTPyr2 descrito en la solicitud PCT publicada WO2015/017256, incorporada como referencia en el presente documento), dando como resultado el plásmido pGXT-CRC08310. En el vector pGXT, el gen *pyrG* de *Aspergillus nidulans* se sustituye por el gen *pyr2* de *Trichoderma reesei*. Los marcadores selectivos de *amdS* y *pyr2* de *Aspergillus nidulans* confieren el crecimiento de transformantes sobre acetamida como la única fuente de nitrógeno, y las regiones telómeras de *Trichoderma reesei*

permiten el mantenimiento de plásmidos no cromosómicos en una célula fúngica. pGXT-CRC08310 contiene el promotor derivado de *cbhI* de *Trichoderma reesei* (*cbhI*) y regiones terminadoras de *cbhI* que permiten una fuerte expresión inducible del gen de interés.

Entonces se transformó el plásmido pGXT-CRC08310 en una cepa adecuada de *Trichoderma reesei* (método descrito en la solicitud PCT publicada WO 05/001036) usando transformación con protoplastos (Te'o el al. (2002) J. Microbiol. Methods 51:393-99). Se seleccionaron transformantes en un medio sólido que contenía acetamida como la única fuente de nitrógeno (acetamida 0.6 g/l; cloruro de cesio 1.68 g/l; glucosa 20 g/l; dihidrogenofosfato de potasio 15 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado 0.6 g/l; cloruro de calcio dihidratado 0.6 g/l; sulfato de hierro (II) 5 mg/l; sulfato de cinc 1.4 mg/l; cloruro de cobalto (II) 1 mg/l; sulfato de manganeso (II) 1.6 mg/l; agar 20 g/l; pH 4.25). Las colonias transformadas aparecieron en aproximadamente 1 semana. Después del crecimiento sobre placas de acetamida, se recogieron los transformantes y se transfirieron individualmente a placas de acetamida-agar. Después de 5 días de crecimiento sobre placas de acetamida, los transformantes que presentaron morfología estable se inocularon en 200 µl de medio definido de glucosa/Sophorose en placas de microtitulación de 96 pocillos. La placa de microtitulación se incubó en una cámara de crecimiento con oxígeno a 28 °C durante 5 días. Se usaron sobrenadantes de estos cultivos para confirmar la expresión de proteínas por análisis de SDS-PAGE. Se seleccionó la cepa estable con la expresión de proteínas más alta y se sometió a fermentación en un matraz oscilante de 250 ml con medio definido de glucosa/Sophorose.

### **EJEMPLO 3 - CRC08316 - PfiPla1**

#### **Clonación de fosfolipasa PfiPla1 de *Pestalotiopsis fici* W106-1 (CRC08316)**

Se identificó un supuesto gen de fosfolipasa, designado CRC08316, en *Pestalotiopsis fici* W106-1 y codifica una proteína

con 100 % de homología con una secuencia disponible de la base de datos NCBI (N° de acceso de NCBI: ETS81250.1) como se determinó de una búsqueda de BLAST (Altschul et al., J Mol Biol, 215: 403-410, 1990). La secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de CRC08316 de longitud completa se proporciona en SEQ ID NO: 20. La proteína codificada correspondiente por el gen CRC08316 de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 3. En el extremo N, la proteína tiene un péptido señal con una longitud de 18 aminoácidos como se predice por SignalP versión 4.0 (Nordahl Petersen et al. (2011) Nature Methods, **8**:785-786). La presencia de una secuencia señal sugiere que CRC08316 es una enzima secretada. La secuencia de proteínas madura predicha de CRC08316 se expone en SEQ ID NO: 4.

#### **EJEMPLO 4 - Expresión de CRC08316**

Se sintetizó la secuencia de ADN sintético de codones optimizados que codifica la proteína CRC08316 de longitud completa (SEQ ID NO: 20) y se insertó en el vector de expresión pGXT de *Trichoderma reesei* (el mismo que el vector pTTTPyr2 descrito en la solicitud PCT publicada WO2015/017256, incorporada como referencia en el presente documento), dando como resultado el plásmido pGXT-CRC08316. En el vector pGXT, el gen *pyrG* de *Aspergillus nidulans* se sustituye por el gen *pyr2* de *Trichoderma reesei*. Los marcadores selectivos de *amdS* y *pyr2* de *Aspergillus nidulans* confieren crecimiento de transformantes sobre acetamida como la única fuente de nitrógeno, y las regiones telómeras de *Trichoderma reesei* permiten el mantenimiento de plásmidos no cromosómicos en una célula fúngica. pGXT-CRC08316 contiene el promotor derivado de *cbhI* de *Trichoderma reesei* (*cbhI*) y regiones terminadoras de *cbhI* que permiten una fuerte expresión inducible del gen de interés. Entonces se transformó el plásmido pGXT-CRC08316 en una cepa adecuada de *Trichoderma reesei* (método descrito en la solicitud PCT publicada WO 05/001036) usando transformación con protoplastos (Te'o et al. (2002) J. Microbiol. Methods 51:393-99). Se

seleccionaron transformantes en un medio sólido que contenía acetamida como la única fuente de nitrógeno (acetamida 0.6 g/l; cloruro de cesio 1.68 g/l; glucosa 20 g/l; dihidrogenofosfato de potasio 15 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado 0.6 g/l; cloruro de calcio dihidratado 0.6 g/l; sulfato de hierro (II) 5 mg/l; sulfato de cinc 1.4 mg/l; cloruro de cobalto (II) 1 mg/l; sulfato de manganeso (II) 1.6 mg/l; agar 20 g/l; pH 4.25). Las colonias transformadas aparecieron en aproximadamente 1 semana. Después del crecimiento sobre placas de acetamida, se recogieron los transformantes y se transfirieron individualmente a placas de acetamida-agar. Después de 5 días de crecimiento sobre placas de acetamida, los transformantes que presentaron morfología estable se inocularon en 200 µl de medio definido de glucosa/Sophorose en placas de microtitulación de 96 pocillos. La placa de microtitulación se incubó en una cámara de crecimiento con oxígeno a 28 °C durante 5 días. Se usaron sobrenadantes de estos cultivos para confirmar la expresión de proteínas por análisis de SDS-PAGE. Se seleccionó la cepa estable con la expresión de proteínas más alta y se sometió a fermentación en un matraz oscilante de 250 ml con medio definido de glucosa/Sophorose.

Se concentró el caldo en bruto hasta aproximadamente 80 ml usando un dispositivo de ultrafiltración VivaFlow 200 (Sartorius Stedim). Entonces se añadió sulfato de amonio a la disolución concentrada hasta una concentración final de 1 M. Después de filtrar, se aplicó la fracción soluble resultante a una columna Phenyl-FF Sepharose de 60 ml previamente equilibrada con el tampón de carga que contenía acetato sódico 20 mM (pH 5.0) y sulfato de amonio 1 M. Se eluyó la proteína diana de la columna con acetato de sodio 20 mM (pH 5.0) y un gradiente de sulfato de amonio 0.5 - 0.3 M. Se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron y posteriormente se cargaron sobre una columna HiLoad Q\_HP Sepharose previamente equilibrada con tampón Tris 20 mM (pH 8.0). Se eluyó la proteína diana de la columna con

tampón Tris 20 mM (pH 8.0) y un gradiente de NaCl de 0-0.4 M. Entonces se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa y se concentraron por los dispositivos Amicon Ultra de 10K, y se guardaron en tampón Tris 20 mM (pH 8.0) y 40 % de glicerol a -20 °C hasta uso.

#### **EJEMPLO 5 - CRC08319 - MguPla1**

##### **Clonación de fosfolipasa MguPla1 de *Metarhizium guizhouense* ARSEF 977 (CRC08319)**

Se identificó un supuesto gen de fosfolipasa, designado CRC08319, en *Metarhizium guizhouense* ARSEF 977 y codifica una proteína con 100 % de homología con una secuencia disponible de la base de datos NCBI (N° de acceso de NCBI: KID92477.1) como se determinó de una búsqueda de BLAST (Altschul et al., J Mol Biol, 215: 403-410, 1990). La secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de longitud completa CRC08319 se proporciona en SEQ ID NO: 21. La proteína codificada correspondiente por el gen de longitud completa CRC08319 se muestra en SEQ ID NO: 5. En el extremo N, la proteína tiene un péptido señal con una longitud de 16 aminoácidos como se predice por SignalP versión 4.0 (Nordahl Petersen et al. (2011) Nature Methods, **8**:785-786). La presencia de una secuencia señal sugiere que CRC08319 es una enzima secretada. La secuencia de proteínas madura predicha de CRC08319 se expone en SEQ ID NO: 6.

#### **EJEMPLO 6 - Expresión de CRC08319**

Se sintetizó la secuencia de ADN sintético de codones optimizados que codifica la proteína CRC08319 de longitud completa (SEQ ID NO: 21) y se insertó en el vector de expresión pGXT de *Trichoderma reesei* (el mismo que el vector pTTTPyr2 descrito en la solicitud PCT publicada WO2015/017256, incorporada como referencia en el presente documento), dando como resultado el plásmido pGXT-CRC08319. En el vector pGXT, el gen *pyrG* de *Aspergillus nidulans* se sustituye por el gen *pyr2* de *Trichoderma reesei*. Los marcadores selectivos de *amdS* y *pyr2* de *Aspergillus nidulans* confieren

crecimiento de transformantes sobre acetamida como la única fuente de nitrógeno, y las regiones telómeras de *Trichoderma reesei* permiten el mantenimiento de plásmidos no cromosómicos en una célula fúngica. pGXT-CRC08319 contiene el promotor derivado de *cbhI* de *Trichoderma reesei* (*cbhI*) y regiones terminadoras de *cbhI* que permiten una fuerte expresión inducible del gen de interés.

Entonces se transformó el plásmido pGXT-CRC08319 en una cepa adecuada de *Trichoderma reesei* (método descrito en la solicitud PCT publicada WO 05/001036) usando transformación con protoplastos (Te'o el al. (2002) J. Microbiol. Methods 51:393-99).

Se seleccionaron transformantes en un medio sólido que contenía acetamida como la única fuente de nitrógeno (acetamida 0.6 g/l; cloruro de cesio 1.68 g/l; glucosa 20 g/l; dihidrogenofosfato de potasio 15 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado 0.6 g/l; cloruro de calcio dihidratado 0.6 g/l; sulfato de hierro (II) 5 mg/l; sulfato de cinc 1.4 mg/l; cloruro de cobalto (II) 1 mg/l; sulfato de manganeso (II) 1.6 mg/l; agar 20 g/l; pH 4.25). Las colonias transformadas aparecieron en aproximadamente 1 semana. Después del crecimiento sobre placas de acetamida, se recogieron los transformantes y se transfirieron individualmente a placas de acetamida-agar. Después de 5 días de crecimiento sobre placas de acetamida, los transformantes que presentaron morfología estable se inocularon en 200 µl de medio definido de glucosa/Sophorose en placas de microtitulación de 96 pocillos. La placa de microtitulación se incubó en una cámara de crecimiento con oxígeno a 28 °C durante 5 días. Se usaron sobrenadantes de estos cultivos para confirmar la expresión de proteínas por análisis de SDS-PAGE. Se seleccionó la cepa estable con la expresión de proteínas más alta y se sometió a fermentación en un matraz oscilante de 250 ml con medio definido de glucosa/Sophorose.

Se concentró el caldo en bruto hasta aproximadamente 80 ml usando un dispositivo de ultrafiltración VivaFlow 200 (Sartorius

Stedim). Entonces se añadió sulfato de amonio a la disolución concentrada hasta una concentración final de 1 M. Después de filtrar, se aplicó la fracción soluble resultante a una columna Phenyl-FF Sepharose de 60 ml previamente equilibrada con el tampón de carga que contenía fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) y sulfato de amonio 1 M. Se eluyó la proteína diana de la columna con fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) y sulfato de amonio 0.25 M. Se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron y posteriormente se cargaron sobre una columna de filtración en gel Superdex 75 previamente equilibrada con tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) complementado con NaCl 0.15 M adicional y 10 % de glicerol. Entonces se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa y se concentraron por los dispositivos Amicon Ultra de 10K, y se guardaron en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) complementado con NaCl 0.15 M y 40 % de glicerol a -20 °C hasta uso.

#### **EJEMPLO 7 - CRC08405 - DamPla1**

##### **Clonación de fosfolipasa DamPla1 de *Diaporthe ampelina* (CRC08405)**

Se identificó un supuesto gen de fosfolipasa, designado CRC08405, en *Diaporthe ampelina* y codifica una proteína con 100 % de homología con una secuencia disponible de la base de datos NCBI (N° de acceso de NCBI: KKY36548.1) como se determinó de una búsqueda de BLAST (Altschul et al., J Mol Biol, 215: 403-410, 1990). La secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de CRC08405 de longitud completa se proporciona en SEQ ID NO: 22. La proteína codificada correspondiente por el gen CRC08405 de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 7. En el extremo N, la proteína tiene un péptido señal con una longitud de 18 aminoácidos como se predice por SignalP versión 4.0 (Nordahl Petersen et al. (2011) Nature Methods, **8**:785-786). La presencia de una secuencia señal sugiere que CRC08405 es una enzima secretada. La secuencia de proteínas madura predicha de CRC08405 se expone en SEQ ID NO: 8.

**EJEMPLO 8 - Expresión de CRC08405**

Se sintetizó la secuencia de ADN sintético de codones optimizados que codifica la proteína CRC08405 de longitud completa (SEQ ID NO: 22) y se insertó en el vector de expresión pGXT de *Trichoderma reesei* (el mismo que el vector pTTTPyr2 descrito en la solicitud PCT publicada WO2015/017256, incorporada como referencia en el presente documento), dando como resultado el plásmido pGXT-CRC08405. En el vector pGXT, el gen *pyrG* de *Aspergillus nidulans* se sustituye por el gen *pyr2* de *Trichoderma reesei*. Los marcadores selectivos de *amdS* y *pyr2* de *Aspergillus nidulans* confieren crecimiento de transformantes sobre acetamida como la única fuente de nitrógeno, y las regiones telómeras de *Trichoderma reesei* permiten el mantenimiento de plásmidos no cromosómicos en una célula fúngica. pGXT-CRC08405 contiene el promotor derivado de *cbhI* de *Trichoderma reesei* (*cbhI*) y regiones terminadoras de *cbhI* que permiten una fuerte expresión inducible del gen de interés.

Entonces se transformó el plásmido pGXT-CRC08405 en una cepa adecuada de *Trichoderma reesei* (método descrito en la solicitud PCT publicada WO 05/001036) usando transformación con protoplastos (Te'o el al. (2002) J. Microbiol. Methods 51:393-99).

Se seleccionaron transformantes en un medio sólido que contenía acetamida como la única fuente de nitrógeno (acetamida 0.6 g/l; cloruro de cesio 1.68 g/l; glucosa 20 g/l; dihidrogenofosfato de potasio 15 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado 0.6 g/l; cloruro de calcio dihidratado 0.6 g/l; sulfato de hierro (II) 5 mg/l; sulfato de cinc 1.4 mg/l; cloruro de cobalto (II) 1 mg/l; sulfato de manganeso (II) 1.6 mg/l; agar 20 g/l; pH 4.25). Las colonias transformadas aparecieron en aproximadamente 1 semana. Después del crecimiento sobre placas de acetamida, se recogieron los transformantes y se transfirieron individualmente a placas de acetamida-agar. Después de 5 días de crecimiento sobre placas de acetamida, los transformantes que presentaron morfología estable se inocularon en 200 µl de medio

definido de glucosa/Sophorose en placas de microtitulación de 96 pocillos. La placa de microtitulación se incubó en una cámara de crecimiento con oxígeno a 28 °C durante 5 días. Se usaron sobrenadantes de estos cultivos para confirmar la expresión de proteínas por análisis de SDS-PAGE. Se seleccionó la cepa estable con la expresión de proteínas más alta y se sometió a fermentación en un matraz oscilante de 250 ml con medio definido de glucosa/Sophorose.

Se concentró el caldo en bruto hasta aproximadamente 80 ml usando un dispositivo de ultrafiltración VivaFlow 200 (Sartorius Stedim). Entonces se añadió sulfato de amonio a la disolución concentrada hasta una concentración final de 1 M. Después de filtrar, se aplicó la fracción soluble resultante a una columna Phenyl-FF Sepharose de 60 ml previamente equilibrada con el tampón de carga que contenía fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) y sulfato de amonio 1 M. Se eluyó la proteína diana de la columna con fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0). Se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron y posteriormente se cargaron sobre una columna HiPrep Q-XL Sepharose previamente equilibrada con tampón Tris 20 mM (pH 8.0). Se eluyó la proteína diana con tampón Tris 20 mM (pH 8.0) y un gradiente de NaCl de 0 - 0.5 M. Entonces se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa y se concentraron por los dispositivos Amicon Ultra de 10K, y se guardaron en tampón Tris 20 mM (pH 8.0) complementado con NaCl 0.15 M y 40 % de glicerol a -20 °C hasta uso.

#### **EJEMPLO 9 - CRC08418 - MorPla3**

##### **Clonación de fosfolipasa MorPla3 de *Magnaporthe oryzae* Y34 (CRC08418)**

Se identificó un supuesto gen de fosfolipasa, designado CRC08418, en *Magnaporthe oryzae* Y34 y codifica una proteína con 100 % de homología con una secuencia disponible de la base de datos NCBI (N° de acceso de NCBI: ELQ41978.1) como se determinó de

una búsqueda de BLAST (Altschul et al., J Mol Biol, 215: 403-410, 1990). La secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de CRC08418 de longitud completa se proporciona en SEQ ID NO: 23. La proteína codificada correspondiente por el gen CRC08418 de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 9. En el extremo N, la proteína tiene un péptido señal con una longitud de 25 aminoácidos como se predice por SignalP versión 4.0 (Nordahl Petersen et al. (2011) Nature Methods, **8**:785-786). La presencia de una secuencia señal sugiere que CRC08418 es una enzima secretada. La secuencia de proteínas madura predicha de CRC08418 se expone en SEQ ID NO: 10.

#### **EJEMPLO 10 - Expresión de CRC08418**

Se sintetizó la secuencia de ADN sintético de codones optimizados que codifica la proteína CRC08418 de longitud completa (SEQ ID NO: 23) y se insertó en el vector de expresión pGXT de *Trichoderma reesei* (el mismo que el vector pTTTpyr2 descrito en la solicitud PCT publicada WO2015/017256, incorporada como referencia en el presente documento), dando como resultado el plásmido pGXT-CRC0418. En el vector pGXT, el gen *pyrG* de *Aspergillus nidulans* se sustituye por el gen *pyr2* de *Trichoderma reesei*. Los marcadores selectivos de *amdS* y *pyr2* de *Aspergillus nidulans* confieren crecimiento de transformantes sobre acetamida como la única fuente de nitrógeno, y las regiones telómeras de *Trichoderma reesei* permiten el mantenimiento de plásmidos no cromosómicos en una célula fúngica. pGXT-CRC08418 contiene el promotor derivado de *cbhI* de *Trichoderma reesei* (*cbhI*) y regiones terminadoras de *cbhI* que permiten una fuerte expresión inducible del gen de interés.

Entonces se transformó el plásmido pGXT-CRC08418 en una cepa adecuada de *Trichoderma reesei* (método descrito en la solicitud PCT publicada WO 05/001036) usando transformación con protoplastos (Te'o et al. (2002) J. Microbiol. Methods 51:393-99).

Se seleccionaron transformantes en un medio sólido que contenía acetamida como la única fuente de nitrógeno (acetamida

0.6 g/l; cloruro de cesio 1.68 g/l; glucosa 20 g/l; dihidrogenofosfato de potasio 15 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado 0.6 g/l; cloruro de calcio dihidratado 0.6 g/l; sulfato de hierro (II) 5 mg/l; sulfato de cinc 1.4 mg/l; cloruro de cobalto (II) 1 mg/l; sulfato de manganeso (II) 1.6 mg/l; agar 20 g/l; pH 4.25). Las colonias transformadas aparecieron en aproximadamente 1 semana. Después del crecimiento sobre placas de acetamida, se recogieron los transformantes y se transfirieron individualmente a placas de acetamida-agar. Después de 5 días de crecimiento sobre placas de acetamida, los transformantes que presentaron morfología estable se inocularon en 200 µl de medio definido de glucosa/Sophorose en placas de microtitulación de 96 pocillos. La placa de microtitulación se incubó en una cámara de crecimiento con oxígeno a 28 °C durante 5 días. Se usaron sobrenadantes de estos cultivos para confirmar la expresión de proteínas por análisis de SDS-PAGE. Se seleccionó la cepa estable con la expresión de proteínas más alta y se sometió a fermentación en un matraz oscilante de 250 ml con medio definido de glucosa/Sophorose.

Se concentró el caldo en bruto hasta aproximadamente 80 ml usando un dispositivo de ultrafiltración VivaFlow 200 (Sartorius Stedim). Entonces se añadió sulfato de amonio a la disolución concentrada hasta una concentración final de 0.8 M. Después de filtrar, se aplicó la fracción soluble resultante a una columna Phenyl-FF Sepharose de 60 ml previamente equilibrada con el tampón de carga que contenía fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) y sulfato de amonio 1 M. Se eluyó la proteína diana de la columna con fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0). Se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron y posteriormente se cargaron sobre una columna de filtración en gel Superdex 75 previamente equilibrada con tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) con NaCl 0.15 M (pH 7.0). Entonces se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa y se concentraron por los

dispositivos Amicon Ultra de 10K, y se guardaron en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) con NaCl 0.15 M (pH 7.0) y 40 % de glicerol a -20 °C hasta uso.

#### **EJEMPLO 11 - CRC08826 - NdiPla1**

##### **Clonación de fosfolipasa NdiPla1 de *Neonectria ditissima* (CRC08826)**

Se identificó un supuesto gen de fosfolipasa, designado CRC08826, en *Neonectria ditissima* y codifica una proteína con 100 % de homología con una secuencia disponible de la base de datos NCBI (N° de acceso de NCBI: KPM45012.1) como se determinó de una búsqueda de BLAST (Altschul et al., J Mol Biol, 215: 403-410, 1990). La secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de longitud completa CRC08826 se proporciona en SEQ ID NO: 24. La proteína codificada correspondiente por el gen de longitud completa CRC08826 gene se muestra en SEQ ID NO: 11. En el extremo N, la proteína tiene un péptido señal con una longitud de 16 aminoácidos como se predice por SignalP versión 4.0 (Nordahl Petersen et al. (2011) Nature Methods, **8**:785-786). La presencia de una secuencia señal sugiere que CRC08826 es una enzima secretada. La secuencia de proteínas madura predicha de CRC08826 se expone en SEQ ID NO: 12.

#### **EJEMPLO 12 - Expresión de CRC08826**

Se sintetizó la secuencia de ADN sintético de codones optimizados que codifica la proteína CRC08826 de longitud completa (SEQ ID NO: 24) y se insertó en el vector de expresión pGXT de *Trichoderma reesei* (el mismo que el vector pTTTpyr2 descrito en la solicitud PCT publicada WO2015/017256, incorporada como referencia en el presente documento), dando como resultado el plásmido pGXT-CRC08826. En el vector pGXT, el gen *pyrG* de *Aspergillus nidulans* se sustituye por el gen *pyr2* de *Trichoderma reesei*. Los marcadores selectivos de *amdS* y *pyr2* de *Aspergillus nidulans* confieren crecimiento de transformantes sobre acetamida como la única fuente de nitrógeno, y las regiones telómeras de *Trichoderma reesei* permiten el mantenimiento de plásmidos no cromosómicos en una

célula fúngica. pGXT-CRC08826 contiene el promotor derivado de *cbhI* de *Trichoderma reesei* (*cbhI*) y regiones terminadoras de *cbhI* que permiten una fuerte expresión inducible del gen de interés.

Entonces se transformó el plásmido pGXT-CRC08826 en una cepa adecuada de *Trichoderma reesei* (método descrito en la solicitud PCT publicada WO 05/001036) usando transformación con protoplastos (Te'o et al. (2002) J. Microbiol. Methods 51:393-99). Se seleccionaron transformantes en un medio sólido que contenía acetamida como la única fuente de nitrógeno (acetamida 0.6 g/l; cloruro de cesio 1.68 g/l; glucosa 20 g/l; dihidrogenofosfato de potasio 15 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado 0.6 g/l; cloruro de calcio dihidratado 0.6 g/l; sulfato de hierro (II) 5 mg/l; sulfato de cinc 1.4 mg/l; cloruro de cobalto (II) 1 mg/l; sulfato de manganeso (II) 1.6 mg/l; agar 20 g/l; pH 4.25). Las colonias transformadas aparecieron en aproximadamente 1 semana. Después del crecimiento sobre placas de acetamida, se recogieron los transformantes y se transfirieron individualmente a placas de acetamida-agar. Después de 5 días de crecimiento sobre placas de acetamida, los transformantes que presentaron morfología estable se inocularon en 200 µl de medio definido de glucosa/Sophorose en placas de microtitulación de 96 pocillos. La placa de microtitulación se incubó en una cámara de crecimiento con oxígeno a 28 °C durante 5 días. Se usaron sobrenadantes de estos cultivos para confirmar la expresión de proteínas por análisis de SDS-PAGE. Se seleccionó la cepa estable con la expresión de proteínas más alta y se sometió a fermentación en un matraz oscilante de 250 ml con medio definido de glucosa/Sophorose.

Se concentró el caldo en bruto hasta aproximadamente 80 ml usando un dispositivo de ultrafiltración VivaFlow 200 (Sartorius Stedim). Entonces se añadió sulfato de amonio a la disolución concentrada hasta una concentración final de 1 M. Después de filtrar, se aplicó la fracción soluble resultante a una columna HiPrep Phenyl FF 16/10 previamente equilibrada con el tampón de

carga que contenía fosfato de sodio 20 mM (pH 5.0) y sulfato de amonio 1 M. Se eluyó la proteína diana de la columna con fosfato de sodio 20 mM (pH 5.0) y un gradiente de sulfato de amonio 0.5 - 0 M. Se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron y posteriormente se cargaron sobre una columna HiPrep Q FF 16/10 previamente equilibrada con tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0). Se eluyó la proteína diana con tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) y un gradiente de NaCl de 0 - 0.5 M. Entonces se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron y posteriormente se cargaron sobre una columna HiLoad 26/60 Superdex 75 Prep previamente equilibrada con acetato sódico 20 mM (pH 5.0) y NaCl 150 mM. Se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron y se cargaron sobre una columna HiPrep Phenyl HP 16/10 previamente equilibrada con el tampón de carga que contenía fosfato de sodio 20 mM (pH 5.0) y sulfato de amonio 1 M. Se eluyó la proteína diana con fosfato de sodio 20 mM (pH 5.0) y un gradiente de sulfato de amonio 0.75 - 0 M. Se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron por los dispositivos Amicon Ultra de 10K y se guardaron en fosfato de sodio 20 mM (pH 5.0) y 40 % de glicerol a -20 °C hasta uso.

#### **EJEMPLO 13 - CRC08833 - TgaPla1**

##### **Clonación de fosfolipasa TgaPla1 de *Trichoderma gamsii* (CRC08833)**

Se identificó un supuesto gen de fosfolipasa, designado CRC08833, en *Trichoderma gamsii* y codifica una proteína con 100 % de homología con una secuencia disponible de la base de datos NCBI (N° de acceso de NCBI: KUF04745.1) como se determinó de una búsqueda de BLAST (Altschul et al., J Mol Biol, 215: 403-410, 1990). La secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de longitud completa CRC08833 se proporciona en SEQ ID NO: 25. La proteína codificada correspondiente por el gen CRC08833 de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 13. En el

extremo N, la proteína tiene un péptido señal con una longitud de 16 aminoácidos como se predice por SignalP versión 4.0 (Nordahl Petersen et al. (2011) Nature Methods, **8**:785-786). La presencia de una secuencia señal sugiere que CRC08833 es una enzima secretada. La secuencia de proteínas madura predicha de CRC08826 se expone en SEQ ID NO: 14.

#### **EJEMPLO 14 - Expresión de CRC08833**

Se sintetizó la secuencia de ADN sintético de codones optimizados que codifica la proteína CRC08833 de longitud completa (SEQ ID NO: 25) y se insertó en el vector de expresión pGXT de *Trichoderma reesei* (el mismo que el vector pTTTPyr2 descrito en la solicitud PCT publicada WO2015/017256, incorporada como referencia en el presente documento), dando como resultado el plásmido pGXT-CRC08833. En el vector pGXT, el gen *pyrG* de *Aspergillus nidulans* se sustituye por el gen *pyr2* de *Trichoderma reesei*. Los marcadores selectivos de *amdS* y *pyr2* de *Aspergillus nidulans* confieren crecimiento de transformantes sobre acetamida como la única fuente de nitrógeno, y las regiones telómeras de *Trichoderma reesei* permiten el mantenimiento de plásmidos no cromosómicos en una célula fúngica. pGXT-CRC08833 contiene el promotor derivado de *cbhI* de *Trichoderma reesei* (*cbhI*) y regiones terminadoras de *cbhI* que permiten una fuerte expresión inducible del gen de interés.

Entonces se transformó el plásmido pGXT-CRC08833 en una cepa adecuada de *Trichoderma reesei* (método descrito en la solicitud PCT publicada WO 05/001036) usando transformación con protoplastos (Te'o el al. (2002) J. Microbiol. Methods 51:393-99). Se seleccionaron transformantes en un medio sólido que contenía acetamida como la única fuente de nitrógeno (acetamida 0.6 g/l; cloruro de cesio 1.68 g/l; glucosa 20 g/l; dihidrogenofosfato de potasio 15 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado 0.6 g/l; cloruro de calcio dihidratado 0.6 g/l; sulfato de hierro (II) 5 mg/l; sulfato de cinc 1.4 mg/l; cloruro de cobalto (II) 1 mg/l; sulfato de manganeso (II) 1.6 mg/l; agar 20 g/l; pH 4.25). Las

colonias transformadas aparecieron en aproximadamente 1 semana. Después del crecimiento sobre placas de acetamida, se recogieron los transformantes y se transfirieron individualmente a placas de acetamida-agar. Después de 5 días de crecimiento sobre placas de acetamida, los transformantes que presentaron morfología estable se inocularon en 200 µl de medio definido de glucosa/Sophorose en placas de microtitulación de 96 pocillos. La placa de microtitulación se incubó en una cámara de crecimiento con oxígeno a 28 °C durante 5 días. Se usaron sobrenadantes de estos cultivos para confirmar la expresión de proteínas por análisis de SDS-PAGE. Se seleccionó la cepa estable con la expresión de proteínas más alta y se sometió a fermentación en un matraz oscilante de 250 ml con medio definido de glucosa/Sophorose.

Se concentró el caldo en bruto hasta aproximadamente 80 ml usando un dispositivo de ultrafiltración VivaFlow 200 (Sartorius Stedim). Entonces se añadió sulfato de amonio a la disolución concentrada hasta una concentración final de 1 M. Después de filtrar, se aplicó la fracción soluble resultante a una columna Phenyl-FF Sepharose de 60 ml previamente equilibrada con el tampón de carga que contenía fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) y sulfato de amonio 1 M. Se eluyó la proteína diana de la columna con fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) y sulfato de amonio 0.5 M. Se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron y posteriormente se cargaron sobre una columna HiLoad Q\_XL Sepharose previamente equilibrada con tampón Tris 20 mM (pH 8.0). Se eluyó la proteína diana con tampón Tris 20 mM (pH 8.0) y un gradiente de NaCl de 0 - 0.5 M. Entonces se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa y se concentraron por los dispositivos Amicon Ultra de 10K y se guardaron en tampón Tris 20 mM (pH 8.0) y 40 % de glicerol a -20 °C hasta uso.

#### **EJEMPLO 15 - CRC08845 - ManPla1**

**Clonación de fosfolipasa ManPla1 de *Metarhizium anisopliae* BRIP 53293 (CRC08845)**

Se identificó un supuesto gen de fosfolipasa, designado CRC08845, en *Metarhizium anisopliae* BRIP 53293 y codifica una proteína con 100 % de homología con una secuencia disponible de la base de datos NCBI (Nº de acceso de NCBI: KJK84204.1) como se determinó de una búsqueda de BLAST (Altschul et al., J Mol Biol, 215: 403-410, 1990). La secuencia de ácidos nucleicos sintética de codones optimizados de longitud completa CRC08845 se proporciona en SEQ ID NO: 26. La proteína codificada correspondiente por el gen CRC08845 de longitud completa se muestra en SEQ ID NO: 15. En el extremo N, la proteína tiene un péptido señal con una longitud de 16 aminoácidos como se predice por SignalP versión 4.0 (Nordahl Petersen et al. (2011) Nature Methods, **8**:785-786). La presencia de una secuencia señal sugiere que CRC08845 es una enzima secretada. La secuencia de proteínas madura predicha de CRC08845 se expone en SEQ ID NO: 16.

**EJEMPLO 16 - Expresión de CRC08845**

Se sintetizó la secuencia de ADN sintético de codones optimizados que codifica la proteína CRC08845 de longitud completa (SEQ ID NO: 26) y se insertó en el vector de expresión pGXT de *Trichoderma reesei* (el mismo que el vector pTTTpyr2 descrito en la solicitud PCT publicada WO2015/017256, incorporada como referencia en el presente documento), dando como resultado el plásmido pGXT-CRC08845. En el vector pGXT, el gen *pyrG* de *Aspergillus nidulans* se sustituye por el gen *pyr2* de *Trichoderma reesei*. Los marcadores selectivos de *amdS* y *pyr2* de *Aspergillus nidulans* confieren crecimiento de transformantes sobre acetamida como la única fuente de nitrógeno, y las regiones telómeras de *Trichoderma reesei* permiten el mantenimiento de plásmidos no cromosómicos en una célula fúngica. pGXT-CRC08845 contiene el promotor derivado de *cbhI* de *Trichoderma reesei* (*cbhI*) y regiones terminadoras de *cbhI* que permiten una fuerte expresión inducible del gen de interés.

Entonces se transformó el plásmido pGXT-CRC08845 en una cepa adecuada de *Trichoderma reesei* (método descrito en la solicitud PCT publicada WO 05/001036) usando transformación con protoplastos (Te'o el al. (2002) J. Microbiol. Methods 51:393-99). Se seleccionaron transformantes en un medio sólido que contenía acetamida como la única fuente de nitrógeno (acetamida 0.6 g/l; cloruro de cesio 1.68 g/l; glucosa 20 g/l; dihidrogenofosfato de potasio 15 g/l; sulfato de magnesio heptahidratado 0.6 g/l; cloruro de calcio dihidratado 0.6 g/l; sulfato de hierro (II) 5 mg/l; sulfato de cinc 1.4 mg/l; cloruro de cobalto (II) 1 mg/l; sulfato de manganeso (II) 1.6 mg/l; agar 20 g/l; pH 4.25). Las colonias transformadas aparecieron en aproximadamente 1 semana. Después del crecimiento sobre placas de acetamida, se recogieron los transformantes y se transfirieron individualmente a placas de acetamida-agar. Después de 5 días de crecimiento sobre placas de acetamida, los transformantes que presentaron morfología estable se inocularon en 200 µl de medio definido de glucosa/Sophorose en placas de microtitulación de 96 pocillos. La placa de microtitulación se incubó en una cámara de crecimiento con oxígeno a 28 °C durante 5 días. Se usaron sobrenadantes de estos cultivos para confirmar la expresión de proteínas por análisis de SDS-PAGE. Se seleccionó la cepa estable con la expresión de proteínas más alta y se sometió a fermentación en un matraz oscilante de 250 ml con medio definido de glucosa/Sophorose.

Se concentró el caldo en bruto hasta aproximadamente 80 ml usando un dispositivo de ultrafiltración VivaFlow 200 (Sartorius Stedim). Entonces se añadió sulfato de amonio a la disolución concentrada hasta una concentración final de 1 M. Después de filtrar, se aplicó la fracción soluble resultante a una columna Butyl FF previamente equilibrada con el tampón de carga que contenía acetato sódico 20 mM (pH 5.0) y sulfato de amonio 1 M. Se eluyó la proteína diana de la columna con acetato sódico 20 mM (pH 5.0) y un gradiente de sulfato de amonio 0.3 - 0 M. Se reunieron

las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron y posteriormente se cargaron sobre una columna Q HP previamente equilibrada con tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0). Se eluyó la proteína diana con tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 7.0) y un gradiente de NaCl de 0 - 0.5 M. Entonces se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron y posteriormente se cargaron sobre una columna Q HP previamente equilibrada con tampón Tris 20 mM (pH 8.0). Se eluyó la proteína diana con tampón Tris 20 mM (pH 8.0) y un gradiente de NaCl de 0 - 0.5 M. Entonces se reunieron las fracciones que contenían la proteína diana activa, se concentraron por los dispositivos Amicon Ultra de 10K y se guardaron en tampón Tris 20 mM (pH 8.0), NaCl 0.15 M y 40 % de glicerol a -20 °C hasta uso.

**EJEMPLO 17. Caracterización de fosfolipasas de la presente invención con respecto a Powerbake 4080 y Lipopan F**

Se hace caracterización enzimática por determinación de la actividad específica usando diferentes sustratos de lípidos según los métodos de actividad presentados en 'Ensayos y métodos'. Powerbake 4080 es un producto comercial de DuPont. Powerbake 4080 actúa sobre un lípido polar en la posición sn1. El componente de enzima activa de Powerbake 4080 se expone como SEQ ID NO: 6 de la patente de EE. UU. N° 8,012,732 incorporada por este documento como referencia (también se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 17). Esta enzima se conoce por tener tanto actividad de galactolipasa como de fosfolipasa. Lipopan F es un producto comercial de Novozymes. La enzima activa en Lipopan F actúa sobre el lípido polar en la posición sn1 y está en SEQ ID NO: 2 del documento de patente EP0869167B incorporado por este documento como referencia (también se expone en el presente documento como SEQ ID NO: 18). Esta enzima también se conoce por tener actividad de galactolipasa.

Se determinan actividades específicas usando sustrato de fosfatidilcolina (ensayo de PC-P), sustrato de

lisofosfatidilcolina (ensayo de LPC-P), sustrato de N-acilfosfatidiletanolamina (ensayo de NAPE-P) y sustrato de liso-N-acilfosfatidiletanolcolina (ensayo de NALPE-P). Las actividades se presentan con respecto a la concentración de proteína, presentando la actividad específica de las diversas enzimas que usan diferentes sustratos - véase la Tabla 2.

| CRC0           | PC-U/mg de proteína enzimática | LPC-U/mg de proteína enzimática | NAPE-U/mg de proteína enzimática | NALPE-U/mg de proteína enzimática |
|----------------|--------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|
| 8319           | 298                            | 0.22                            | 1439                             | 0.67                              |
| 8405           | 154                            | 0.08                            | 28                               | 0.02                              |
| 8418           | 899                            | 0.18                            | 2573                             | 0.47                              |
| 8826           | 328                            | 0.19                            | 2008                             | 0.32                              |
| 8845           | 156                            | 0.31                            | 1357                             | 0.54                              |
| 8316           | 307                            | 0.12                            | 16                               | 0.02                              |
| 8310           | 448                            | 0.25                            | 1653                             | 0.35                              |
| 8833           | 40                             | 0.07                            | 7                                | 0.01                              |
| Powerbake 4080 | 1416                           | 28                              | 1591                             | 317                               |
| Lipopan F      | 605                            | 12.7                            | 763                              | 105                               |

**Tabla 2.** Actividades específicas de enzima (unidad de actividad/mg de proteína enzimática)

Como se puede apreciar de la Tabla 2, todas las enzimas (excepto Powerbake 4080 y Lipopan F) muestran actividad específica muy baja por el sustrato LPC y NALPE. La relación entre LPC y PC, así como la relación entre la actividad de NALPE y de NAPE, se presenta en la Tabla 3.

| CRC0 | SEQ ID NO: | LPC-U/PC-U | NALPE-U/NAPE-U |
|------|------------|------------|----------------|
| 8319 | 6          | 0.00072    | 0.00047        |
| 8405 | 8          | 0.00054    | 0.00070        |
| 8418 | 10         | 0.00020    | 0.00018        |

|                |    |         |         |
|----------------|----|---------|---------|
| 8826           | 12 | 0.00059 | 0.00016 |
| 8845           | 16 | 0.00199 | 0.00040 |
| 8316           | 4  | 0.00040 | 0.00126 |
| 8310           | 2  | 0.00056 | 0.00021 |
| 8833           | 14 | 0.00174 | 0.00151 |
| Powerbake 4080 | 17 | 0.02009 | 0.19961 |
| Lipopan F      | 18 | 0.02099 | 0.13745 |

**Tabla 3.** Relación entre la actividad específica por LPC y PC (LPC-U/PC-U) y NALPE y NAPE (NALPE-U/NAPE-U). Más específicamente  $\text{LPC-U/PC-U} = (\text{LPC-U/mg de proteína}) / (\text{PC-U/mg de proteína})$  y  $\text{NALPE-U/NAPE-U} = (\text{NALPE-U/mg de proteína}) / (\text{NAPE-U/mg de proteína})$ .

Es evidente de la Tabla 3 que los candidatos probados muestran actividad significativamente más baja hacia el sustrato de lisofosfolípido con respecto a sustratos de fosfolípido que los productos enzimáticos comercializados existentes, tales como Powerbake 4080 y Lipopan F.

Los candidatos evaluados representan sorprendentemente un nuevo grupo de fosfolipasas - 'Sin lisofosfolipasas' - que se caracterizan por no tener actividad de lisofosfolipasa o extremadamente baja.

Los actuales productos comercializados muestran relaciones LPC-U/PC-U o NALPE-U/NAPE-U por encima de, respectivamente, 0.02 y 0.13, mientras que, a diferencia, 'Sin lisofosfolipasas' muestra relaciones inferiores, respectivamente, 0.002 y 0.0016. Así, las relaciones de 'Sin lisofosfolipasas' son inferiores a los actuales productos comercializados en un factor de 10 y 80, respectivamente.

Esta característica de actividad de 'Sin lisofosfolipasa' proporciona la oportunidad de un sistema más robusto que genera componentes emulsionantes en la matriz alimentaria que contiene lípidos.

Las 'Sin lisofosfolipasas' proporcionan sistemas más robustos por eliminación del riesgo de sobredosis como se observa con las

actuales enzimas comercializadas. Las 'Sin lisofosfolipasas' permiten la generación de componentes emulsionantes sin arriesgar la degradación de los componentes emulsionantes generados (de tipo lisofosfolípido, es decir, LPC o NALPE). Así, se elimina el 'efecto de continuación' observado con las actuales enzimas comercializadas, donde los componentes de lisofosfolípido no solo se generan, sino que también se hidrolizan/degradan más, proporcionando las posibilidades de niveles más altos globales de componentes emulsionantes.

**EJEMPLO 18. Caracterización de la especificidad de las posiciones de fosfolipasa.**

Se caracterizó la especificidad de las posiciones de enzima por determinación de la liberación de ácidos grasos libres (FFA) de sustrato de PC y NAPE diseñado específico. La determinación de FFA se hizo por análisis de GLC como se presentó en 'Cromatografía de gases (GLC)' después del 'Ensayo para la determinación de la actividad de fosfolipasa y especificidad de las posiciones sn1 y sn2 en PC (fosfatidilcolina)' y 'Ensayo para la determinación de la actividad de fosfolipasa y especificidad de las posiciones sn1 y sn2 en NAPE (N-acilfosfatidiletanolamina)' en 'Ensayos y métodos'.

La especificidad se determinó ensayando la liberación de ácidos grasos libres (FFA) por análisis de GLC. Basándose en el patrón interno (ácido graso C17:0), se determinó la cantidad de respectivamente ácido graso C16:0 y C18:1 con el ensayo de PC y ácido graso C16:0 y C18:2 con el ensayo de NAPE. La especificidad de las posiciones se presenta como el % relativo de actividad de PLA1 y % relativo de PLA2. Refiérase a la Tabla 4 y 4a para la identificación de especificidad de los diferentes candidatos usando respectivamente el ensayo de especificidad de las posiciones de PC y de NAPE.

| PC (C16:0, C18:1) | % relativo |      | Relación |
|-------------------|------------|------|----------|
|                   | PLA1       | PLA2 | sn1/sn2  |

| PC (C16:0, C18:1) | % relativo |      | Relación |
|-------------------|------------|------|----------|
|                   | PLA1       | PLA2 | sn1/sn2  |
| CRC08310          | 72         | 28   | 72/28    |
| CRC08316          | 75         | 25   | 75/25    |
| CRC08319          | 74         | 26   | 74/26    |
| CRC08405          | 75         | 25   | 75/25    |
| CRC08418          | 82         | 18   | 82/18    |
| CRC08826          | 82         | 18   | 82/18    |
| CRC08833          | 75         | 25   | 75/25    |
| CRC08845          | 75         | 25   | 75/25    |
| Powerbake 4080    | 77         | 23   | 77/23    |
| Lipopan F         | 75         | 25   | 75/25    |

**Tabla 4.** Especificidad de las posiciones de fosfolipasas como se ha determinado por 'Ensayo para la determinación de la actividad de fosfolipasa y especificidad de las posiciones sn1 y sn2 en PC (fosfatidilcolina)' y la presentación de la relación sn1/sn2.

| NAPE (C16:0, C18:2) | % Relativo |      | Relación |
|---------------------|------------|------|----------|
|                     | PLA1       | PLA2 | sn1/sn2  |
| CRC08310            | 91         | 9    | 91/9     |
| CRC08316            | 81         | 19   | 81/19    |
| CRC08319            | 89         | 11   | 89/11    |
| CRC08405            | 91         | 9    | 91/9     |
| CRC08418            | 82         | 18   | 82/18    |
| CRC08826            | 90         | 10   | 90/10    |
| CRC08833            | 79         | 21   | 79/21    |
| CRC08845            | 90         | 10   | 90/10    |
| Powerbake 4080      | 89         | 11   | 89/11    |
| Lipopan F           | 88         | 12   | 88/12    |

**Tabla 4a.** Especificidad de las posiciones de fosfolipasas como se ha determinado por 'Ensayo para la determinación de la actividad de fosfolipasa y especificidad de las posiciones sn1 y

sn2 en NAPE (N-acilfosfatidiletanolamina)' y la presentación de la relación sn1/sn2.

**EJEMPLO 19. Experimentos de horneado que prueban el efecto de aplicación y el perfil de lípidos de la masa de 'Sin lisofosfolipasas' frente a la fosfolipasa comercializada Lipopan F**

En este experimento, se probó el actual producto de fosfolipasa comercializado Lipopan F en una configuración experimental de panecillo para mostrar el rendimiento de aplicación aumentando las dosificaciones y el perfil de lípidos correlacionados de la matriz de masa. Además, se probó en comparación el rendimiento de la aplicación y el perfil de lípidos de la masa de 'Sin lisofosfolipasa' CRC08319.

Se hizo el horneado del panecillo según la descripción 'Panecillo' presentada en la sección de 'Ensayo y métodos' anterior.

La configuración experimental de los ensayos de aplicación y los resultados de la evaluación del horneado, así como el perfil de lípidos de la masa, se presentan en, respectivamente, la Tabla 5 (A y B), la Figura 1 (A y B) y **¡Error! Fuente de referencia no encontrada.** (A y B).

**Tabla 5A y B. Configuración experimental de la prueba de dosis-respuesta a enzima en el horneado de panecillos.**

Todas las dosis se presentan como dosis con respecto a la dosis óptima de Lipopan F (relativa basada en mg de proteína/kg de harina). La dosis óptima de Lipopan F se define como la dosis que proporciona el volumen específico más alto en la configuración de horneado presentada. La dosis óptima de Lipopan F se presenta por '1', Controles negativos se presentan por '0'.

Por ejemplo, Ensayo 2 de dosis-respuesta de Lipopan F (Tabla 5A): Una dosis de Lipopan F de 0.10 refleja que la dosis de Lipopan F en este ensayo fue '0.10 x Dosis óptima de Lipopan F' - o en otras palabras, que la dosis de Lipopan F en este ensayo fue el 10 % de las dosis usadas en el ensayo que muestra la dosis

óptima de Lipopan F (el ensayo que muestra el volumen específico más alto (Ensayo 4)).

Tabla 5A: Horneado de panecillos - Dosis-respuesta a Lipopan F

| Dosis-respuesta a Lipopan F (x Dosis óptima (Lipopan F)) | Ensayo 1                                                   | Ensayo 2 | Ensayo 3 | Ensayo 4                            | Ensayo 5 |
|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------|----------|-------------------------------------|----------|
|                                                          | Dosis relativa con respecto a la dosis óptima de Lipopan F |          |          |                                     |          |
|                                                          | 0                                                          | 0.10     | 0.33     | 1.00<br>(dosis óptima de Lipopan F) | 3.33     |

Tabla 5B: Horneado de panecillos - Dosis-respuesta a CRC08319

| Dosis-respuesta a CRC08319 (x Dosis óptima (Lipopan F)) | Ensayo 1                                                   | Ensayo 2 | Ensayo 3 | Ensayo 4 | Ensayo 5 |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|----------|
|                                                         | Dosis relativa con respecto a la dosis óptima de Lipopan F |          |          |          |          |
|                                                         | 0                                                          | 0.83     | 3.33     | 6.67     | 20       |

La Figura 1A representa el volumen específico de panecillos (cm<sup>3</sup>/g) presentado como una función de la dosis óptima de Lipopan F.

La dosis óptima de Lipopan F se define como la dosis de Lipopan F que proporciona el mayor volumen específico en la configuración de horneado presentada - y la dosis óptima de Lipopan F se presenta por '1'. Todas las otras dosis presentadas son con respecto a la dosis óptima de Lipopan (basada en mg de proteína/kg de harina). 0 representa Control negativo. Dosis-respuesta de Lipopan F. 0 representa Control negativo (Sin enzima añadida) y '1' representa dosis óptima de Lipopan F (= volumen específico más alto).

La Figura 1B representa la dosis-respuesta de 'CRC08319 - Sin lisofosfolipasa'. 0 representa Control negativo (Sin enzima añadida) y las dosis de CRC08319 se presentan con respecto a la dosis óptima de Lipopan F (dosis relativa basada en mg de proteína/kg de harina).

Lipopan F presenta la dosis óptima representada por '1 x Dosis óptima'. Al aumentar la dosis, Lipopan F muestra sobredosis presentada por una disminución en el volumen específico. A diferencia, aumentar la dosis de CRC08319 muestra un aumento continuado o nivelado en el nivel específico.

Se congelaron masas completamente fermentadas, se liofilizaron y se extrajeron los lípidos en la masa seca con butanol saturado en agua y se analizaron por HPLC según el procedimiento descrito en Ensayos y métodos. Los resultados se muestran en **¡Error! Fuente de referencia no encontrada.**

Los efectos de la aplicación sobre el volumen específico están respaldados por el perfil de lípidos. El actual producto comercializado - Lipopan F - muestra la hidrólisis de NAPE a NALPE, y a dosis más altas la hidrólisis adicional de NALPE a NAGPE que se alinea con una disminución en los volúmenes específicos. Con 80 % de hidrólisis de NAPE (NAPE se redujo a 20 % del nivel inicial (Nivel inicial = 0 x Dosis óptima (Ctrl negativo)), Lipopan F muestra la generación de NALPE de alrededor 60 %. Este 80 % de hidrólisis de NAPE y 60 % de generación de NALPE se correlacionan con la dosis óptima (mayor volumen específico = 1 x Dosis óptima) de Lipopan F. Lipopan F muestra alineamiento entre el volumen específico y el pico en niveles de NALPE. Para Lipopan F es evidente que el pico en los niveles de NALPE de alrededor 60 % va seguido por la reducción en NALPE a las dosis más altas probadas (dosis por encima de la dosis óptima (1)) que se alinean con la formación de NAGPE. Los niveles más altos de NAGPE se observan a la dosis más alta de Lipopan F.

A diferencia, 'Sin lisofosfolipasa' - CRC08319 - muestra la conversión completa de NAPE a NALPE. Al 80 % de hidrólisis de NAPE (NAPE se redujo hasta el 20 % del nivel inicial), los niveles de NALPE son un 80 %. Con hidrólisis adicional de NAPE, 'Sin lisofosfolipasa' muestra un aumento continuado o nivelado en los niveles de NALPE que también está alineado con el volumen específico.

Con la hidrólisis completa de NAPE (>90-95 % hidrolizado), el equilibrio de reacción empieza mostrando el aumento continuado o nivelado de los niveles de NALPE.

Incluso cuando 'Sin lisofosfolipasa' se administra 20 x dosis óptima de Lipopan F correspondiente hasta 4-6 veces la dosis de 'Sin lisofosfolipasa' dando como resultado la completa hidrólisis de NAPE (~10 % de NAPE residual), los niveles de NAGPE son todavía inferiores a 5 %.

#### **EJEMPLO 20. Aplicación de Sin lisofosfolipasas a matriz alimentaria de contiene lípidos**

Se puede usar Sin lisofosfolipasa, por ejemplo, en yema de huevo y huevos completos, en carnes procesadas, en el desengomado de aceites vegetales, en productos lácteos como queso y en productos de panadería tales como el pan y en productos de panadería tales como artículos de pastelería, que incluyen pasteles y galletas.

##### Productos que contienen yema de huevo

Se conoce bien la yema de huevo para su uso en la industria alimentaria debido a sus propiedades emulsionantes. Aproximadamente el 30 % del lípido en la yema de huevo es fosfolípido, que contribuye a las propiedades emulsionantes de las yemas de huevo. En muchos alimentos que incluyen mayonesa, salsas, aliños y pasteles, se explotan las propiedades emulsionantes de la yema de huevo. Para algunas aplicaciones para alimentos, sin embargo, las propiedades de emulsión de la yema de huevo no son suficientes para obtener un producto homogéneo sin separación. En

la mayonesa, por ejemplo, la pasteurización del producto a altas temperaturas provoca que el producto se separe. Se puede usar Sin lisofosfolipasa para modificar el fosfolípido a lisofosfolípido en la yema de huevo (y productos alimenticios que contienen yema de huevo). Se puede evitar la separación de productos en la pasteurización a altas temperaturas usando yema de huevo modificada con enzima.

#### Productos de carne procesada

Se puede usar Sin lisofosfolipasa en productos de carne procesada. Sin lisofosfolipasa contribuirá a mejorar la emulsión de los productos de carne procesada y contribuirá a una mejor consistencia y pérdida reducida por cocción. Sin lisofosfolipasa añadido a la carne procesada convertirá los fosfolípidos de la carne en lisofosfolípidos. Debido a las propiedades emulsionantes de los lisofosfolípidos, este componente contribuye a la consistencia mejorada y menos pérdida inducida por la cocción por la emulsión mejorada de la grasa en la carne.

#### Aceite vegetal

Los aceites vegetales crudos, como el aceite de soja, contienen 1-2 % de fosfolípidos. Los fosfolípidos se retiran del aceite durante el proceso de refinado, para mejorar la calidad del aceite y prevenir la sedimentación en el aceite. La retirada de fosfolípidos se realiza por un denominado proceso de desengomado durante el proceso de refinado del aceite. El desengomado se puede realizar por medios químicos o enzimáticos. En el proceso de desengomado, se puede usar 'Sin lisofosfolipasa' para convertir fosfolípidos en lisofosfolípidos que son más solubles en agua y se pueden retirar del aceite lavando con agua. La hidrólisis enzimática de los fosfolípidos es un proceso más suave en comparación con el desengomado químico que requiere condiciones alcalinas o ácidas agresivas. El desengomado con Sin lisofosfolipasa provocará menos efluentes.

#### Productos lácteos

Se puede usar Sin lisofosfolipasa en productos lácteos. Sin lisofosfolipasa contribuirá a aumentar el rendimiento durante la producción de queso. Sin lisofosfolipasa añadido a la leche convertirá los fosfolípidos de la leche en lisofosfolípidos. Debido a las propiedades de emulsión de los lisofosfolípidos, esto contribuirá a aumentar el rendimiento del queso atrapando más lípido en el queso en grano.

#### Productos de pastelería

Los huevos son una parte significativa de la mayoría de los productos de pastelería. Se puede usar Sin lisofosfolipasa para modificar los fosfolípidos en el huevo por producción de lisofosfolípidos, que contribuyen a la emulsión mejorada durante la mezcla de pastelería y da una miga más blanda y más tierna. Sin lisofosfolipasa también se puede usar directamente en la masa de pastelería para modificar los fosfolípidos de la harina.

#### **EJEMPLO 21. Efecto de horneado 'Sin lisofosfolipasa' en presencia del sustrato de suplemento - Lecitina (SOLEC F)**

En este ejemplo, se probó la combinación del 'Sin lisofosfolipasa' CRC08319 y Powerbake 4080 con y sin la presencia del sustrato de suplemento en forma de SOLEC F. SOLEC F es un producto comercial de DuPont. SOELC F es lecitina de soja desaceitada fácil de manipular. 'Sin lisofosfolipasa' CRC08319 y Powerbake 4080 muestran una marcada mejoría en tanto el volumen impactado como sin impactar en presencia del sustrato de suplemento. El efecto del sustrato de suplemento sin presencia de CRC08319 y Powerbake 4080 está muy limitado y en el caso de estabilidad al impacto es incluso posiblemente negativa. Se hizo la ruta de horneado de Esponja y masa según la descripción de 'Esponja y masa' presentada en la sección de 'Ensayo y métodos' anterior.

La configuración experimental del ensayo de aplicación y los resultados de la evaluación de horneado se presentan en respectivamente la Tabla 6 y la Figura 3.

Se presentan dosis de CRC08319 como dosis con respecto a la dosis óptima de Lipopan F (relativa basada en mg de proteína/kg de harina) como se presentó en el Ejemplo 19. La dosis óptima de Lipopan F se define como la dosis que da el volumen específico más alto en la configuración de horneado de panecillos presentada en el Ejemplo 19. La dosis óptima de Lipopan F se presenta por '1', Controles negativos se muestran como '0'.

Por ejemplo, la dosis de CRC08319 de 5x en este ensayo fue '5x Dosis óptima de Lipopan F' (basada en mg de proteína/kg de harina) como se presentó en la prueba de aplicación en panecillos en el Ejemplo 19.

|                       | Ensayo 1                                                                | Ensayo 2 | Ensayo 3 | Ensayo 4 |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
| SOLEC F <sup>TM</sup> |                                                                         |          | 0.3 %    | 0.3 %    |
| CRC08319              | Dosis relativa con respecto a la dosis óptima de Lipopan F (Ejemplo 19) |          |          |          |
|                       | 0                                                                       | 5x       | 0        | 5x       |
| Powerbake 4080        | 0                                                                       | 20 ppm   | 0        | 20 ppm   |

Tabla 6. Configuración experimental de la prueba de Esponja y masa de 'CRC08319 + Powerbake 4080' con y sin presencia de sustrato de suplemento (SOLEC F).

La Figura 3 muestra el volumen específico relativo de Esponja y masa como efecto de 'CRC08319 + Powerbake 4080' con y sin presencia de SOLEC F.

La Figura 3 presenta volúmenes específicos relativos (relativos con respecto al control negativo sin impactar) de hogazas impactadas y sin impactar. El ensayo de Esponja y masa muestra un claro aumento en el volumen específico - Sin impactar e Impactado - de 'CRC08319 + Powerbake 4080' frente al Control negativo (Ctrl neg) sin la presencia de SOLEC F. El efecto de 'CRC08319 + Powerbake 4080' en presencia de SOLEC F proporciona un aumento adicional en el volumen específico vs.

'CRC08319 + Powerbake 4080' sin presencia del suplemento SOLEC F.

Aunque la invención anterior se ha descrito en cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo, para los fines de claridad de entendimiento, ciertos cambios y modificaciones se pueden poner en práctica dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas. Además, cada referencia proporcionada en el presente documento se incorpora como referencia en su totalidad para todos los fines al mismo grado que si cada referencia se incorporara individualmente como referencia. En la medida en que el contenido de cualquier cita, que incluye página web o número de acceso, pueda cambiar con el tiempo, se entiende la versión vigente en la fecha de presentación de la presente solicitud. A menos que el contexto indique lo contrario, cualquier etapa, elemento, aspecto, característica de realización se puede usar en combinación con cualquier otra.

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 descripción de la invención.