

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la  
Propiedad Intelectual  
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional  
**WO 2013/001126 A1**

(43) Fecha de publicación internacional  
3 de enero de 2013 (03.01.2013)

WIPO | PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:  
*C12P 33/00* (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)  
*C07J 9/00* (2006.01) *A61K 31/575* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:  
PCT/ES2012/070473
- (22) Fecha de presentación internacional:  
27 de junio de 2012 (27.06.2012)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:  
P201131098 29 de junio de 2011 (29.06.2011) ES
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US):  
**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC)** [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **BARBA CEDILLO, Víctor** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **PRIETO ORZANCO, Alicia** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **MARTÍNEZ FERRER, Ángel T.** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES). **MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, María Jesús** [ES/ES]; Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu, 9, E-28040 Madrid (ES).
- (74) Mandatario: **UNGRIA LÓPEZ, Javier**; Avenida Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Publicada:**

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: ACYLATION METHOD FOR PRODUCING FOOD AND/OR PHARMACEUTICAL COMPOUNDS USING FUNGAL STEROL ESTERASES

(54) Título : PROCEDIMIENTO DE ACILACIÓN PARA LA OBTENCIÓN DE COMPUESTOS DE INTERÉS ALIMENTICIO Y/O FARMACÉUTICO UTILIZANDO ESTEROL ESTERASAS FÚNGICAS

(57) Abstract: The invention relates to a method for the acylation of free phytosterols or saturated derivatives thereof with an acylation agent selected from the group consisting of a free fatty acid and a fatty acid ester, catalysed by a sterol esterase enzyme, characterised in that said method comprises an acylation reaction in the presence of a sterol esterase produced by fungi of the genus *Ophiostoma*, preferably of the species *O. piceae*. The invention also relates to esters of phytosterols or of the saturated derivatives thereof produced by the above-mentioned method. The invention further relates to a product enriched by the esters of phytosterols or of the saturated derivatives of those of the invention, selected from a food, a food preparation, a dietary supplement and a medicament, and to the use of any of these products to reduce the cholesterol levels in blood plasma.

(57) Resumen: Procedimiento de acilación de fitosteroles libres o de derivados saturados de éstos con un agente de acilación seleccionado del grupo que consiste en ácido graso libre y éster de ácido graso, catalizado por una enzima esteroles esterasa, caracterizado porque dicho procedimiento comprende una reacción de acilación en presencia de una esteroles esterasa producida por hongos del género *Ophiostoma*, preferentemente de la especie *O. piceae*. Ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos obtenidos por el procedimiento descrito. Un producto enriquecido con los ésteres de fitosteroles o de los derivados saturados de éstos de la invención, elegido entre en un alimento, un preparado alimenticio, un suplemento dietético y un medicamento. Así como el uso de cualquiera de estos productos para reducir los niveles de colesterol en plasma sanguíneo.

WO 2013/001126 A1

**Procedimiento de acilación para la obtención de compuestos de interés alimenticio y/o farmacéutico utilizando esteroles esterasas fúngicas**

**SECTOR DE LA TÉCNICA**

La invención va dirigida principalmente al sector de la industria alimentaria, aunque  
5 también al sector de la industria nutracéutica, recientemente denominado “nutracéutica  
médica”. Utilizando la invención descrita es posible: i) sintetizar ésteres de esteroides  
vegetales (fitoesteroides) o de los derivados saturados de éstos (fitoestanoles) mediante  
reacciones de acilación de fitoesteroides o fitoestanoles respectivamente con ácidos grasos,  
tanto en forma de ácido libre como en forma de éster, ii) mejorar las propiedades de  
10 productos previamente existentes, es decir de los fitoesteroides o los fitoestanoles libres, al  
acilarlos para incorporarlos a alimentos, iii) contribuir a la prevención de la aterosclerosis  
gracias al papel regulador de la absorción del colesterol de los ésteres de fitoesteroides y los  
ésteres de fitoestanoles, y iv) introducir un proceso biotecnológico y más concretamente un  
biocatalizador (enzima) para la síntesis de estos compuestos.

**15 ESTADO DE LA TÉCNICA**

El ritmo de vida actual con tendencia al sedentarismo y el aumento en el consumo de  
grasas saturadas ha provocado que una gran parte de la población presente niveles de  
colesterol en suero elevados, facilitando el desarrollo de aterosclerosis, y aumentando, por  
ello, las probabilidades de sufrir isquemias. A esto hay que unirle aquellas personas que  
20 presentan deficiencias a nivel del metabolismo del colesterol y padecen hipercolesterolemia.  
Según la Fundación Española del Corazón, desde el 1 de enero hasta el 2 de marzo de 2011 se  
habrían producido en el mundo 2.839.348 muertes por fallo cardiovascular. Aunque no  
especifican cuántas habrían sido por accidentes cerebrovasculares o ataques agudos de  
miocardio es fácil suponer que, en un alto porcentaje de los casos, los fallecimientos habrían  
25 sido causados por niveles altos de colesterol. Es por todo esto que el exceso de colesterol se  
puede considerar como una auténtica pandemia que ya en el año 2.002 causó unas 4,4  
millones de muertes según la OMS.

Los esteroides vegetales o fitoesteroides, y por extensión sus derivados saturados,  
también llamados fitoestanoles, tienen una estructura química común a la del colesterol,  
30 derivando del núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno. Sin embargo, estudios realizados

en la última década han puesto de manifiesto su capacidad para disminuir los niveles de colesterol sérico de tipo LDL (lipoproteína de baja densidad) disminuyendo la probabilidad de desarrollar placas de ateroma. Aunque no se conoce en su totalidad su mecanismo de acción, algunos estudios ponen de manifiesto que podrían reducir la absorción de colesterol en el  
5 intestino, al desplazarlo de las micelas digestivas.

Por tanto, el consumo de fitoesteroles y fitoestanoles podría amortiguar y ayudar a prevenir los niveles altos de colesterol en la población pero al no ser sintetizados por el organismo, han de ser incorporados en la dieta, mediante la ingestión de frutas y vegetales o de productos enriquecidos en ellos (Chen *et al.* Cholesterol-lowering nutraceuticals and  
10 functional foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 8761-8773. 2008). De hecho, existen patentes como la US 7.147.859 B2 (Bruno and Falci, 2006) en la que se describen diferentes formulaciones con  $\beta$ -sitosterol, uno de los fitoesteroles más abundantes, entre sus componentes. Sin embargo, uno de los principales problemas para su incorporación en diferentes alimentos, principalmente derivados lácteos o de aceites vegetales, ha sido su alto  
15 punto de fusión y baja solubilidad. Una solución es esterificar los esteroides y estanoles libres con ácidos grasos de interés para aumentar su solubilidad (Thompson y Grundy. History and development of plant sterol and stanol esters for cholesterol-lowering purposes. *The American Journal of Cardiology* 96: 3-9. 2005; Villeneuve *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents. *Enzyme and Microbial Technology*  
20 37: 150-155. 2005). Ha sido demostrada mayor eficacia en reducir la absorción de colesterol a nivel intestinal con una dieta suplementada con fitoesteroides esterificados que con fitoesteroides libres (Weber *et al.* Cholesterol-lowering food additives: lipase-catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters. *Food Research International* 35: 177-181. 2002).

25 Uno de los primeros productos enriquecidos que comenzó a comercializarse en el año 1995 bajo la marca Benecol® es una margarina que incorpora un éster de estanol y cuyo lanzamiento al mercado fue consecuencia de la patente creada por la compañía finlandesa Raisio. Esta patente fue el punto de partida para el desarrollo de nuevos productos, así, en la patente US 6.087.353 (Stewart *et al.*, 2000) se describe la posibilidad de hidrogenar los  
30 ésteres de fitoesteroides con el fin de mejorar aún más su solubilidad y estabilidad para poder incorporarlos a diversos tipos de productos, tales como bebidas, alimentos, nutracéuticos, etc.

Cabe destacar que de los extensos estudios realizados para la evaluación de seguridad de esteroides y estanoles vegetales, con varios modelos animales e incluso celulares, a lo largo de los últimos años, ninguno ha revelado efecto adverso alguno para la salud. Por esta razón, se les considera como sustancia GRAS (*Generally Regarded As Safe*) tanto por los organismos regulatorios estadounidenses (FDA) como por los europeos (Thompson *et al.*, supra).

La reacción de síntesis de estos compuestos es el punto clave para su obtención pudiendo ser ésta química o enzimática. Sin embargo, el gran gasto de energía que suponen los procesos de síntesis química, que suelen desarrollarse a altas temperaturas, junto con la formación de productos aterogénicos y citotóxicos hace que se sigan buscando catalizadores alternativos y entre ellos los biocatalizadores enzimáticos pueden tener un importante papel (Villeneuve *et al.*, supra).

Las lipasas (EC 3.1.1.3), sobre todo aquéllas producidas por microorganismos, son sin duda las que se han empleado con mayor frecuencia con fines biotecnológicos en reacciones de síntesis.

Existen otras enzimas llamadas esterol esterases (EC 3.1.1.13) que también son capaces de mediar reacciones de síntesis en las condiciones adecuadas. Entre las esterol esterases más estudiadas se encuentra la de origen humano (Loomes y Senior. Bile salt activation of human cholesterol esterase does not require protein dimerisation. FEBS Letters 405: 369-372. 1997; Ikeda *et al.* Cholesterol esterase accelerates intestinal cholesterol absorption. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects 1571: 34-44. 2002; Brown *et al.* Plant sterol and stanol substrate specificity of pancreatic cholesterol esterase. The Journal of Nutritional Biochemistry 21: 736-740. 2010). No existen muchas esterol esterases microbianas descritas pero unas de las más conocidas son las isoformas LIP2 y LIP3 producidas por la levadura *Candida rugosa* (Benjamin y Pandey. *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. Yeast 14: 1069-1087. 1998; Tenkanen *et al.* Hydrolysis of steryl esters by a lipase (Lip 3) from *Candida rugosa*. Applied Microbiology and Biotechnology 60: 120-127. 2002; Domínguez de María *et al.* Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. Biotechnology Advances 24: 180-196. 2003; López *et al.* Reactivity of pure *Candida rugosa* lipase isoenzymes (Lip1, Lip2, and Lip3) in aqueous and organic media. Influence of the isoenzymatic profile on the lipase performance in organic

media. *Biotechnol Progress* 20: 65-73. 2004; Chang *et al.* Efficient production of active recombinant *Candida rugosa* LIP3 lipase in *Pichia pastoris* and biochemical characterization of purified enzyme. *J. Agric. Food Chem.* 54: 5831-5838. 2006; Ferrer *et al.* Recombinant *Candida rugosa* LIP2 expression in *Pichia pastoris* under the control of the AOX1 promoter. *Biochemical Engineering Journal* 46: 271-277. 2009; Yen *et al.* Site-specific saturation mutagenesis on residues 132 and 450 of *Candida rugosa* LIP2 enhances catalytic efficiency and alters substrate specificity in various chain lengths of triglycerides and esters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 10899-10905. 2010). De hecho, existen crudos enzimáticos comercializados por Sigma (lipasa tipo VII de *C. rugosa*) y Amano (Lipasa AY, Amano 30) con actividad LIP3 que se han empleado en varias ocasiones para la síntesis de diferentes compuestos (Bezbradica *et al.* The *Candida rugosa* lipase catalyzed synthesis of amyl isobutyrate in organic solvent and solvent-free system: a kinetic study. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 38: 11-16. 2006; Kim y Akoh. Modeling and optimization of lipase-catalyzed synthesis of phytosteryl esters of oleic acid by response surface methodology. *Food Chemistry* 102: 336-342. 2007). También se han empleado otros crudos enzimáticos del hongo *Aspergillus*, poco caracterizados, para la síntesis de ésteres de fitoesteres (Töke *et al.* Production and application of novel sterol esterases from *Aspergillus* strains by solid state fermentation. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 84: 907-915. 2007) aunque la productividad es escasa y se requieren largos tiempos de incubación. Además, se ha descrito una enzima del hongo *Trichoderma* sp. AS59 capaz de sintetizar ésteres de esteroides aunque poco se menciona sobre ello en el trabajo publicado (Maeda *et al.* Characterization of novel cholesterol esterase from *Trichoderma* sp AS59 with high ability to synthesize sterol esters. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 105: 341-349. 2008).

Dentro de las reacciones enzimáticas que se emplean para la síntesis de ésteres de esteroides vegetales éstas pueden transcurrir mediante:

i) Transesterificación tal y como se describe en la patente US 2004/0105931 A1 (Basheer and Plat, 2004), donde se emplean lipasas comerciales, en presencia de estabilizantes y/o inmovilizadas, y a altas temperaturas de reacción (60 °C). En este caso las reacciones transcurren *in situ* por lo que los alimentos enriquecidos en este tipo de compuestos estarían limitados a aquéllos que entre sus constituyentes contuvieran de forma natural triglicéridos como moléculas "donadoras" del grupo acilo; es decir, del ácido graso. En concreto, serían susceptibles de enriquecimiento derivados lácteos como la mantequilla, los yogures y los

quesos o aceites de diverso origen (oliva, girasol, colza, etc). Esto supone un problema en el caso de aquellas personas alérgicas a la leche y sus derivados o para vegetarianos estrictos (veganos) que no podrían beneficiarse de este tipo de productos.

ii) Por contraste, en otros trabajos y patentes se describe la obtención de estos compuestos mediante esterificación directa de fitoesteroles con ácidos grasos, en diferentes condiciones experimentales empleando como biocatalizador preparados enzimáticos comerciales de *C. rugosa*. Concretamente, en lo referente al empleo de esta enzima para la síntesis de esta clase de compuestos, las reacciones se desarrollan a temperaturas de entre 30 y 60 °C, con tiempos de reacción de entre 24 y 72 horas obteniendo rendimientos que oscilan entre el 40 y el 90%, aunque estos resultados dependen del donador de grupos acilo, del tipo de solvente empleado, y de la presencia o no de agua en el medio de reacción (Norinobu *et al.*, 2003; Vu *et al.* Lipase-catalyzed production of phytosteryl esters and their crystallization behavior in corn oil. Food Research International 37: 175-180. 2004; Villeneuve *et al.*, supra; Teixeira *et al.* Production of steryl esters from vegetable oil deodorizer distillates by enzymatic esterification. Industrial & Engineering Chemistry Research 50: 2865-2875. 2011).

Considerando los resultados expuestos en los trabajos y patentes mencionados, las principales características diferenciadoras de nuestra invención serían la capacidad de la esteroles de la enzima del hongo *Ophiostoma piceae*, tanto nativa como recombinante, de catalizar con alto rendimiento reacciones de acilación de fitoesteroles y de los derivados saturados de éstos con ácidos grasos libres o en forma de éster. Preferiblemente, nuestra invención permite obtener un rendimiento alrededor de 90% para reacciones de acilación directas con ácidos grasos, por ejemplo, ácido láurico en presencia de diferentes solventes orgánicos, en presencia y/o ausencia de agua, a una temperatura de entre 24 y 35 °C, preferiblemente a 28 °C, en tiempos cortos de reacción de 4-24 horas, y empleando cantidades del orden de miligramos de crudos liofilizados sin ningún tipo de proceso previo de estabilización y/o inmovilización en los que la enzima objeto de la invención es la única con actividad esteroles de la enzima, a diferencia de lo que ocurre en las preparaciones comerciales de *C. rugosa*, que contienen una mezcla de diferentes isoenzimas con diferentes especificidades (unas más de tipo esteroles de la enzima y otras más lipasas). Precisamente, debido a la dificultad existente para separar mediante técnicas cromatográficas estas isoenzimas de *C. rugosa*, sería aconsejable obtener las diferentes variantes recombinantes para su aplicación industrial. Sin embargo, a

diferencia de *O. piceae*, *C. rugosa* hace un uso no universal del código genético y esto dificulta la expresión de enzimas de esta levadura en sistemas de expresión heteróloga (Brocca *et al.* Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. Protein Sci. 7: 1415-1422. 1998).

## 5 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Un primer objeto de la presente invención es un procedimiento de acilación de fitoesteroles libres o de los derivados saturados de éstos, también llamados fitoestanoles, con un agente de acilación seleccionado del grupo que consiste en ácido graso libre y éster de ácido graso, catalizado por una enzima esteroles esterasa, caracterizado dicho procedimiento porque comprende una reacción de acilación en presencia de un biocatalizador. Preferentemente el biocatalizador es una esteroles esterasa producida por hongos del género *Ophiosotoma*.

En una realización preferente de la invención, la reacción de acilación comprendida en el procedimiento de la presente invención es una reacción directa de acilación donde el fitoesterol o fitoestanol reacciona con un agente de acilación que es un ácido graso libre en presencia de una esteroles esterasa producida por hongos del género *Ophiosotoma*.

En otra realización preferente de la invención, la reacción de acilación comprendida en el procedimiento de la presente invención es una reacción de transesterificación donde el fitoesterol o fitoestanol reacciona con un agente de acilación que es un éster de ácido graso (FAE en Inglés) seleccionado del grupo que consiste en éster metílico, éster etílico, éster n-propílico, éster isopropílico, éster butílico, así como ésteres de ácidos grasos con alcoholes más complejos como sorbitol, glicerol u otros alcoholes que puedan utilizarse en el sector alimentario, en presencia de una esteroles esterasa producida por hongos del género *Ophiosotoma*. Preferiblemente, el agente acilante puede ser un éster de ácido graso seleccionado del grupo que consiste en éster metílico y éster etílico.

En la presente invención, el término "enzima esteroles esterasa" se refiere a una secuencia aminoacídica de la enzima esteroles esterasa codificada por el gen esteroles esterasa. Dicha enzima es extracelular y puede ser nativa cuando se expresa en el organismo original (aunque al ser extracelular haya perdido el péptido señal y se hable de proteína madura) o

recombinante si la secuencia completa de la proteína o la secuencia de la proteína madura se expresa en otro organismo.

En una realización preferente de la invención, dicho gen esterol esterasa se puede  
5 obtener de hongos de la especie *O. piceae*.

En otra realización de la presente invención, dicho gen esterol esterasa se puede  
obtener a partir de un clon de una genoteca en la que el gen esterol esterasa se puede  
encontrar en un fago, cósmido, fásmido, o cromosoma artificial (BAC o YAC) empleado para  
10 generar dicha genoteca.

En otra realización de la presente invención, dicho gen esterol esterasa se puede  
obtener a partir de un vector génico en el que la secuencia del gen esterol esterasa hubiera  
sido previamente clonada y, asimismo, cualquier fragmento de DNA o cDNA (ya que el gen  
15 carece de intrones) procedente de un proceso de evolución dirigida y/o mutagénesis dirigida  
del gen esterol esterasa de *O. piceae* independientemente del hospedador empleado.

En una realización preferente de la presente invención, la enzima esterol esterasa se  
caracteriza por presentar alta identidad de secuencia (como mínimo 40-95%, ó 60-95%) con  
20 la secuencia del gen esterol esterasa de *O. piceae*. En una realización más particular de la  
invención, dicha homología es mayor en la zona de unión al sustrato de la enzima, como  
ocurre preferentemente en las enzimas de *Candida rugosa* LIP2 y LIP3.

En una realización preferente de la presente invención, la enzima esterol esterasa se  
25 obtiene de *Candida rugosa*, es decir las isoenzimas LIP2 y/o LIP 3. Las enzimas de *Candida*  
*rugosa* con actividad esterol esterasa se pueden obtener de preparados comerciales, como se  
ha mencionado anteriormente, comercializados por Sigma y Amano.

En la presente invención, el término “gen esterol esterasa” se refiere a una secuencia  
30 nucleotídica, DNA, que codifica para la enzima esterol esterasa de *O. piceae* e identificada por  
la SEQ ID No: 1

La forma nativa de la enzima esterol esterasa es la secuencia aminoacídica completa de la proteína codificada por el gen esterol esterasa de *O. piceae*, incluyendo el péptido señal (SEQ ID No: 2). La forma madura de la enzima esterol esterasa es la secuencia aminoacídica codificada por el gen esterol esterasa, sin incluir el péptido señal (SEQ ID No: 3), y se  
5 identifica con la SEQ ID No: 4. En adelante se hablará de enzima nativa como la forma madura, sin péptido señal, para diferenciarla de las formas recombinantes.

En una realización particular, la secuencia aminoacídica madura codificada por el gen esterol esterasa se expresa en la levadura *P. pastoris* empleando como péptido señal el pre-  
10 propéptido del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*. El proceso de clonación realizado en el vector de expresión pPIC9; así como, el procesamiento post-traducciona l de dicho péptido señal dan como resultado una proteína recombinante madura con un extremo N-terminal modificado respecto al de la proteína nativa madura, tal y como se comentará más adelante.

En una realización más particular de la presente invención, la enzima esterol esterasa  
15 recombinante presenta modificaciones en su secuencia aminoacídica como consecuencia de i) su expresión heteróloga en organismos usados habitualmente para la producción industrial de enzimas, como un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *P. pastoris*, *Hansenula polymorpha*, *Yarrowia lipolytica*, *Aspergillus*  
20 *nidulans*, *Aspergillus niger* y *Trichoderma reesei* y/o ii) de un proceso de mutagénesis dirigida y diseño racional, o evolución dirigida del gen esterol esterasa, en ambos casos seguido de su expresión en los hospedadores adecuados como *E. coli*, *S. cerevisiae* o *P. pastoris*.

En la presente invención las expresiones “expresión heteróloga” y “gen heterólogo”  
25 se refieren a la introducción de un gen extraño (heterólogo) en un organismo con el fin de modificar su material genético y los productos de expresión. En la presente invención se protege un método para la expresión heteróloga del gen esterol esterasa. Dicho método incluye i) la amplificación por PCR de la secuencia que codifica la enzima esterol esterasa, ii) la introducción del gen esterol esterasa en un vector de clonación y/o de expresión; y iii) su  
30 expresión heteróloga en cualquiera de los organismos usados para la producción industrial de enzimas citados anteriormente.

En una realización particular de la presente invención, dicho organismo es una levadura metilotrófica, preferentemente *P. pastoris*. En una realización aún más particular de la presente invención, la forma recombinante de la enzima esterol esterasa obtenida mediante la expresión heteróloga del gen esterol esterasa, preferentemente de *O. piceae*,  
5 presenta como modificación entre 6-8 aminoácidos nuevos en el extremo N-terminal, añadidos sobre la secuencia aminoacídica de la proteína nativa madura, debido a i) el proceso de clonación en el plásmido integrativo (pPIC9) utilizado para transformar *P. pastoris* que añade 4 aminoácidos (YVEF) al extremo de la proteína que forman parte de la secuencia del sitio de clonaje múltiple del plásmido, concretamente las dianas de restricción *Sna*BI  
10 (TACGTA) y *Eco*RI (GAATTC), ésta última empleada para la clonación en dicho plásmido del extremo 5' del gen. La enzima *Not*I (GCGGCCGC) fue la empleada para la clonación por el extremo 3', y ii) el mal procesamiento post-traducciona l de la proteína recombinante para eliminar el péptido señal (pre-propéptido del factor  $\alpha$  de *Saccharomyces cerevisiae*), que es responsable de la incorporación a la secuencia de dos o cuatro aminoácidos de más (EA o  
15 EAEA). Por tanto, se pueden tener dos formas de proteína recombinante, una con 6 y otra con 8 aminoácidos de más, identificadas con las SEQ ID No: 5 y SEQ ID No: 6, respectivamente.

En otras realizaciones particulares de la presente invención las dianas de restricción  
20 podrían ser cualquiera de las que formen parte del sitio de clonaje múltiple del vector que se emplee, y esto dependerá a su vez del organismo productor. En cualquier caso, las dianas escogidas no formarán parte de la secuencia del gen de la esterol esterasa y se procurará que las modificaciones surgidas en el extremo N-terminal de la proteína, como consecuencia del proceso de clonación, sean las mínimas posibles, suponiendo siempre un correcto  
25 procesamiento del péptido señal que se emplee.

En la presente invención, el término "cebador" o primer se refiere a secuencias nucleotídicas cortas que pueden comprender: i) la secuencia del péptido señal de la esterol esterasa madura de *O. piceae* o la secuencia N-terminal de la proteína madura identificada  
30 con SEQ ID No: 7 y ii) las basadas en el extremo 3' del gen de la enzima nativa identificada con SEQ ID No: 8; así como iii) aquéllos derivados de éstos si se emplean como molde DNAs modificados resultantes de obtener variantes de la proteína tras un proceso de evolución dirigida y/o mutagénesis dirigida. También se refiere a cualquier tipo de cebadores que

incluyan las características anteriores junto con cualquier otra modificación introducida en la secuencia de la proteína, como colas de histidina N o C terminales, etc.

5 En la presente invención se entiende por “vector de clonación” aquellas moléculas de DNA originadas en un virus, bacterias, o en las células de un organismo superior en el que se puede integrar otro fragmento de DNA, sin que pierda la capacidad de autorreplicación. Los «vectores» introducen DNA extraño en una célula huésped, donde puede reproducirse en grandes cantidades. Ejemplos: plásmidos, cósmidos y los cromosomas artificiales de levadura.

10 En la presente invención se entiende por “vector de expresión” aquellos plásmidos pequeños que contienen un sitio de clonaje múltiple flanqueado por una o dos secuencias promotoras. Estos promotores se requieren para expresar los fragmentos de DNA insertados en el lugar de clonaje múltiple.

15 Preferentemente, el procedimiento de acilación de fitoesteroles libres o de los derivados saturados de éstos de la presente invención puede ser catalizado por la citada enzima esteroles esterasa en su forma nativa codificada por el gen esteroles esterasa de un hongo del género *Ophiostoma*, más preferentemente de la especie *O. piceae*.

20 De acuerdo con otro modo de realización preferente, el procedimiento de acilación de fitoesteroles libres o de los derivados saturados de éstos de la presente invención puede ser catalizado por una enzima recombinante producida in situ por un hongo del género *Ophiostoma*, más preferentemente de la especie *O. piceae*.

25 De forma aún más preferente, la enzima recombinante utilizada en el procedimiento de la presente invención puede expresarse en *P. pastoris*, más preferentemente la enzima recombinante tiene un extremo N-terminal modificado cuyas secuencias son SEQ ID No: 5 y SEQ ID No: 6.

30 La actividad de las enzimas utilizadas en el procedimiento de la presente invención se comparan con la enzima de *Candida rugosa* comercializada por Sigma (lipasa tipo VII).

Es importante resaltar que algunas enzimas de tipo lipasa, aunque pueden realizar reacciones directas de esterificación, realizan la síntesis de ésteres de fitoesteroles preferiblemente mediante reacciones de transesterificación de los sustratos debido a que muchas de ellas presentan impedimentos estéricos que dificultan el desarrollo de reacciones

5 de esterificación directa (Kirk y Christensen. Lipases from *Candida antarctica*: unique biocatalysts from a unique origin. Organic Process Research & Development 6: 446-451. 2002). Esto se puede comprobar en la patente US 2004/0105931 A1 (Basheer and Plat, 2004), citada anteriormente en la que se estudian diferentes lipasas comercializadas procedentes de diferentes orígenes (bacteriano, fúngico e incluso vegetal). No obstante, a diferencia de lo

10 expuesto en esta y otras patentes, la enzima de *O. piceae* (nativa o recombinante) presenta la ventaja de que puede ser utilizada partiendo de crudos liofilizados, sin ningún tipo de proceso previo de estabilización con aditivos y/o proceso de inmovilización, ya que es muy estable y funcional en un rango de temperatura muy amplio, preferiblemente entre 4-35 °C durante al menos 24 h, y en diferentes solventes orgánicos. Además, la enzima de *O. piceae*, ya sea

15 nativa o recombinante, sí puede catalizar reacciones de acilación directa entre fitoesteroles y/o sus derivados saturados, y un ácido graso libre. Esto lo hace, al igual que se ha descrito con la enzima comercial de *C. rugosa* (Norinobu *et al.*, 2003; Vu *et al.*, supra; Villeneuve *et al.*, supra; Teixeira *et al.*, supra), mediante esterificación directa del alcohol, entendiendo por alcohol cualquier esteroles y/o estanol presente en la mezcla de fitoesteroles y/o fitoestanoles.

20 Cabe destacar que los rendimientos obtenidos con preparados enzimáticos de *C. rugosa* en la producción de estos compuestos mediante reacciones de acilación directa son más altos que en reacciones de transesterificación (Villeneuve *et al.*, supra).

En los ejemplos de la presente solicitud de patente se incluyen reacciones de

25 esterificación directa que se han realizado tanto con la esteroles esterasa de *O. piceae*, nativa o recombinante, como con la enzima comercializada de *C. rugosa* que contiene actividad esteroles esterasa (tiene LIP3). Los resultados obtenidos indican que a pesar de que el porcentaje de esterificación conseguido con las enzimas de *O. piceae* y *C. rugosa* es semejante, en el caso de los fitoesteroles, se requieren dosis menores de enzima y tiempos

30 de reacción más cortos con la enzima de *O. piceae*. Estas reacciones de esterificación directa probablemente podrían también tener lugar utilizando otras esteroles esterasas microbianas que presenten alta identidad de secuencia, preferiblemente 40-60%, con la de *O. piceae*, particularmente en la zona de unión a sustrato, entre las que se encuentran la LIP2 y la LIP3

de *C. rugosa*. En la tabla 1 se compara los niveles de síntesis alcanzados por diversas enzimas en reacciones de esterificación directa en condiciones similares y las enzimas objeto de la presente invención, así como con el preparado comercial de *C. rugosa* empleado en idénticas condiciones que las de *O. piceae*.

5

**Tabla 1. Porcentajes de acilación de esteroides con ácidos grasos alcanzados por diversas enzimas en condiciones similares.**

Enzima	Crudo	Crudo estabilizado <sup>1</sup>	Crudo inmovilizado <sup>1</sup>	Crudo inmovilizado-estabilizado <sup>1</sup>	Referencia
Lipasa de <i>Candida antarctica</i> <sup>a</sup>	12	67	14	24	
Lipasa de <i>Candida cylindracea</i> ( <i>C. rugosa</i> ) <sup>a</sup>	2	0	11	48	Patente US
Lipasa de <i>Chromobacterium viscosum</i> <sup>a</sup>	1	63	11	67	2004/01059
Lipoproteína B de <i>Pseudomonas</i> sp. <sup>a</sup>	23	71	26	77	31 A1
Novozym 868 <sup>a</sup>	7	32	-	-	
Lipasa tipo VII de <i>C. rugosa</i> <sup>b</sup>	33	-	-	-	
Esterol esterasa nativa de <i>O. piceae</i> <sup>b</sup>	58	-	-	-	Patente
Esterol esterasa recombinante de <i>O. piceae</i> <sup>b</sup>	39	-	-	-	propuesta

<sup>a</sup>% de acilación expresado como el porcentaje (w/w) de conversión de colesterol a su éster de ácido graso en reacciones con n-hexano empleando una relación molar 1:1,4 colesterol:ácido esteárico y desarrolladas a 40°C, 16h.

<sup>b</sup>% de acilación expresado como el porcentaje (mM) de conversión de fitoesteroides a su forma esterificada en reacciones con isooctano empleando una relación molar 1:1 fitoesteroides:ácido láurico y desarrolladas a 28°C, 15h.

<sup>1</sup> Las enzimas estabilizadas fueron preparadas añadiendo a los crudos enzimáticos sorbitan mono-estearato u otros ésteres de azúcares, según la patente WO99/15689. Las enzimas inmovilizadas, estabilizadas o no, se prepararon con arreglo a la misma patente.

10

15

Los porcentajes de acilación alcanzados con las esteroides esterasas nativa y/o recombinante de *O. piceae* en tiempos razonables de reacción superan los citados en otras patentes e incluso superan o igualan los obtenidos en las mismas condiciones con una enzima comercial, entendiéndose preparado enzimático de *C. rugosa* (tabla 1).

20

Tal y como se describe en la solicitud de patente PCT/CA95/00555 y que recoge la patente US 6.087.353 (Stewart *et al.*, 2000), los fitoesteroides o los derivados saturados de éstos, también llamado fitoesteroides, utilizados en el procedimiento de la presente invención

pueden obtenerse prácticamente de cualquier fuente vegetal, por ejemplo, soja, maíz, girasol, colza, legumbres, frutos secos, frutas y verduras; así como de residuos agrícolas. Con respecto a esto último, y teniendo en cuenta el concepto industrial de biorrefinería, se podrían emplear los materiales lignocelulósicos que actualmente se contemplan para la producción de etanol de segunda generación, como, por ejemplo, paja de cereales, residuos de poda, etc., así como los residuos generados tras la producción del bioetanol y la fabricación de cerveza, que contendrían este tipo de compuestos en la fracción liposoluble. Incluso, se podrían emplear aguas de proceso de la industria papelera pues estos compuestos también se encuentran en los extraíbles de madera de frondosas como el eucalipto (Gutiérrez *et al.* The biotechnological control of pitch in paper pulp manufacturing. Trends Biotechnol 19: 340-348. 2001). Preferentemente, en el procedimiento de la invención, los fitoesteroles utilizados como producto de partida proceden de la soja.

Adicionalmente, los fitoesteroles utilizados en el procedimiento de la presente invención pueden ser cualquier fitoesterol o derivado de fitoesterol conocido, así como sus mezclas. Preferentemente, el procedimiento de la presente invención comprende la acilación de fitoesteroles seleccionados del grupo que consiste en  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, brasicasterol y cualquier derivado o mezcla de éstos. De forma más preferente, los fitoesteroles utilizados en el procedimiento de la presente invención son una mezcla que comprende, respecto al peso total de la mezcla, 55% de  $\beta$ -sitosterol, 10% de estigmasterol, 29% de campesterol y 6% de brasicasterol.

También es una realización preferente de la presente invención que los fitoesteroles utilizados como producto de partida comprendan, respecto al total del peso de la mezcla, un 70% por peso de  $\beta$ -sitosterol, al menos un 10% por peso de campesterol y al menos un 10% por peso de estigmasterol, ya que esta composición ha resultado ser altamente efectiva disminuyendo los niveles de colesterol plasmático debido a algún tipo de efecto sinérgico entre los distintos fitoesteroles presentes tal y como se describe en la solicitud de patente PCT/CA95/00555 y que se recoge en la patente US 6.087.353 (Stewart *et al.*, 2000).

Preferentemente, el procedimiento de la presente invención comprende la acilación de fitoesteranos seleccionados del grupo que consiste en sitoestanol, campestanol, brasicastanol y cualquier derivado o mezcla de estos. De forma más preferente, el fitoestanol

empleado comprende un mínimo de 95 % de sitoestanol, compuesto también conocido como estigmastanol, y es un producto disponible comercialmente.

En cualquiera de los casos, el procedimiento de la presente invención permite realizar  
5 la síntesis de ésteres de ácidos grasos de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos, donde el agente de acilación se selecciona del grupo que consiste en ácido graso libre y éster de ácido graso, y puede ser saturado, monoinsaturado o poliinsaturado, de longitud de cadena variable, preferentemente la cadena de ácido graso comprende entre 6 y 18 átomos de carbono. Más concretamente el agente de acilación es un ácido saturado de longitud de  
10 cadena media (MCFA), tal como caproico (C6), caprílico (C8), cáprico (C10) y láurico (C12), siendo especialmente preferentemente que el ácido graso libre utilizado en el procedimiento descrito en la presente solicitud de patente sea ácido dodecanoico (ácido láurico).

El ácido láurico es un ácido graso de cadena media que se encuentra de forma natural  
15 en aceites tropicales como el aceite de coco y el aceite de semillas de palma, así como en la leche de vaca y cabra. Es perfectamente metabolizable por el organismo y su consumo en cantidades adecuadas no representa riesgo de toxicidad según estudios realizados en ratas (Fitzhugh *et al.* Oral toxicities of lauric acid and certain lauric acid derivatives. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2: 59-67. 1960). Considerando la relación colesterol total/colesterol  
20 HDL como marcador del riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular, parece ser que, a diferencia de otros ácidos grasos estudiados, el ácido láurico disminuiría más tal relación como consecuencia del aumento del colesterol de tipo HDL o "colesterol bueno" (Mensink *et al.* Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials.  
25 *The American Journal of Clinical Nutrition* 77: 1146-1155. 2003). Además, estudios realizados, tanto con la forma libre como esterificada (concretamente monolaurina), demuestran su actividad antimicrobiana cuando es añadido a la leche humana o a formulaciones infantiles a concentraciones de entre 5 y 45 mM según se añada, libre o esterificado,, y según el patógeno (Isaacs *et al.* Antimicrobial activity of lipids added to human milk, infant formula,  
30 and bovine milk. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 6: 362-366. 1995). Incluso existen formulaciones comerciales de monolaurina (Lauricidin®) en las que se explota este potencial antimicrobiano, además de su uso como biocida en "films" preparados para el empaquetado de alimentos (Hoffman *et al.* Antimicrobial effects of corn zein films impregnated with nisin,

lauric acid, and EDTA. Journal of Food Protection 64: 885-889. 2001; Dawson *et al.* Effect of lauric acid and nisin-impregnated soy-based films on the growth of *Listeria monocytogenes* on Turkey Bologna. Poultry Sci 81: 721-726. 2002). A todas estas propiedades se suma su efecto antioxidante y la ventaja adicional de su bajo coste y larga vida media que facilita su empleo a nivel industrial.

Por otro lado, en otra realización especialmente preferente de la invención el agente de acilación puede ser un ácido graso libre monoinsaturado C18 o uno de sus ésteres, que se puede seleccionar del grupo que consiste en ácido oleico y oleato de metilo. Cabe destacar que los ésteres de ácido oleico obtenidos por el procedimiento de acilación de la presente invención generalmente serán más solubles que los de ácido láurico lo que facilitaría su incorporación en alimentos y por tanto su biodisponibilidad. Esto favorecería un mayor efecto en cuanto a la reducción de la absorción de colesterol a nivel intestinal. Además, al ser el ácido oleico un ácido graso insaturado de la serie omega-9 ( $\omega$ -9) ejerce una acción mucho más beneficiosa sobre el sistema cardiovascular que el ácido láurico.

En el procedimiento de acilación de fitoesteroles libres o de los derivados saturados de éstos, también llamados fitoestanoles, con un agente de acilación que comprende una reacción de acilación en presencia de una esterasa producida por hongos del género *Ophiostoma*, en particular por la especie *O. piceae* nativa o recombinante, tal como se describe en la presente solicitud de patente, la proporción molar de fitoesterol:agente de acilación o fitoestanol:agente de acilación puede comprender, preferentemente, valores entre 1:1 y 1:6. En una realización aún más preferente, este agente de acilación es un ácido graso libre y el procedimiento de la invención comprende una reacción de acilación directa.

De acuerdo con otro modo de realización preferente de la presente invención, la enzima esterasa producida por hongos del género *Ophiostoma*, preferentemente de la especie *O. piceae*, más preferentemente una de sus variantes natural o recombinante, puede utilizarse en el procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos descrito en la presente solicitud de patente en forma de crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo.

De acuerdo con otro modo de realización preferente de la presente invención, la enzima esterol esterasa producida por hongos del género *Ophiostoma*, preferentemente de la especie *O. piceae*, más preferentemente una de sus variantes nativa o recombinante, puede utilizarse en el procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos descrito en la presente solicitud de patente después de haber sido purificada mediante un método cromatográfico, preferentemente por cromatografía de interacción hidrofóbica, concretamente *Hi-Trap Octyl FF (GE Healthcare)*.

Preferentemente, la enzima esterol esterasa utilizada en el procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos de la presente invención, utilizada tanto como crudo enzimático como purificada, se puede utilizar en una dosis que comprende entre 1,5 y 12 U/mL de reacción, más preferentemente entre 3 y 6 U/mL.

El procedimiento de acilación descrito en la presente solicitud de patente proporciona el empleo de biocatalizadores, esterol esterasas, como crudos liofilizados sin ningún tipo de proceso previo de estabilización y/o inmovilización perfectamente funcionales y estables, y en los que la enzima de interés es mayoritaria y única en su actividad a diferencia de lo que ocurre con la preparación comercial. El empleo de dosis "altas" de biocatalizador se corresponde con miligramos de crudo liofilizado y es suficiente para la obtención de altos porcentajes de acilación, preferiblemente 90% cuando el procedimiento comprende una reacción de acilación directa utilizando un ácido graso libre.

De acuerdo con otro modo de realización preferente, el procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos con un agente de acilación, preferiblemente un ácido graso libre, catalizado por una enzima esterol esterasa producida por hongos del género *Ophiostoma*, preferentemente de la especie *O. piceae* nativa o recombinante, tal como se describe en la presente solicitud de patente, puede transcurrir en un sistema monofásico orgánico o bifásico que comprende una mezcla de solvente orgánico y agua. Preferentemente, cuando el sistema es bifásico comprende un 10% de agua.

De acuerdo con una realización aún más preferente, el solvente orgánico comprendido en dicho sistema monofásico o bifásico, en particular con un 10% de agua, se puede seleccionar del grupo que consiste en isooctano, n-hexano y tolueno.

El empleo de isooctano o n-hexano resulta óptimo desde el punto de vista catalítico y ambiental comparado con el uso de tolueno. Además, el uso de sistemas bifásicos, en presencia de agua, resulta en altos porcentajes de acilación con isooctano y n-hexano, y son  
5 preferibles a los monofásicos en lo que se refiere a perspectivas de futuro. Además, este tipo de sistemas resultan atractivos desde un punto de vista industrial pues hacen que los procesos de separación y recuperación sean mucho más eficientes y demanden menos energía.

10 De acuerdo con otra realización preferente de la presente invención, el procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos con un agente de acilación, preferiblemente un ácido graso libre, catalizado por una enzima esteroles  
15 tener lugar entre 24 y 35 °C, más preferentemente entre 27 y 29 °C, siendo especialmente preferente que la reacción de acilación tenga lugar a 28 °C.

Así, el procedimiento de la presente invención proporciona un procedimiento de acilación enzimática que se desarrolla a bajas temperaturas, preferentemente a 28 °C, con el  
20 consiguiente ahorro de energía. Por otro lado, el procedimiento de la presente invención permite la obtención de altos porcentajes de acilación en tiempos cortos de reacción, preferentemente entre 4-24 horas, con 4 horas los rendimientos obtenidos están ya en torno al 50% dependiendo de la enzima y el solvente empleado.

25 De acuerdo con otra realización preferente de la presente invención, el procedimiento de acilación de fitoesteroles libres con un agente de acilación catalizado por una enzima esteroles  
30 puede comprender:

- a) los fitoesteroles vegetales utilizados se seleccionan del grupo que consiste en  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, brasicasterol y cualquier derivado o mezcla de estos;
- b) el agente de acilación se selecciona del grupo que consiste en ácido graso libre y éster de ácido graso, es saturado o insaturado, y de longitud de cadena de entre 6 y 18 átomos de carbono, siendo preferentemente ácido graso libre;
- 5 c) la esteroles esterasa empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
- d) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico o bifásico que comprende una mezcla de solvente orgánico y agua; y
- 10 e) la reacción de acilación transcurre entre 24 y 35 °C.

De acuerdo con otra realización preferente, el procedimiento de acilación de fitoesteroles libres con un agente de acilación catalizado por una enzima esteroles esterasa que comprende una reacción de acilación en presencia de una esteroles esterasa producida por hongos del género *Ophiostoma*, y en particular por la especie *O. piceae* nativa o recombinante, tal como se describe en la presente solicitud de patente puede comprender:

15

- a) los fitoesteroles empleados son una mezcla que comprende 55% de  $\beta$ -sitosterol, 10% de estigmasterol, 29% de campesterol, y 6% de brasicasterol, expresado en peso respecto al total de la mezcla;
- 20 b) el agente de acilación es ácido láurico;
- c) la proporción de fitoesterol:ácido láurico comprende valores entre 1:1 y 1:6;
- d) la esteroles esterasa empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
- 25 e) se utiliza una dosis de enzima que comprende entre 1,5 y 12 U/mL de reacción;
- f) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico, con iso-octano, n-hexano o tolueno como solventes, o bifásico que comprende una mezcla de cualquiera de estos solventes orgánicos con un 10% de agua; y
- g) la reacción de acilación transcurre a 28 °C.

30

De acuerdo con otra realización preferente, el procedimiento de acilación de fitoesteranos de la presente invención puede comprender:

- a) los fitoestanoles vegetales utilizados se seleccionan del grupo que consiste en sitoestanol, campestanol, brasicastanol y cualquier derivado o mezcla de estos;
- b) el agente de acilación se selecciona del grupo que consiste en ácido graso libre y éster de ácido graso, es saturado o insaturado, y de longitud de cadena de entre 6 y 18 átomos de carbono, siendo preferentemente ácido graso libre;
- 5 c) la esteroles esterasa empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
- d) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico o bifásico que comprende una mezcla de solvente orgánico y agua; y
- 10 e) la reacción de acilación transcurre entre 24 y 35 °C,

Preferentemente, el procedimiento de acilación de fitoestanoles de la presente invención puede comprender:

- a) el fitoestanol empleado comprende un mínimo de 95% de sitoestanol;
- 15 b) el agente de acilación se selecciona del grupo que consiste en ácido láurico, ácido oleico y oleato de metilo;
- c) la proporción de fitoestanol:agente de acilación comprende valores entre 1:1 y 1:6;
- d) la esteroles esterasa empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
- 20 e) se utiliza una dosis de enzima que comprende entre 1,5 y 12 U/mL de reacción;
- f) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico, con isooctano, n-hexano o tolueno como solventes, o bifásico que comprende una mezcla de cualquiera de estos solventes orgánicos con un 10% de agua; y
- g) la reacción de acilación transcurre a 28 °C.

25

De acuerdo con otro modo de realización preferente de la presente invención, en el procedimiento de la invención los sustratos se encuentran en proporciones molares fitoesteroles:agente de acilación o fitoestanoles: agente de acilación, comprendidas entre 1:1 y 1:6, siendo preferente que el agente de acilación sea un ácido graso libre; y las esteroles esterasas se aplican a la reacción de síntesis una vez disueltos éstos en el medio orgánico de elección. Para esto, según el solvente, se calienta previamente los medios de reacción en agua a 100 °C durante 5-10 minutos, preferiblemente 10 minutos. Una vez a temperatura ambiente, se añadirá, en el caso de los sistemas bifásicos, agua en un porcentaje preferente

30

del 10% respecto del volumen de solvente orgánico y finalmente se añadirán las enzimas. Las reacciones se desarrollarán preferentemente entre 24-35 °C, más preferentemente a una temperatura de 28 °C, con agitación magnética a 1.200 rpm, para eliminar barreras de transferencia de masa para los sustratos (Klibanov. Improving enzymes by using them in  
5 organic solvents. Nature 409: 241-246. 2001), por un tiempo preferente entre 4-96 horas, más preferentemente entre 4 y 24 horas. La concentración de las esterol esterases utilizadas preferentemente estará comprendida entre 1,5-12 U/mL de volumen total de reacción, más preferentemente entre 3-6 U/mL de volumen total de reacción consiguiéndose un porcentaje de síntesis alrededor del 90% en el mejor de los casos. Una vez obtenidos los productos de  
10 interés el biocatalizador podrá ser separado de la mezcla de reacción, por ejemplo mediante procesos de centrifugación, para su reutilización.

De acuerdo con un modo de realización preferente de la presente invención, el procedimiento de acilación de fitoesteroles libres o de los derivados saturados de éstos con  
15 un agente de acilación, preferiblemente un ácido graso libre, catalizado por una enzima esterol esterasa producida por hongos del género *Ophiostoma*, y en particular por la especie *O. piceae*, nativa o recombinante, tal como se describe en la presente solicitud de patente puede comprender una etapa adicional de aislamiento en forma de polvo sólido del éster de fitoesterol o de los derivados saturados de éstos.

20

Preferentemente, el procedimiento de acilación de fitoesteroles de la presente invención puede comprender:

- a) los fitoesteroles vegetales utilizados se eligen entre el grupo que consiste en  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, brasicasterol y cualquier derivado o mezcla de estos;
- 25 b) el agente de acilación se selecciona del grupo que consiste en ácido graso libre y éster de ácido graso, es saturado o insaturado, y de longitud de cadena de entre 6 y 18 átomos de carbono, siendo preferentemente ácido graso libre;
- c) la esterol esterasa empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
- 30 d) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico o bifásico que comprende una mezcla de solvente orgánico y agua;
- e) la reacción de acilación transcurre entre 24 y 35 °C; y
- f) aislamiento en forma de polvo sólido del éster de fitoesterol.

De acuerdo con otro modo de realización preferente, el procedimiento de acilación de fitoesteroles de la presente invención puede comprender:

- a) los fitoesteroles empleados son una mezcla que comprende 55% de  $\beta$ -sitosterol, 10% de estigmasterol, 29% de campesterol, y 6% de brasicasterol, expresado en peso respecto al total de la mezcla;
- b) el agente de acilación es ácido láurico;
- c) la proporción de fitoesterol:ácido láurico comprende valores entre 1:1 y 1:6;
- d) la esteroles esterasa empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
- e) se utiliza una dosis de enzima que comprende entre 1,5 y 12 U/mL de reacción;
- f) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico, con isooctano, n-hexano o tolueno como solventes, o bifásico que comprende una mezcla de cualquiera de estos solventes orgánicos con un 10% de agua;
- g) la reacción de acilación transcurre a 28 °C; y
- h) aislamiento en forma de polvo sólido del éster de fitoesterol.

En otra realización preferente, el procedimiento de acilación de fitoestanoles de la presente invención puede comprender:

- a) los fitostanoles vegetales utilizados se seleccionan del grupo que consiste en sitoestanol, campestanol, brasicastanol y cualquier derivado o mezcla de estos;
- b) el agente de acilación se selecciona del grupo que consiste en ácido graso libre y éster de ácido graso, es saturado o insaturado, y la longitud de cadena de entre 6 y 18 átomos de carbono, siendo preferentemente ácido graso libre;
- c) la esteroles esterasa empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
- d) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico o bifásico que comprende una mezcla de solvente orgánico y agua;
- e) la reacción de acilación transcurre entre 24 y 35 °C, y
- f) aislamiento en forma de polvo sólido del éster de fitoestanol.

De acuerdo con otro modo de realización preferente, el procedimiento de acilación de fitoestanoles de la presente invención puede comprender:

- a) el fitoestanol empleado comprende un mínimo de 95% de sitoestanol;
- b) el agente de acilación se selecciona del grupo que consiste en ácido láurico, ácido oleico y oleato de metilo,
- c) la proporción de fitoestanol:agente de acilación comprende valores entre 1:1 y 1:6;
- 5 d) la esterase empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
- e) se utiliza una dosis de enzima que comprende entre 1,5 y 12 U/mL de reacción;
- f) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico, con isooctano, n-hexano o tolueno como solventes, o bifásico que comprende una mezcla de cualquiera de estos
- 10 solventes orgánicos con un 10% de agua;
- g) la reacción de acilación transcurre a 28 °C, y
- h) aislamiento en forma de polvo sólido del éster de fitoestanol.

Los ésteres sintetizados de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos, también llamados ésteres de fitoestanoles, pueden separarse del exceso de ácido graso utilizado diferentes procedimientos, como por ejemplo: i) mediante destilación molecular (Hirota *et al.* Purification of steryl esters from soybean oil deodorizer distillate. Journal of the American Oil Chemists' Society 80: 341-346. 2003) y ii) mediante desacidificación facilitando la formación de sales del ácido graso (Weber *et al.* Fatty acid steryl, stanyl, and steroid esters by esterification and transesterification in vacuo using *Candida rugosa* lipase as catalyst. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49: 67-71. 2001). Incluso sin eliminar el exceso de ácidos grasos en la reacción, el solvente podría eliminarse evaporando en rotavapor o utilizando un liofilizador. En cualquiera de los casos, el procedimiento de la presente invención preferentemente comprende una etapa adicional de obtención de un producto en

15 forma de polvo sólido con características organolépticas apropiadas para su incorporación directa en alimentos, bebidas, fármacos y nutracéuticos, de modo que la cantidad de solvente residual o impurezas orgánicas volátiles se encuentren dentro los límites aceptables propuestos por la guía GPC (Guía de la Buena Práctica Clínica) del Comité Internacional de Armonización (ICH) o de farmacopeas (Grodowska y Parczewski. Organic solvents in the pharmaceutical industry. Acta Poloniae pharmaceutica-drug Research 67: 3-12. 2010). Hay

20 que considerar que hasta un 50% del gasto energético necesario para un proceso químico proviene de la purificación de los productos y del reciclado de los solventes empleados (Clark

30

y Tavener. Alternative solvents: shades of green. Organic Process Research & Development 11: 149-155. 2007).

Adicionalmente, la presente invención también tiene por objeto los ésteres de fitoesteroles o ésteres de fitoestanoles obtenidos por el procedimiento de acilación definido en la presente solicitud de patente.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la presente invención también se refiere a productos enriquecidos con ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos obtenidos por el procedimiento de acilación definido en la presente solicitud de patente. Preferentemente estos productos se pueden seleccionar del grupo que consiste en un alimento, un preparado alimenticio, un suplemento dietético y un medicamento.

De forma más preferente, cuando el producto enriquecido es un producto alimenticio, éste puede ser: i) un alimento perteneciente al grupo de los derivados lácteos, ii) un alimento o producto que no pertenece al grupo de los derivados lácteos, siendo apto para alérgicos a la leche como por ejemplo un producto derivado de la soja. En este sentido destacar que se ha demostrado que la administración de ésteres de esteroleos junto con proteína de soja ayuda a disminuir más los niveles de colesterol (Lin *et al.* Soy protein enhances the cholesterol-lowering effect of plant sterol esters in cholesterol-fed hamsters. The Journal of Nutrition 134: 143-148. 2004), o iii) un producto que proviene de cereales o mezclas de cereales como masas y masas de repostería o pastas .

De forma más preferente, cuando el producto enriquecido es un suplemento dietético, por ejemplo suplemento alimenticio o vitamínico, o un medicamento, esté es una forma sólida apta para administración oral, como por ejemplo, comprimido, cápsula, grajea, gránulo, etc.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la presente invención también se refiere al uso de los ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos obtenidos por el procedimiento de acilación definido en la presente solicitud de patente; y de los productos enriquecidos con ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos objeto de la presente invención para la obtención de productos de interés alimenticio y/o farmacéutico.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la presente invención también se refiere a los ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos obtenidos por el procedimiento de acilación definido en la presente solicitud de patente; y a los productos enriquecidos con  
5 ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos objeto de la presente invención para su uso en medicina, preferentemente para reducir los niveles de colesterol en plasma sanguíneo.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la presente invención también se refiere a un  
10 método para reducir los niveles de colesterol en plasma sanguíneo que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de los ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos obtenidos por el procedimiento de acilación definido en la presente solicitud de patente; o administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un producto enriquecido con ésteres de fitoesteroles o con los derivados saturados de éstos  
15 objeto de la presente invención.

De acuerdo con un modo de realización preferente, el procedimiento de acilación de fitoesteroles libres o de los derivados saturados de éstos con ácidos grasos catalizado por una enzima esterol esterasa producida por hongos del género *Ophiostoma* tal como se describe  
20 en la presente solicitud de patente, se caracteriza porque los preparados enzimáticos pueden ser producidos en un medio de cultivo para *O. piceae*, que incluye un compuesto lipídico como inductor, y para *Pichia pastoris* para la producción de la misma enzima en su variante recombinante. La esterol esterasa producida en ambos sistemas es una enzima mayoritaria y única en su actividad en los crudos enzimáticos obtenidos. Los crudos pueden ser sometidos  
25 a un proceso de liofilización y almacenados durante meses conservando su actividad.

La esterol esterasa utilizada en el procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos con ácidos grasos o ésteres de ácido graso de la presente invención puede ser cualquier enzima recombinante codificada en origen por el gen de *O.*  
30 *piceae*.

Preferentemente, la enzima recombinante se obtiene por un procedimiento que incluye 3 etapas que se describen a continuación:

i) La amplificación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de la secuencia que codifica la enzima, donde dicha secuencia se corresponde con la secuencia completa (incluyendo el péptido señal) o madura (sin péptido señal) de la proteína. Los moldes para la reacción de PCR podrán ser cualquier fragmento de DNA o cDNA que contenga la secuencia en cuestión como el DNA genómico del hongo preferentemente, o bien clones de una genoteca generada a partir de DNA genómico o cDNA en la que el fragmento de ácido nucleico responsable de codificar la enzima se encuentra en cualquier fago, cósmido, fásmido, o cromosoma artificial (BAC o YAC) empleado para generar dicha genoteca. De acuerdo con una realización preferente adicional, el molde empleado para la PCR también podría ser cualquier vector en el que la secuencia hubiera sido previamente clonada y, asimismo, cualquier fragmento de DNA o cDNA procedente de un proceso de evolución dirigida y/o mutagénesis dirigida independientemente del hospedador empleado. Preferentemente, son iniciadores de la amplificación cebadores que contengan la secuencia del péptido señal SEQ ID No: 3 o N-terminal de la proteína madura SEQ ID No: 9 y cebadores basados en el extremo 3' del gen de la enzima nativa (SEQ ID No: 8); o aquéllos derivados de éstos si se emplean como molde DNA o cDNA modificados resultantes de obtener variantes de la proteína como resultado de un proceso de evolución dirigida y/o mutagénesis dirigida. También cualquier tipo de cebadores que incluyan las características anteriores junto con cualquier otra modificación introducida en la secuencia de la proteína, como colas de histidina N o C terminales, etc.

ii) La introducción del gen o la secuencia madura que codifican la proteína, modificada o no, en cualquier tipo de vector de clonación y/o de expresión; entendiéndose por vector plásmidos de origen bacteriano modificados o vectores víricos eucariotas.

iii) Su expresión heteróloga en cualquiera de los organismos usados para la producción industrial de enzimas.

La presente invención tiene su origen en los estudios previos realizados sobre la esterol esterasa de *O. piceae*. Tras un *screening* entre diferentes hongos se escogió al ascomiceto *O. piceae* por producir una enzima capaz de hidrolizar tanto ésteres de esteroides como triglicéridos y mezclas de éstos procedentes de maderas de frondosas o coníferas (Calero-Rueda *et al.* Production, isolation and characterization of a sterol esterase from *Ophiostoma piceae*. Biochim. Biophys. Acta 1599 [1-2]: 28-35. 2002; Calero-Rueda *et al.* Hydrolysis of sterol esters by an esterase from *Ophiostoma piceae*: Application for pitch

control in pulping of *Eucalyptus globulus* wood. Intern. J. Biotechnol. 6: 367-375. 2004). Estos estudios dieron lugar a la patente internacional WO 02/075045 A1R1 (Calero-Rueda *et al.*, 2002) para su aplicación en la reducción de *pitch*, depósitos que originan problemas durante la fabricación de la pasta de papel.

5

Debido al interés industrial suscitado con la enzima, se decidió llevar a cabo su expresión heteróloga en uno de los sistemas eucarióticos más empleados, la levadura metilotrófica *P. pastoris*, con el fin de tratar de mejorar sus niveles de producción. Diferentes patentes recogen las mejoras realizadas en este sistema de expresión durante los últimos años (Bollok *et al.* Recent patents on the *Pichia pastoris* expression system: expanding the toolbox for recombinant protein production. Recent Patents on Biotechnology 3: 192-201. 2009). Esto, junto con la secuenciación reciente del genoma de la levadura (De Schutter *et al.* Genome sequence of the recombinant protein production host *Pichia pastoris*. Nature Biotechnology 27: 561-566. 2009), posibilitará en el futuro la mejora de cepas mediante estrategias de biología de sistemas.

10  
15

La producción máxima de la esteroles esterasa de *O. piceae*, en un medio sintético con glucosa y sales minerales suplementado con 0,5% de aceite de oliva (Calero-Rueda *et al.*, supra), se obtuvo entre los 15 y 21 días de cultivo y los niveles de actividad fueron aproximadamente 1,8 U/mL utilizando *p*-nitrofenilbutirato (*p*NPB) como sustrato. En el sistema de expresión escogido se pretende incrementar los niveles de actividad, disminuir el tiempo de producción y evitar la inducción con aceite de oliva, lo que tendría un efecto muy positivo en la producción de esta enzima a nivel industrial.

20

La secuencia madura (sin péptido señal) de la esteroles esterasa de *O. piceae* se ha utilizado para expresarla en la levadura *P. pastoris*. La producción de la enzima recombinante se encuentra fuertemente regulada por el promotor *AOX1* (alcohol oxidasa 1) de la levadura que responde a la presencia de metanol como inductor. La proteína recombinante producida es dirigida y secretada al medio extracelular gracias a la incorporación en su extremo N-terminal del pre-propéptido del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*, empleado para la expresión extracelular de muchas otras proteínas (Crepin *et al.* Production and characterization of the *Talaromyces stipitatus* feruloyl esterase FAEC in *Pichia pastoris*: identification of the nucleophilic serine. Protein Expression and Purification 29: 176-184. 2003; Damaso *et al.*

25

30

Optimized Expression of a Thermostable Xylanase from *Thermomyces lanuginosus* in *Pichia pastoris*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6064-6072. 2003; Brunel *et al.* High-level expression of *Candida parapsilosis* lipase/acyltransferase in *Pichia pastoris*. Journal of Biotechnology 111: 41-50. 2004). El hecho de que la producción se encuentre fuertemente regulada por la inducción del promotor *AOX1* garantiza la obtención de altos niveles de proteína recombinante dado que el gen *AOX1* sólo se sobreexpresa en presencia de metanol, y su producto es la primera enzima de la ruta catabólica para su utilización en levaduras metilotróficas. Existe también un gen *AOX2* cuyo producto no representa más del 15% de la actividad alcohol oxidasa celular, de manera que entre ambas enzimas pueden llegar a constituir casi el 30% del total de la proteína soluble celular en células creciendo en el alcohol (Cregg *et al.* Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. Mol. Cell. Biol. 9: 1316-1323. 1989; Daly y Hearn. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. J. Mol. Recognit. 18: 119-138. 2005). Considerando esto, los niveles de actividad que se han obtenido en Erlenmeyer con una cepa Mut<sup>+</sup> (*Methanol utilization plus*) de *P. pastoris* como biofactoría para la producción de la esterol esterasa serían de unas 3 veces los niveles alcanzados con *O. piceae* cuando se emplea un medio complejo, y de la tercera parte si se emplea un medio mínimo. No obstante la producción puede aumentar más si en el medio de cultivo se añade además del metanol, como inductor y fuente de carbono, una segunda fuente de carbono como el sorbitol, que no interfiere con la inducción (Inan y Meagher. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (*AOX1*) promoter of *Pichia pastoris*. Journal of Bioscience and Bioengineering 92: 585-589. 2001), llegando en este caso a producir niveles de actividad de hasta unas 7 veces superiores cuando se emplea un medio complejo. Además, es importante reseñar que las producciones citadas se lograrían en tan sólo 4 días de cultivo frente a las 2-3 semanas necesarias si se produce la enzima nativa, y que los volúmenes de medio que se manejan en esta escala para la producción de la enzima recombinante son considerablemente inferiores. La producción de la esterol esterasa recombinante puede verse mejorada aún más mediante un escalado a biorreactor en bioprocesos perfectamente controlados, en medios mínimos de composición perfectamente definida, y en tiempos de producción no mayores de 4 días, lo que facilitaría su posible uso industrial, a diferencia de lo que ocurre con las diferentes isoenzimas de *C. rugosa* de las que sólo se ha descrito el escalado en estas condiciones en la LIP2 recombinante (Ferrer *et al.*, supra).

La enzima recombinante producida es mayoritaria en el crudo y se puede concentrar por ultrafiltración tangencial empleando una membrana de 5 kDa y emplearse para diferentes aplicaciones, como la que describe la presente invención, tras haber sido  
5 liofilizada.

La purificación de las enzimas nativa y recombinante se realizó según el método previamente descrito (Calero-Rueda *et al.*, supra) con pequeñas modificaciones: el líquido ultrafiltrado se equilibró con sulfato amónico 0,5 M y se aplicó a un cartucho de interacción  
10 hidrofóbica *Hi Trap Octyl Sepharose (GE Healthcare)* equilibrado con la misma concentración de sal en Tris-HCl 25 mM, pH 7,0. Las proteínas retenidas se eluyeron con un gradiente lineal decreciente de la sal en 50 minutos a un flujo de 1 mL/min. Finalmente, la esteroesterasa se eluyó con una solución de Triton X-100 reducido al 0,2% (v/v). Mediante este único paso se consiguió obtener proteínas totalmente purificadas una vez dializadas por ultrafiltración para  
15 eliminar el detergente.

La caracterización cinética de la enzima recombinante en cuanto a la hidrólisis de diferentes tipos de ésteres (de *p*-nitrofenol, glicerol y colesterol) pusieron de manifiesto que la afinidad de la enzima recombinante por la mayor parte de los sustratos es algo mayor que  
20 en el caso de la enzima nativa. Lo que llama la atención, y es de destacar, es que con cualquiera de los sustratos ensayados la eficacia catalítica calculada para la enzima recombinante es del orden de 8-10 veces superior a la de la enzima nativa. Según esto, la enzima recombinante es capaz de catalizar la hidrólisis de más moléculas de cada uno de los sustratos por unidad de tiempo. Al igual que ocurre con la enzima nativa, las mayores  
25 eficacias corresponden a los ésteres de cadena larga y además éstas aumentan con el número de insaturaciones del sustrato. Hasta el momento no se ha caracterizado desde un punto de vista cinético la capacidad de síntesis de ambas enzimas debido a la complejidad de las reacciones. En este caso, los sistemas en los que se realizan las reacciones (sistemas monofásicos o bifásicos) podrían condicionar estos resultados.

30

En un principio la mejora catalítica de la enzima recombinante se atribuyó a su mayor grado de N-glicosilación frente al de la enzima nativa ( $\approx 30\%$  frente al  $8\%$ ), pero esto no parece ser la causa de la mejora en la enzima recombinante pues apenas existen cambios

significativos en su actividad frente a distintos sustratos tras su desglicosilación con endoglicosidasa H. Sin embargo, donde sí se han encontrado diferencias entre ambas enzimas, que podrían explicar esta mejora es en la secuencia de sus extremos N-terminales. En concreto, la enzima recombinante presenta el extremo N-terminal modificado con entre  
5 6-8 aminoácidos nuevos añadidos sobre la secuencia de la proteína nativa (SEQ ID No: 5 y SEQ ID No: 6) como consecuencia de i) el proceso de clonación en el plásmido integrativo utilizado para transformar *P. pastoris* que añade 4 aminoácidos (YVEF) al extremo de la proteína que forman parte del sitio de clonaje múltiple de aquel, y ii) el mal procesamiento post-traducciona l de la proteína recombinante para eliminar el péptido señal (pre-propéptido  
10 del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae*), a causa de lo cual se incorporan a la secuencia dos (EA) o cuatro (EAEA) aminoácidos de más. Por tanto, se tienen dos formas de proteína recombinante, una con 6 y otra con 8 aminoácidos de más. El mal procesamiento de este péptido señal se ha descrito también en otras proteínas expresadas de manera recombinante en *P. pastoris* sin afectar drásticamente a las propiedades catalíticas de la enzima (Crepin *et al.*, supra; Damaso  
15 *et al.*, supra; Brunel *et al.*, supra) y parece debido a que una de las enzimas encargadas de ello, concretamente la enzima STE13, que media la eliminación de las repeticiones EA, no sería capaz de procesar, al ser una enzima minoritaria, un producto (proteína recombinante) que se está sobreexpresando (Brake. Secretion of heterologous proteins directed by the yeast a-factor leader Yeast Genetic Engineering. Biotechnology series.pags. 269-280, 1989).

20

La existencia de la misma enzima con diferencias en su extremo N-terminal así como las diferentes propiedades catalíticas de cada una de las formas se ha descrito en la literatura (Mandrich *et al.* Role of the N Terminus in Enzyme Activity, Stability and Specificity in Thermophilic Esterases Belonging to the HSL Family. Journal of Molecular Biology 345: 501-  
25 512. 2005; Sayari *et al.* N-terminal peptide of *Rhizopus oryzae* lipase is important for its catalytic properties. FEBS Letters 579: 976-982. 2005; Niu *et al.* Secretion of pro- and mature *Rhizopus arrhizus* lipases by *Pichia pastoris* and properties of the proteins. Molecular Biotechnology 32: 73-81. 2006; Yu *et al.* *Rhizopus chinensis* lipase: Gene cloning, expression in *Pichia pastoris* and properties. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 57: 304-311. 2009;  
30 Peña-Montes *et al.* Differences in biocatalytic behavior between two variants of Stc1 esterase from *Aspergillus nidulans* and its potential use in biocatalysis. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 61: 225-234. 2009), e incluso se ha propuesto cómo dicho extremo interactuaría no sólo con el sustrato de naturaleza lipídica sino también con el resto de la molécula de

enzima (Frikha *et al.* Structural homologies, importance for catalysis and lipid binding of the N-terminal peptide of a fungal and a pancreatic lipase. *Protein and Peptide Letters* 17: 254-259. 2010). Por eso, asumimos que en el caso de la esteroles esterasa recombinante este cambio podría estar implicado en la mejora de sus constantes cinéticas. Esto se pudo

5 comprobar mediante estudios de velocidad de sedimentación realizados utilizando ultracentrifugación analítica para comparar las enzimas nativa y recombinante (Fig. 1). Estos estudios han puesto de manifiesto que mientras en solución acuosa (fosfato sódico 25 mM, pH 7,0) la enzima nativa se encuentra altamente agregada, la recombinante está en forma monomérica y dimérica. Si las proteínas se encuentran en una solución acuosa en presencia

10 de detergente, en este caso Genapol X-100 al 1% (v/v), ambas se encuentran mayoritariamente en forma monomérica. Si los estudios se hacen con enzima recombinante desglucosilada, para evitar el posible efecto "solubilizante" que pudieran tener los carbohidratos unidos a la proteína (ya que el porcentaje de estos es mucho mayor que en la nativa), se observa que la enzima recombinante se encuentra en forma monomérica y

15 dimérica en solución acuosa, siendo la forma compatible con el monómero la que aparece en presencia del detergente. Por tanto, resulta concluyente que la modificación del extremo N-terminal de la proteína recombinante está influyendo en el estado de agregación de la proteína y esto hace que sus propiedades cinéticas mejoren. Existen trabajos que ponen de manifiesto la diferente actividad de una proteína, concretamente lipasas, según su estado de

20 agregación. Cuando la proteína se encuentra agregada se forman estructuras pseudo-cuaternarias como consecuencia de la alta hidrofobicidad en aminoácidos expuestos al medio. Aunque existe disparidad en los efectos provocados, parece demostrado que el aumento del estado de agregación va acompañado de una pérdida de actividad que puede llegar a ser total, según el caso, como consecuencia del bloqueo de los sitios de unión al

25 sustrato (Rúa *et al.* Thermoalkalophilic lipase of *Bacillus thermocatenuatus*. Large-scale production, purification and properties: aggregation behaviour and its effect on activity. *Journal of Biotechnology* 56: 89-102. 1997; Palomo *et al.* General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 4: 1-6. 2003; Ferrer *et al.*, supra).

**BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Fig. 1. Estudio del estado de agregación de las enzimas nativa y recombinante por ultracentrifugación analítica. Se muestran los perfiles obtenidos con la enzima nativa y  
5 recombinante en solución acuosa a pH 7,0 en experimentos de velocidades de sedimentación.

Fig. 2A. Acilación de fitoesteroles de soja con ácido láurico mediante reacción de esterificación directa. Cromatograma de gases ilustrativo de la reacción control con una  
10 relación fitoesteroles:ácido graso 1:1 en isooctano tras 48 horas.

Fig. 2B. Acilación de fitoesteroles de soja con ácido láurico mediante reacción de esterificación directa. Cromatograma de gases ilustrativo del proceso de síntesis en reacciones con relación 1:1 tras 48 h con cualquiera de las enzimas empleadas en la presente  
15 invención.

Fig. 3. Efecto de diferentes relaciones fitoesteroles:ácido láurico en la acilación mediante esterificación directa de fitoesteroles de soja con el ácido en sistemas bifásicos isooctano/agua tras 48 h de reacción.  
20

Fig. 4. Efecto de la dosis de enzima en la acilación mediante esterificación directa de fitoesteroles de soja con ácido láurico en sistemas bifásicos isooctano/agua empleando exceso de ácido tras 48 h de reacción. Los valores de actividad se refieren a la actividad obtenida empleando como sustrato butirato de *p*-nitrofenilo a una concentración final de 1,5  
25 mM.

Fig. 5. Efecto del solvente orgánico utilizado en la acilación mediante esterificación directa de fitoesteroles de soja con ácido láurico en sistemas bifásicos empleando exceso de ácido tras 48 h de reacción.  
30

Fig. 6. Efecto de diferentes relaciones sitoestanol:ácido láurico en la acilación mediante esterificación directa de sitoestanol comercial con el ácido en sistemas bifásicos isooctano/agua tras 48 h de reacción.

Fig. 7. Efecto de diferentes relaciones sitoestanol:ácido oleico en la acilación mediante esterificación directa de sitoestanol comercial con el ácido en sistemas bifásicos isooctano/agua tras 48 h de reacción.

5

Fig. 8. Efecto de diferentes relaciones sitoestanol:oleato de metilo en la acilación de sitoestanol comercial mediante reacciones de transesterificación en sistemas bifásicos isooctano/agua tras 48 h de reacción.

## 10 EJEMPLOS

### Ejemplo 1

**Acilación de fitoesteroles con ácido láurico en sistemas bifásicos isooctano/agua. Efecto de la relación fitoesteroles:ácido láurico.**

15

Según datos bibliográficos, las moléculas de fitoesterol, debido a fuertes impedimentos estéricos, resultan sustratos difíciles de acilar para una gran mayoría de lipasas o esterolesas mediante reacciones directas de esterificación (Kirk *et al.*, supra), y se suele recurrir por este motivo al desarrollo de reacciones de transesterificación.

20

Preparados de enzima sin purificar, también denominados crudos, de la esterolesasa nativa y recombinante fueron concentrados por ultrafiltración tangencial a través de una membrana de 5 kDa, congelados a -80 °C y sometidos a un proceso de liofilización durante 48 horas. La actividad enzimática frente a pNPB antes y después del proceso de liofilización no cambió significativamente, conservando una actividad media cercana al 80% para la enzima nativa, y del 70-100% para la enzima recombinante dependiendo del lote y medio de producción. Los liofilos se mantuvieron a 4 °C durante más de 6 meses mostrando una gran estabilidad con el tiempo sin apenas perder actividad. Una preparación comercial (Sigma) con actividad esterolesasa procedente de *C. rugosa* se empleó también para las comparaciones.

30

Para la acilación de fitoesteroles con ácido láurico se empleó una mezcla comercial de éstos (Sigma), procedente de soja, conteniendo 55% de  $\beta$ -sitosterol, 10% de estigmasterol,

29% de campesterol y 6% de brasicasterol según se pudo comprobar por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Diferentes relaciones molares fitoesterol:ácido láurico fueron ensayadas, concretamente relaciones desde 1:1 a 1:6. Específicamente se asignó como reacción base  
5 aquella en la que la concentración de fitoesteroles era de 10 mM, estimada como media de los pesos moleculares de las especies presentes, y en la que la concentración de ácido láurico era también de 10 mM. Las reacciones tuvieron lugar en un sistema bifásico solvente orgánico/agua, concretamente isooctano/agua, donde la cantidad de agua correspondía al  
10 10% de la cantidad de solvente empleada. Las reacciones se desarrollaron en tubos de vidrio con tapón de rosca y junta de teflón conteniendo imanes para la homogenización de la mezcla durante la reacción. Directamente sobre los tubos se añadieron las cantidades necesarias de cada uno de los sustratos y el solvente orgánico, y se agitaron en vórtex. Tras calentar los tubos a 100 °C durante 5-10 minutos, preferiblemente 10 minutos, para  
15 favorecer la disolución de los componentes, y dejarlos enfriar a temperatura ambiente, se añadió la cantidad apropiada de agua milliQ. Inmediatamente después se añadieron las diferentes enzimas a una concentración de 6 U/mL de reacción, actividad medida frente a butirato de *p*-nitrofenilo a una concentración final de 1,5 mM. Se estableció un control sin enzima y las reacciones de síntesis se desarrollaron a 28 °C y una agitación de 1.200 rpm  
20 durante un máximo de 96 horas. Se obtuvieron muestras de las reacciones a diferentes tiempos de incubación. Éstas fueron diluidas 10 veces con isooctano, centrifugadas a 7.500 rpm a temperatura ambiente durante 10-15 minutos, tras lo cual se tomaron 200 µL del sobrenadante que se diluyeron a la mitad con oleato de colesterilo 0,5 mM en isooctano (patrón interno).

25

Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía de gases empleando un equipo GC 7890A (*Agilent Technologies*), dotado de inyector *split/splitless* y *backflush* con restrictor, con una columna Supelco SPB-1 (5m x 250µm x 0,25µm) y detector de ionización de llama (FID). El volumen de muestra a inyectar fue de 1 µL. Las temperaturas del inyector y  
30 el detector fueron fijadas a 350 °C. La temperatura de la columna se mantuvo a 115 °C durante 1 minuto, después se aumentó hasta 170 °C a razón de 10 °C/min, y por último se programó una rampa de 20 °C/min hasta 350 °C, manteniendo a esta temperatura 1 minuto. El tiempo de carrera fue de unos 17 minutos. Como gas portador se empleó helio a una

presión de 20 psi. El análisis de datos se realizó con el software *GC-ChemStation Rev.B.04.02 (96)* de *Agilent Technologies* (2001-2009). La cuantificación de los sustratos y productos de la reacción se realizó a partir de sus factores de respuesta respecto al oleato de colesterilo empleado como patrón interno. Las rectas de calibrado presentaron coeficientes de correlación de 0,99.

La figura 2 muestra, a modo de ejemplo, el seguimiento por cromatografía de gases de una reacción control, sin enzima, y otra en la que se emplea enzima tras 48 horas de incubación a 28 °C. En ambas reacciones la relación fitoesteroles:ácido láurico fue 1:1 y, en su caso, la cantidad de enzima de 6 U/mL. El pico a 1,55 minutos corresponde al ácido láurico, los picos a 10,75; 11,00; 11,15; y 11,35 minutos corresponden a los fitoesteroles brasicasterol, campesterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol respectivamente, los picos con tiempos de retención de 14,40; 14,55; 14,65; y 14,80 minutos corresponden a los ésteres de fitoesteroles del ácido láurico, a saber, laurato de brasicasterilo, laurato de campesterilo, laurato de estigmasterilo y laurato de  $\beta$ -sitosterilo; finalmente, el pico a 15,6 min corresponde al oleato de colesterilo (patrón interno).

Como puede deducirse del análisis de las muestras por cromatografía de gases, las esterol esterasas nativa (OPE nativa) y recombinante (OPE recombinante), así como la comercializada de *C. rugosa (CRL)*, son capaces de realizar la acilación del ácido graso con cualquiera de los fitoesteroles de la mezcla. La cuantificación con respecto al porcentaje de síntesis alcanzado, calculado con arreglo a la cantidad inicial de fitoesteroles, pone de manifiesto que con las tres enzimas se alcanzan altos porcentajes de acilación en tiempos cortos de reacción. Este porcentaje es mayor a medida que aumenta el exceso de ácido láurico en la reacción (Fig. 3). Sin embargo, entre las enzimas empleadas existen diferencias mostrando mejores niveles de acilación las enzimas nativa y recombinante de *O. piceae* que la comercial a bajos excesos del ácido.

Utilizar excesos de uno de los sustratos es una estrategia recurrente en las reacciones de síntesis o de acilación para optimizar los rendimientos de obtención de ésteres. A pesar de que reacciones en las que los sustratos aparezcan en una relación 1:1 puedan parecer ideales desde un punto de vista económico e incluso para la posterior purificación de los productos, en determinadas ocasiones, como la que nos ocupa, resulta ventajoso emplear tal

exceso (Villeneuve *et al.*, supra) pues reduce el tiempo de reacción necesario para obtener altos porcentajes de acilación. En principio, los ésteres de fitoesteres sintetizados pueden separarse del exceso de ácido graso mediante destilación molecular (Hirota *et al.*, supra), o mediante desacidificación facilitando la formación de sales del ácido graso (Weber *et al.*,  
5 supra). La mezcla de reacción puede también ser directamente tratada en un rotavapor o en un liofilizador para eliminar el solvente orgánico y obtener un producto con propiedades organolépticas aceptables en presencia del ácido graso libre.

## Ejemplo 2

### 10 Acilación de fitoesteres con ácido láurico en sistemas bifásicos isooctano/agua. Efecto de la dosis de enzima.

Con el fin de comprobar el efecto de la dosis de las diferentes enzimas en la eficacia de síntesis de ésteres de fitoesteres del ácido láurico se realizaron reacciones de acilación  
15 en sistemas bifásicos isooctano/agua, empleando un exceso de ácido láurico.

Las reacciones fueron preparadas según se indica en el ejemplo 1. Dosis de cada una de las enzimas comprendidas entre 1,5 y 12 U/mL, actividad frente a *p*NPB, fueron añadidas a los tubos de reacción y se incubaron entre 4-48 horas a 28 °C con agitación magnética a 1.200  
20 rpm. A diferentes intervalos de tiempo se obtuvieron muestras que fueron procesadas y analizadas tal y como se menciona en el ejemplo 1.

Las cuantificaciones obtenidas tras los análisis realizados por cromatografía de gases (Fig. 4) ponen de manifiesto que a dosis bajas de enzima (1,5 U/mL) el porcentaje de acilación  
25 alcanzado con la preparación enzimática de *C. rugosa* (CRL) es inferior al obtenido con las enzimas de *Ophiostoma* (OPE nativa y OPE recombinante). Resulta importante destacar que cuando se emplean dosis altas de enzima se obtienen los mismos resultados con las tres preparaciones enzimáticas ensayadas.

30 Las dosis de enzima que se han empleado corresponden a cantidades de sólido del orden de miligramos. Además sería posible su recuperación tras el término de la reacción por filtración o centrifugación. No obstante, para la realización del siguiente ejemplo se optó por seguir empleando dosis de 6 U/mL de reacción total de cada una de las enzimas, pues este

valor se encuentra dentro del rango en el que se alcanzan los mejores porcentajes de acilación y permite cierto ahorro en biocatalizador.

### Ejemplo 3

#### 5 **Acilación de fitoesteros con ácido láurico en sistemas bifásicos solvente orgánico/agua y sistemas monofásicos orgánicos. Efecto del solvente orgánico empleado.**

La eficacia de las esterasas nativa y recombinante de *O. piceae*, así como de la enzima comercializada de *C. rugosa* en reacciones de acilación de fitoesteros con ácido

10 láurico en sistemas bifásicos solvente/agua fue probada empleando diferentes solventes orgánicos para comprobar su efecto sobre el resultado de la reacción. En la literatura queda reflejado como el empleo de diferentes solventes puede afectar al rendimiento de la reacción como consecuencia de su diferente polaridad, lo cual determina la actividad “esterificante” de lipasas y esterasas (Hirata *et al.* Lipase-catalyzed transesterification in organic

15 solvent: effects of water and solvent, thermal stability and some applications. Journal of Biotechnology 14: 157-167. 1990; Grodowska *et al.*, supra). Incluso mediante la llamada “ingeniería de solventes” se pueden producir cambios en la actividad catalítica, estabilidad y selectividad de la enzima sin necesidad de modificarla mediante técnicas de mutagénesis dirigida, evolución dirigida o *phage display* (Klibanov., supra). Isooctano, n-hexano y tolueno

20 fueron los solventes escogidos. Todos ellos se han empleado para la síntesis de otros compuestos de interés y continúan hoy en día empleándose en la industria farmacéutica bajo estrictas normas de utilización (Grodowska *et al.*, supra). De hecho, el tolueno, en el año 2005, ocupaba el puesto número 7 dentro del *ranking* de los 10 solventes más empleados en *GlaxoSmithKline Pharmaceuticals* (GSK) (Constable *et al.* Perspective on solvent use in the

25 pharmaceutical industry. Organic Process Research & Development 11: 133-137. 2007), mientras que el n-hexano es uno de los pocos solventes orgánicos aceptados en la industria alimentaria (Li *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of conjugated linoleyl b-sitosterol and its cholesterol-lowering properties in mice. Journal of Agricultural and Food Chemistry 58: 1898-1902. 2010). Todos ellos presentan una adecuada separabilidad agua/solvente cuando se

30 emplean en sistemas bifásicos (Constable *et al.*, supra).

Las reacciones de acilación se prepararon tal y como se indicó en el ejemplo 1 empleando un exceso de ácido láurico con los diferentes solventes. Las reacciones se

desarrollaron en tubos de vidrio con tapón de rosca y junta de teflón siendo el volumen de agua el 10% del volumen empleado de solvente orgánico. Como se indicó en el ejemplo 1, tras añadir los sustratos y los solventes, y agitar en vórtex, las mezclas se calentaron en un baño de agua a 100 °C durante 5-10 minutos, preferiblemente 10 minutos, para favorecer la disolución de aquéllos, aunque en el caso del tolueno no hubiera sido necesario. Una vez que se enfría hasta temperatura ambiente, entre 22 y 25 °C, se añadió el volumen necesario de agua milliQ, y se procedió a la adición de las enzimas a una concentración de 6 U/mL. Las reacciones se desarrollaron a 28 °C, 1.200 rpm durante 4-48 horas. A diferentes intervalos de tiempo se obtuvieron muestras de las diferentes reacciones que se procesaron y analizaron tal y como se expuso anteriormente en el ejemplo 1.

Los análisis por cromatografía de gases de las muestras obtenidas de las diferentes reacciones ponen de manifiesto la capacidad de las enzimas ensayadas de acilar los fitoesteros en presencia de cualquiera de los solventes orgánicos. Sin embargo, con las tres enzimas, los mejores porcentajes de acilación se alcanzan cuando se emplea isooctano como solvente, después n-hexano, y por último en tolueno. En concreto, los porcentajes de acilación logrados tras 48h de reacción en isooctano fueron del 85, 81 y 84% para las enzimas *O. piceae* nativa (OPE nativa), *O. piceae* recombinante (OPE recombinante), y *C. rugosa* comercial (CRL) respectivamente; en n-hexano del 85, 76 y 78% respectivamente; y finalmente, en tolueno del 6, 4 y 14% respectivamente (Fig. 5).

Del mismo modo, estas reacciones pueden desarrollarse en sistemas monofásicos con cada uno de los tres solventes orgánicos estudiados. Los resultados de esterificación con la enzima nativa de *O. piceae* y la enzima comercial de *C. rugosa* fueron similares a los obtenidos en los sistemas bifásicos al emplear los solventes con mayor coeficiente de partición (logP). Sin embargo, los rendimientos obtenidos con la esterol esterasa recombinante de *O. piceae* fueron menores.

#### **Ejemplo 4**

**Acilación de sitoestanol con ácido láurico en sistemas bifásicos isooctano/agua. Efecto de la relación sitoestanol:ácido láurico.**

Los estanoles son los derivados saturados de los esteroides y se encuentran presentes en proporciones variables en los extractos naturales de fitoesteroides. Se ha evaluado la actividad de la esterasa nativa de *O. piceae* (OPE) y de la enzima de *C. rugosa* (CRL) en la síntesis de laurato de sitoestanol utilizando diferentes relaciones molares sitoestanol:ácido láurico, concretamente relaciones desde 1:1 a 1:6. Específicamente se asignó como reacción base aquella en la que la concentración de sitoestanol y ácido láurico era de 10 mM. Estas reacciones se llevaron a cabo en sistemas bifásicos isooctano/agua, con un contenido en agua inferior al 10% de la cantidad de solvente empleada, siguiendo la misma metodología descrita en el ejemplo 1, utilizando una dosis de enzima de 3 U/mL de reacción. Se estableció un control sin enzima y las reacciones de síntesis se desarrollaron a 28 °C y una agitación de 1.200 rpm durante un máximo de 48 horas, mismas condiciones de reacción que para la síntesis de ésteres de fitoesteroides descrita en el ejemplo 1. Se obtuvieron muestras de las reacciones a diferentes tiempos de incubación. Estas fueron diluidas 10 veces con isooctano, centrifugadas a 7.500 rpm a temperatura ambiente durante 10-15 minutos, tras lo cual se tomaron 200 µL del sobrenadante que se diluyeron a la mitad con oleato de colesterilo 0,5 mM en isooctano (patrón interno).

Las muestras fueron analizadas mediante cromatografía de gases empleando el mismo equipo y condiciones descritas en los ejemplos anteriores, con la excepción de que el volumen de inyección fue de 2 µL.

Los análisis cromatográficos (Fig. 6) revelan que, en las tres condiciones ensayadas, con la enzima OPE se alcanzan en 48 h elevados porcentajes de esterificación del ácido láurico, alrededor de 70-90%, mientras que utilizando CRL se esterifica como máximo el 20% del sustrato en el mismo período. Concretamente, para OPE, con un exceso molar de 3 para el ácido láurico respecto de sitoestanol se alcanzó un 80% de esterificación tras 24 h de reacción. La adición de un exceso molar de 6 no mejoró los rendimientos a las 24 h ni a las 48 h.

### 30 **Ejemplo 5**

**Acilación de sitoestanol con ácido oleico en sistemas bifásicos isooctano/agua. Efecto de la relación sitoestanol:ácido oleico.**

Con el fin de comprobar si la longitud de la cadena de ácido graso podría influir en la eficacia de la esterasa en la reacción de esterificación, se utilizó un ácido graso insaturado de cadena larga, concretamente el ácido oleico (C18:1), como agente de acilación.

5 Utilizando las mismas condiciones y metodología detalladas en el ejemplo anterior, se estudió la capacidad de la enzima nativa OPE para sintetizar oleato de sitoestanilo. Simultáneamente, se realizaron reacciones en idénticas condiciones utilizando la enzima comercial de *C. rugosa* CRL y se compararon los resultados obtenidos con ambas enzimas, analizando mediante cromatografía de gases muestras extraídas a diferentes tiempos de  
10 reacción en todas las condiciones ensayadas.

Los resultados de estas reacciones (Fig. 7) indican que la esterasa de *O. piceae* es más eficiente que la enzima comercial CRL en la esterificación de ácido oleico en todas las condiciones evaluadas. El grado de esterificación de este sustrato, valores entre 88-92% en  
15 48h, es comparable al alcanzado empleando ácido láurico. Por el contrario, CRL esterifica más eficazmente el ácido oleico que el láurico, aunque la máxima cantidad de oleato de sitoestanilo formada no supera el 67% en 48 h.

Como en el ejemplo anterior, en reacciones catalizadas por OPE, un exceso molar de  
20 ácido graso de 3 produjo el máximo rendimiento de 92 % a las 24 h de reacción y la adición de un exceso molar de 6 disminuyó los rendimientos de esterificación a las 24 h y a las 48 h.

### **Ejemplo 6**

**Acilación de sitoestanol con oleato de metilo en sistemas bifásicos isoocetano/agua. Efecto**  
25 **de la relación sitoestanol: oleato de metilo.**

Como se comentó en el ejemplo 1, la mayoría de las lipasas y esterasas tienen dificultad para catalizar la esterificación directa de fitoesteroles, razón por la cual se suele recurrir a reacciones de transesterificación para obtener los ésteres. Todos los ejemplos  
30 expuestos hasta ahora en la presente solicitud ilustran condiciones de esterificación directa. En este caso se describe la síntesis de oleato de sitoestanilo mediante transesterificación enzimática, utilizando las enzimas OPE nativa y CRL como catalizadores, y oleato de metilo como donador del grupo acilo.

Se prepararon reacciones de transesterificación utilizando relaciones molares sitoestanol:oleato de metilo entre 1:1 y 1:6 empleando las mismas condiciones descritas en los ejemplos anteriores, 3 U/mL enzima, 28°C, 1200 rpm.

5

Los resultados de estas reacciones (Fig. 8) indican que la esteroles esterasa OPE es más eficaz que la CRL en este tipo de reacciones, en cualquiera de las condiciones evaluadas. El grado de esterificación del sitoestanol por este procedimiento fue ligeramente menor que en las reacciones de esterificación directa, tanto para OPE como para CRL. Utilizando OPE como catalizador se alcanzó un % de acilación de entre el 65-87% y con CRL entre el 50-74% a las 48h. Las reacciones con OPE requirieron menores excesos molares de oleato de metilo, encontrando resultados similares con proporciones 1:3 y 1:6, alrededor del 87% de esterificación, mientras que con la de CRL el máximo porcentaje de esterificación del 74% se logró con una proporción 1:6.

10  
15

Como en otros ejemplos, en reacciones catalizadas por OPE, un exceso molar de donador del grupo acilo de 3 produjo un 78% de esterificación a las 24 h de reacción, mientras que CRL sólo esterificó un 24% de sitoestanol en las mismas condiciones y un 33% con un exceso de 6 veces respecto a la cantidad de sitoestanol.

20

**REIVINDICACIONES**

1. Procedimiento de acilación de fitoesteroles libres o de derivados saturados de éstos con un agente de acilación seleccionado del grupo que consiste en ácido graso libre y éster de ácido graso, catalizado por una enzima esteroles esterasa, caracterizado dicho procedimiento porque comprende una reacción de acilación en presencia de una esteroles esterasa producida por hongos del género *Ophiostoma*.
2. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según la reivindicación 1, donde la reacción de acilación es una reacción directa de acilación con un agente de acilación que es un ácido graso libre.
3. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la esteroles esterasa es producida por hongos de la especie *O. piceae*.
4. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según la reivindicación 3, donde la esteroles esterasa es una enzima recombinante codificada por el gen de *O. piceae*.
5. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según la reivindicación 4, donde la esteroles esterasa recombinante se expresa en un organismo seleccionado del grupo que consiste en *E. coli*, *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *H. polymorpha*, *Y. lipolytica*, *A. nidulans*, *A. niger* y *T. reesei*.
6. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según la reivindicación 5, donde la esteroles esterasa recombinante tiene un extremo N-terminal modificado cuyas secuencias son SEQ ID No: 5 y SEQ ID No: 6.
7. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde los fitoesteroles o fitoesteranos empleados provienen de cualquier fuente vegetal, de residuo lignocelulósico o de residuo de fabricación industrial de etanol, cerveza o papel.
8. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según la reivindicación 7, donde los fitoesteroles o los derivados saturados de éstos empleados provienen de la soja.
9. Procedimiento de acilación de fitoesteroles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde los fitoesteroles vegetales utilizados se seleccionan del grupo que consiste en  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, brasicasterol y cualquier derivado o mezcla de éstos.

10. Procedimiento de acilación de fitoesteroles según la reivindicación 9, donde la mezcla de fitoesteroles empleada comprende 55% de  $\beta$ -sitosterol, 10% de estigmasterol, 29% de campesterol y 6% de brasicasterol expresado en peso respecto al total de la mezcla.
- 5 11. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el agente de acilación se selecciona del grupo que consiste en ácido graso libre y éster de ácido graso, es saturado o insaturado, y de longitud de cadena de entre 6 y 18 átomos de carbono.
12. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según las reivindicación 11, donde el agente de acilación es ácido laúrico.
- 10 13. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según la reivindicación 11, donde el agente de acilación se selecciona del grupo que consiste en ácido oleico y oleato de metilo.
14. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 ó 11 a 13, donde la proporción molar de fitoesterol:agente de acilación o derivado saturado de fitoesterol:agente de acilación comprende valores entre 1:1 y 1:6.
- 15 15. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la esteroles empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo.
- 20 16. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de derivados saturados de éstos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la esteroles empleada como catalizador ha sido purificada mediante un método cromatográfico.
17. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 ó 15 a 16, donde se utiliza una dosis de enzima que comprende entre 1,5 y 12 U/mL de reacción.
- 25 18. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico o bifásico que comprende una mezcla de solvente orgánico y agua.
19. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según la reivindicación 18, donde el sistema bifásico comprende un 10% de agua.
- 30 20. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de derivados saturados de éstos según una cualquiera de las reivindicaciones 18 ó 19, donde el solvente orgánico se selecciona del grupo que consiste en isooctano, n-hexano y tolueno.

21. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la reacción de acilación transcurre entre 24 y 35 °C.
22. Procedimiento de acilación de fitoesteroles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde:
- 5
- a) los fitoesteroles vegetales utilizados se seleccionan del grupo que consiste en  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol, brasicasterol y cualquier derivado o mezcla de estos;
  - b) el agente de acilación se selecciona del grupo que consiste en ácido graso libre y éster de ácido graso, es saturado o insaturado, y de longitud de cadena de entre 6 y 18 átomos de carbono;
  - c) la esteroles esterasa empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
  - d) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico o bifásico que comprende una mezcla de solvente orgánico y agua; y
  - e) la reacción de acilación transcurre entre 24 y 35 °C.
- 10
- 15
23. Procedimiento de acilación de fitoesteroles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde:
- a) los fitoesteroles empleados son una mezcla que comprende 55% de  $\beta$ -sitosterol, 10% de estigmasterol, 29% de campesterol, y 6% de brasicasterol, expresado en peso respecto al total de la mezcla;
  - b) el agente de acilación es ácido láurico;
  - c) la proporción de fitoesterol:ácido láurico comprende valores entre 1:1 y 1:6;
  - d) la esteroles esterasa empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
  - e) se utiliza una dosis de enzima que comprende entre 1,5 y 12 U/mL de reacción;
  - f) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico, con isooctano, n-hexano o tolueno como solventes, o bifásico que comprende una mezcla de cualquiera de estos solventes orgánicos con un 10% de agua; y
  - g) la reacción de acilación transcurre a 28 °C.
- 20
- 25
- 30
24. Procedimiento de acilación de fitoestanoles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde:
- a) los fitoestanoles vegetales utilizados se seleccionan del grupo que consiste sitoestanol, campestanol, brasicastanol y cualquier derivado o mezcla de estos;
  - b) el agente de acilación se selecciona del grupo que consiste en ácido graso libre y éster de ácido graso, es saturado o insaturado, y de longitud de cadena de entre 6 y 18 átomos de carbono;
- 35
- 40

- c) la esterol esterasa empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
- d) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico o bifásico que comprende una mezcla de solvente orgánico y agua; y
- 5 e) la reacción de acilación transcurre entre 24 y 35 °C.
25. Procedimiento de acilación de fitoestanoles según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde:
- a) el fitoestanol empleado comprende un mínimo de 95 % de sitoestanol;
- 10 b) el agente acilante se selecciona del grupo que consiste en ácido laúrico, ácido oleico y oleato de metilo;
- c) la proporción de fitoestanol:agente de acilación comprende valores entre 1:1 y 1:6;
- d) la esterol esterasa empleada como catalizador es un crudo enzimático producido como consecuencia del cultivo del hongo;
- e) se utiliza una dosis de enzima que comprende entre 1,5 y 12 U/mL de reacción;
- 15 f) la reacción transcurre en un sistema monofásico orgánico, con isooctano, n-hexano o tolueno como solventes, o bifásico que comprende una mezcla de cualquiera de estos solventes orgánicos con un 10% de agua; y
- g) la reacción de acilación transcurre a 28 °C.
26. Procedimiento de acilación de fitoesteroles o de derivados saturados de éstos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde adicionalmente comprende una etapa de aislamiento en forma de polvo sólido del éster de fitoesterol o éster de fitoestanol.
27. Procedimiento de acilación de fitoesteroles según una cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23, donde el procedimiento adicionalmente comprende una etapa de aislamiento en forma de polvo sólido del éster de fitoesterol.
- 25 28. Procedimiento de acilación de fitoestanoles según una cualquiera de las reivindicaciones 24 ó 25, donde el procedimiento adicionalmente comprende una etapa de aislamiento en forma de polvo sólido del éster de fitoestanol.
29. Ésteres de fitoesteroles obtenidos mediante un procedimiento tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23 ó 26 a 27.
- 30 30. Ésteres de fitoestanoles obtenidos mediante un procedimiento tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, 11 a 21, 24 a 26 ó 28 .
31. Producto enriquecido con ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos tal como se definen en la reivindicación 29 o 30, caracterizado porque dicho producto se selecciona del grupo que consiste en un alimento, un preparado alimenticio, un suplemento dietético y un medicamento.
- 35 32. Producto enriquecido con ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según la reivindicación 31, caracterizado por ser un producto alimenticio seleccionado del

grupo que consiste en producto lácteo, producto derivado de la soja, cereal y mezcla de cereales.

5 33. Producto enriquecido con ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos según la reivindicación 31, caracterizado por ser un suplemento dietético o medicamento en una forma sólida apta para administración oral.

10 34. Uso de los ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos tal como se definen en las reivindicaciones 29 y 30 respectivamente, o de un producto enriquecido con ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos tal como se define en las reivindicaciones 31 a 33 para la obtención de productos de interés alimenticio y/o farmacéutico.

15 35. Ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos tal como se definen en las reivindicaciones 29 y 30 respectivamente, o de un producto enriquecido con ésteres de fitoesteroles o de los derivados saturados de éstos tal como se define en las reivindicaciones 31 a 33 para reducir los niveles de colesterol en plasma sanguíneo.

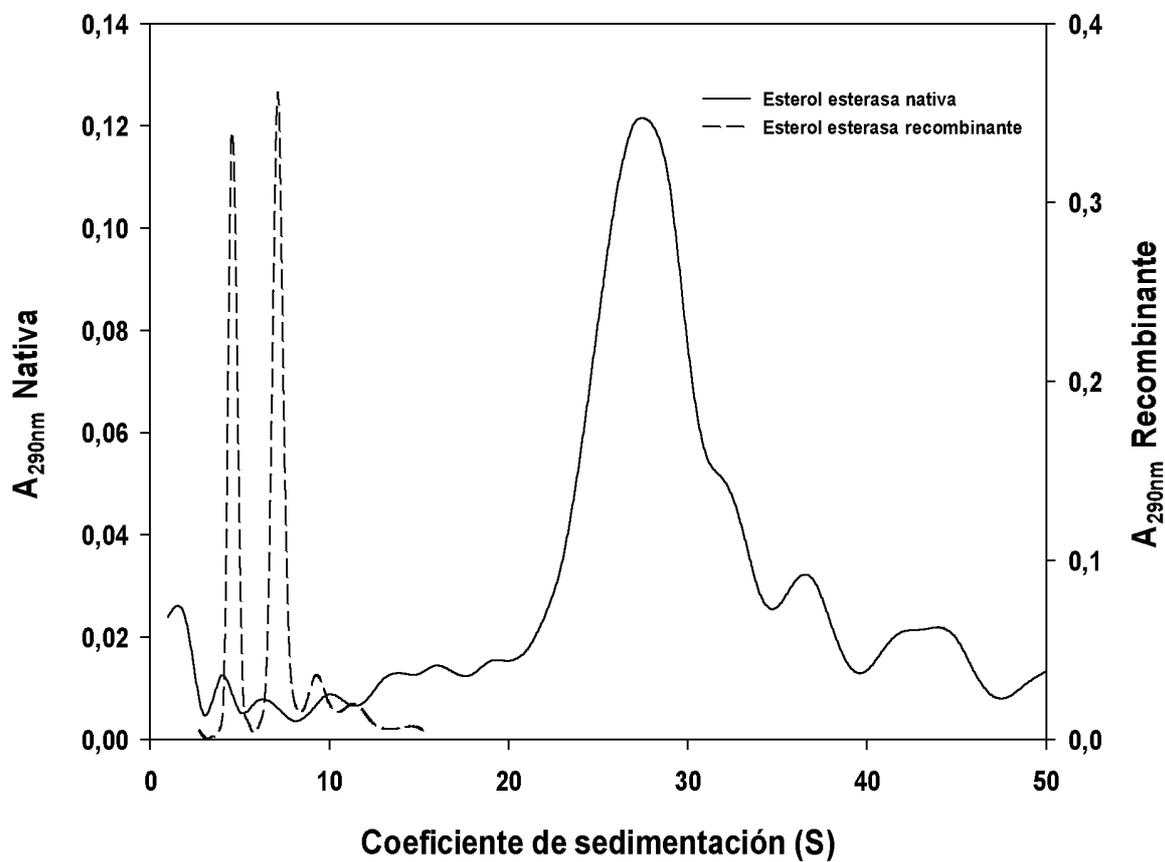


Fig. 1

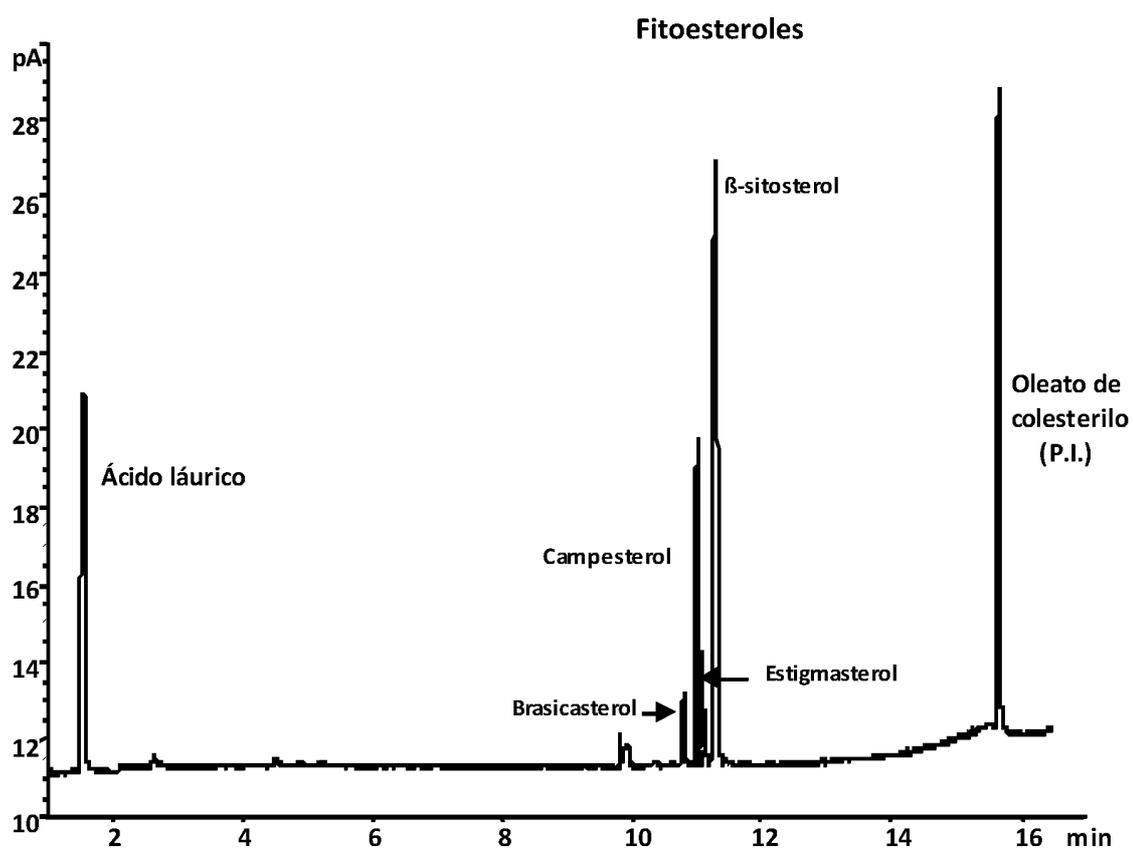


Fig. 2A

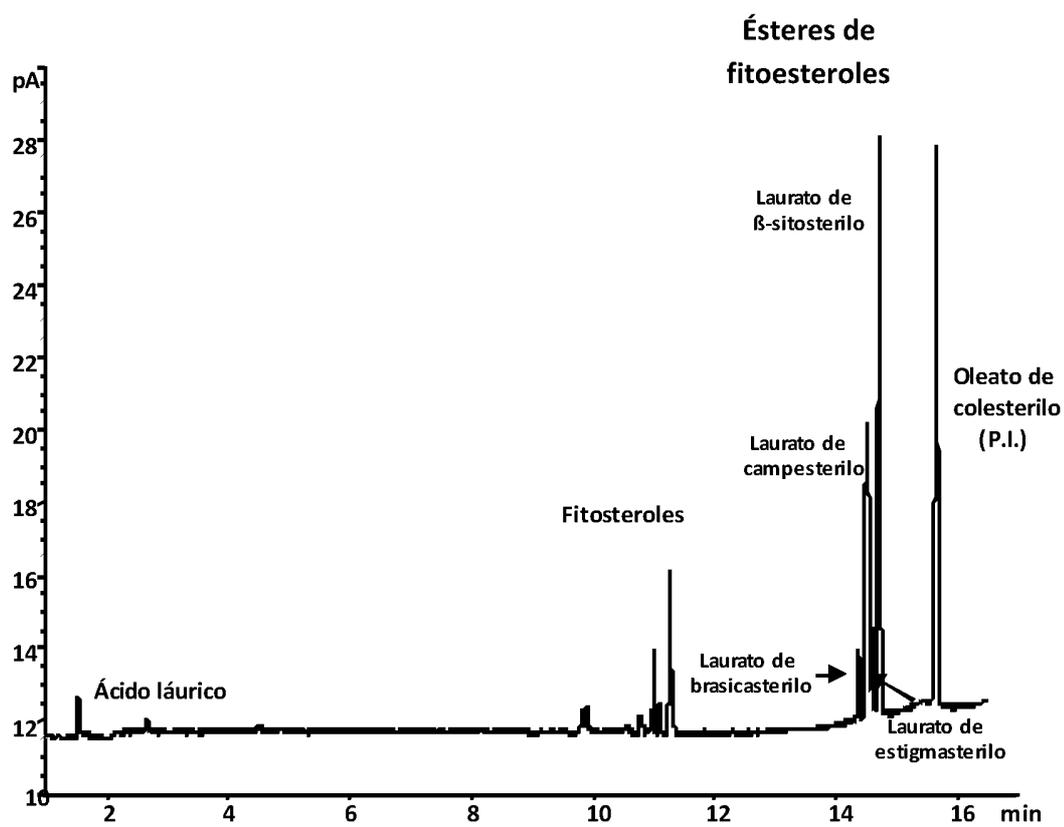


Fig. 2B

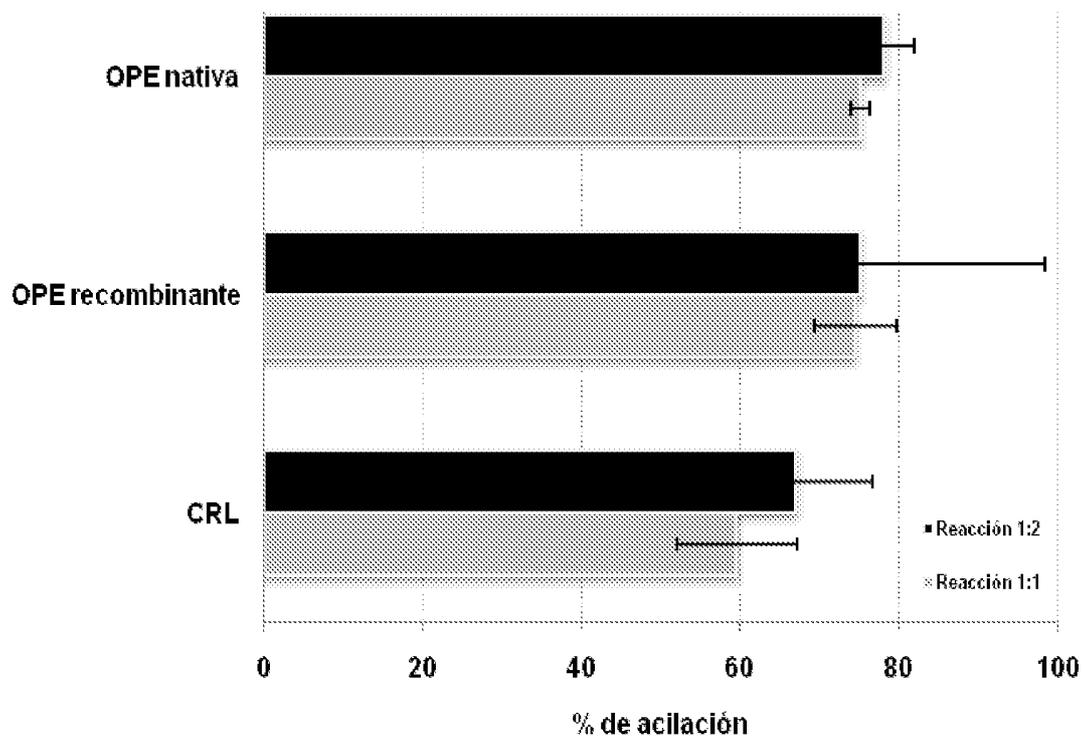


Fig. 3

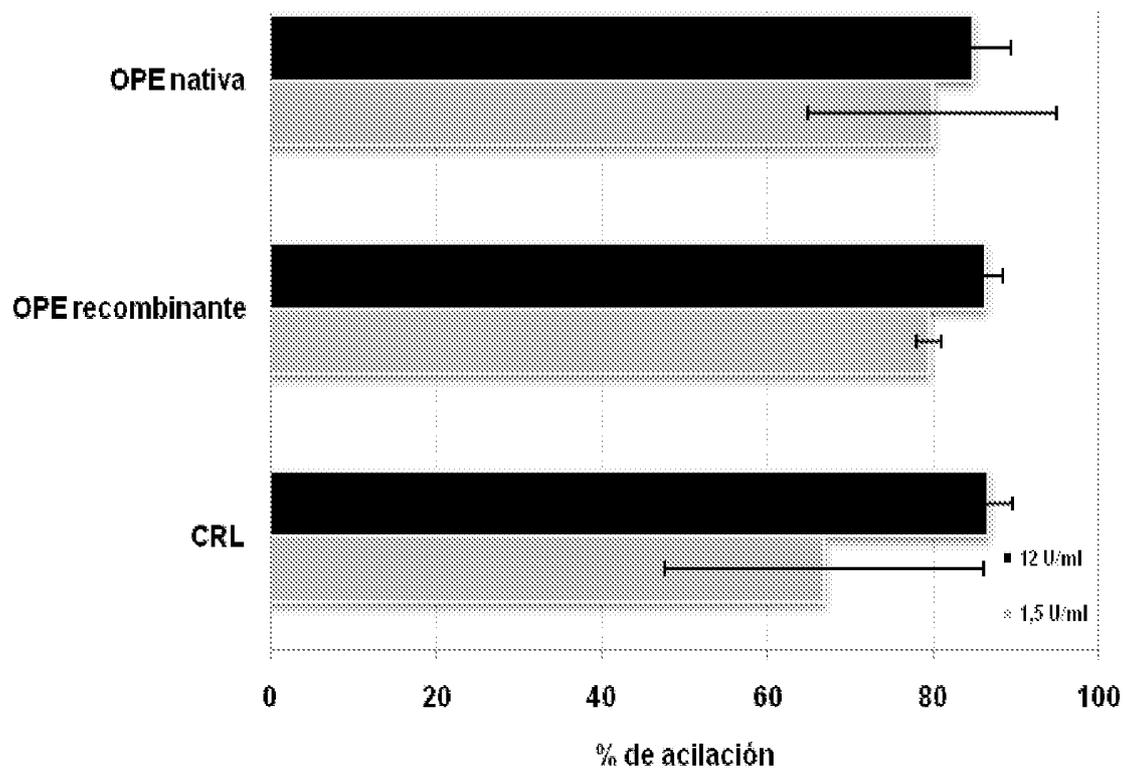


Fig. 4

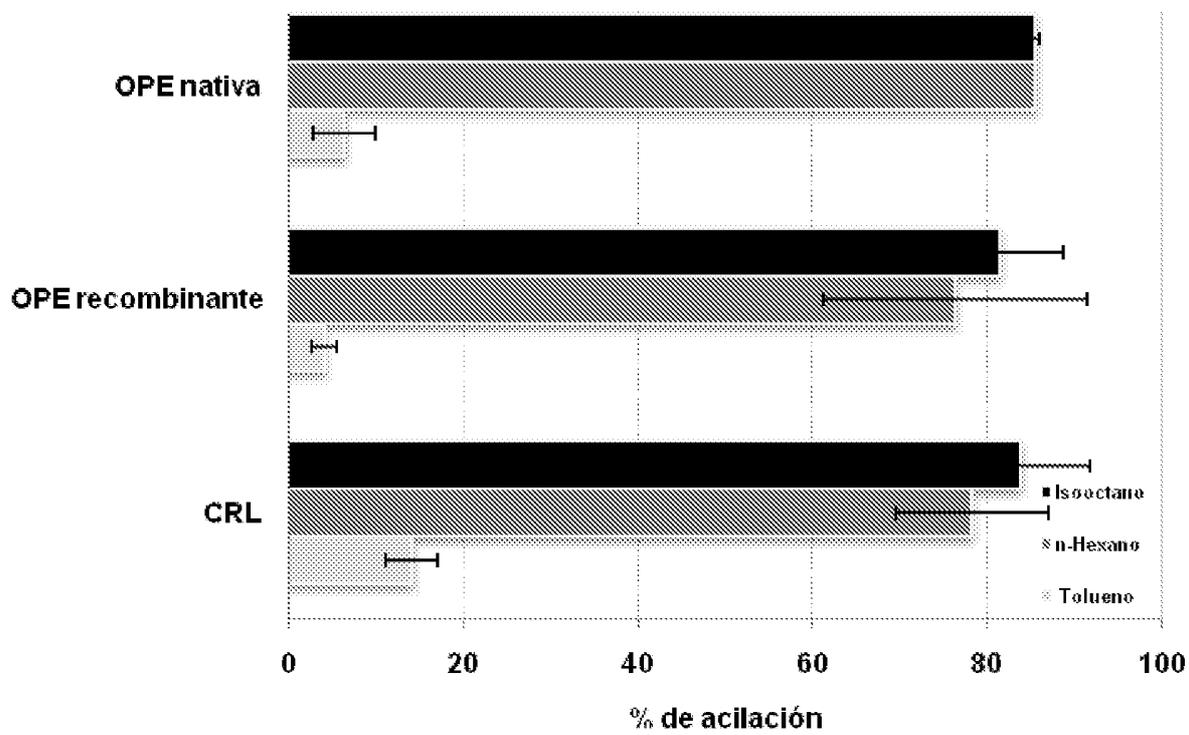


Fig. 5

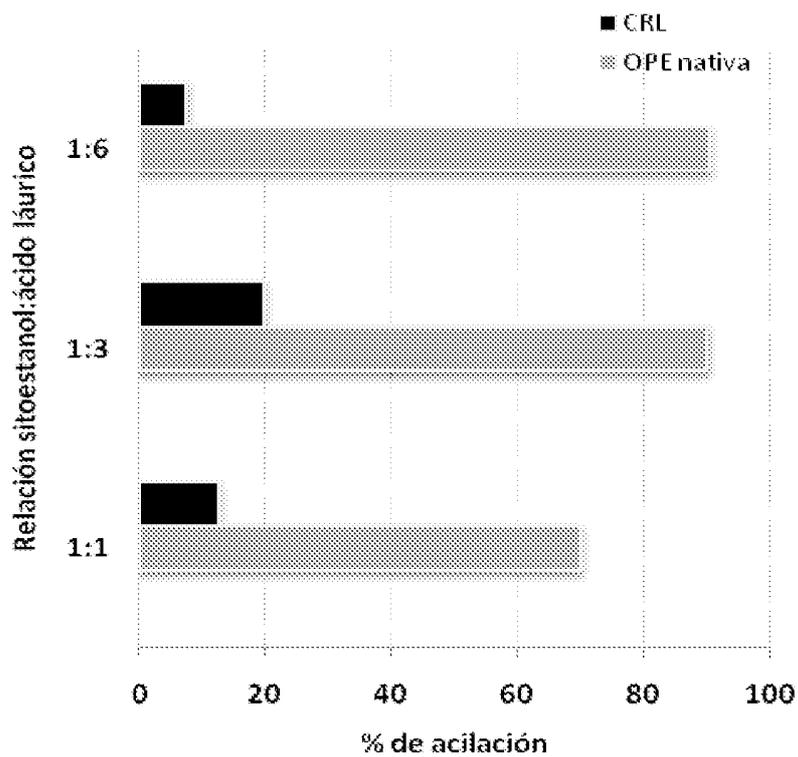


Fig. 6

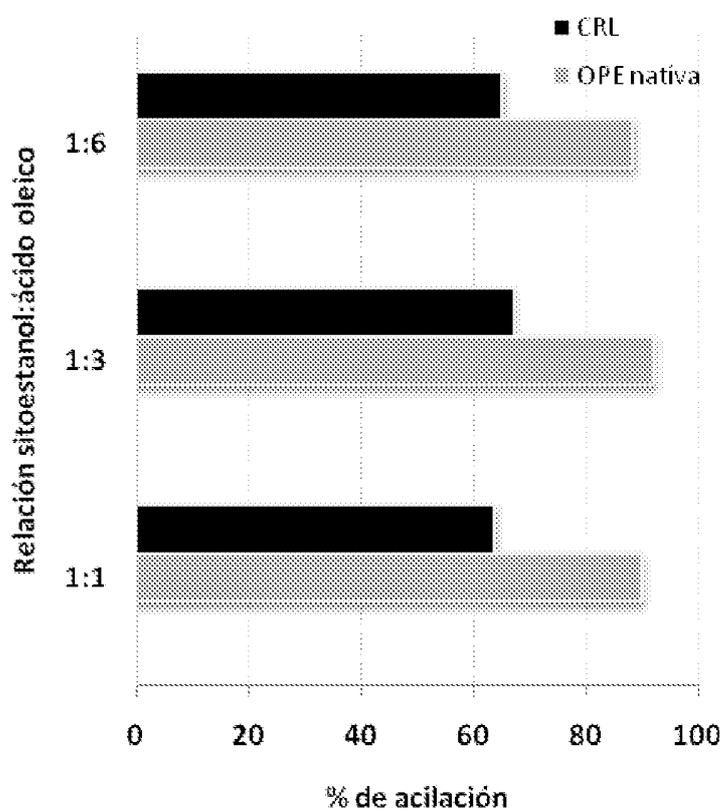


Fig. 7

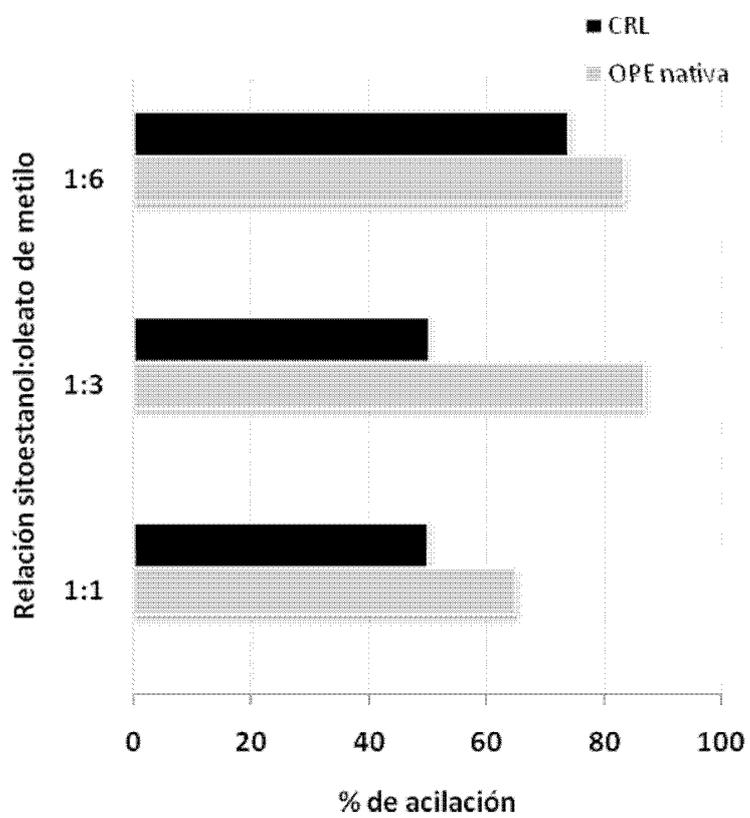


Fig. 8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070473

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

**See extra sheet**

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P, C07J, A23L, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, CA

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 0175083 A1 (ENZYMOTEC LTD ET AL.) 11/10/2001, the whole document.	1-35
A	WO 03064444 A1 (ENZYMOTEC LTD ET AL.) 07/08/2003, the whole document.	1-35
A	ES 2334313 A1 (UNIV MADRID AUTONOMA ET AL.) 08/03/2010, the whole document.	1-35
A	WO 9956558 A1 (RAISIO BENECOL OY ET AL.) 11/11/1999, the whole document.	1-35
A	WO 0132035 A1 (RAISIO BENECOL OY ET AL.) 10/05/2001, the whole document.	1-35
A	EP 0195311 A2 (YOSHIKAWA OIL & FAT ) 24/09/1986, the whole document.	1-35

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search  
11/10/2012

Date of mailing of the international search report  
**(17/10/2012)**

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer  
A. Maquedano Herrero

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495474

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/ES2012/070473

C (continuation).		DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
Category *	Citation of documents, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 02075045 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION ET AL.) 26/09/2002, the whole document.	1-35
A	WO 0061694 A1 (EUGENE SCIENCE INC ET AL.) 19/10/2000, the whole document.	1-35
A	CN 101200754 A (INST OF OIL CROPS RES CHINESE) 18/06/2008, (abstract) BASE DE DATOS WPI [on line], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [retrieved the 08/10/2012]. Retrieved of WPI in EPOQUENET, (EPO), DW 200875, N° DE ACCESO 2008-M65459.	1-35

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070473

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO0175083 A	11.10.2001	CA2405330 A AU4679501 A EP1268754 A JP2003529366 A US2004105931 A NZ521726 A IL135466 A	11.10.2001 15.10.2001 02.01.2003 07.10.2003 03.06.2004 29.10.2004 05.07.2006
-----			
WO03064444 A	07.08.2003	CA2473250 A EP1472270 A BR0307101 A US2005054621 A MXPA04007372 A JP2005518421 A CN1668631 A CN100408592 C NZ534160 A IL162764 A AU2003209617 B	07.08.2003 03.11.2004 28.12.2004 10.03.2005 08.06.2005 23.06.2005 14.09.2005 06.08.2008 30.03.2007 07.08.2008 17.09.2009
-----			
ES2334313 AB	08.03.2010	NONE	
-----			
WO9956558 A	11.11.1999	FI981011 A FI111513 B CA2332000 AC AU3934999 A EP1075191 AB BR9910248 A JP2002513079 A NZ508578 A AU758747 B AT236535 T US6589588 B DK1075191 T PT1075191 E ES2197640 T DE69906719 T US2004047969 A US6800317 B US2005079258 A US7771771 B JP2012017468 A JP4870262B2 B	07.11.1999 15.08.2003 11.11.1999 23.11.1999 14.02.2001 02.10.2001 08.05.2002 25.10.2002 27.03.2003 15.04.2003 08.07.2003 04.08.2003 29.08.2003 01.01.2004 29.01.2004 11.03.2004 05.10.2004 14.04.2005 10.08.2010 26.01.2012 08.02.2012
-----			
WO0132035 A	10.05.2001	CA2388312 AC AU1398401 A US2002031595 A US6562395 B BR0015133 A EP1225811 AB CN1399519 A	10.05.2001 14.05.2001 14.03.2002 13.05.2003 18.06.2002 31.07.2002 26.02.2003

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070473

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		CN1250113 C	12.04.2006
		JP2003513157 A	08.04.2003
		US2003170369 A	11.09.2003
		US6827964 B	07.12.2004
		ZA200203528 A	07.10.2003
		NZ519063 A	28.11.2003
		RU2002114575 A	20.01.2004
		RU2259750 C	10.09.2005
		AT259160 T	15.02.2004
		ES2213058 T	16.08.2004
		DE60008273 T	30.12.2004
		AU782264 B	14.07.2005
		JP4907816B2 B	04.04.2012
-----	-----	-----	-----
EP0195311 AB	24.09.1986	JP61204197 A	10.09.1986
		JP5033712 B	20.05.1993
		JP1825306 C	28.02.1994
		JP62048391 A	03.03.1987
		JP6095950 B	30.11.1994
		JP1985242 C	25.10.1995
		JP62166895 A	23.07.1987
		JP2554469B2 B	13.11.1996
		ES8706830 A	16.09.1987
		CH667284 A	30.09.1988
		US5219733 A	15.06.1993
		SG34093 G	09.07.1993
-----	-----	-----	-----
WO02075045 AB	26.09.2002	AU2002246136 A	03.10.2002
		ES2179768 AB	16.01.2003
-----	-----	-----	-----
WO0061694 A	19.10.2000	KR20000012176 A	06.03.2000
		AU5763499 A	14.11.2000
-----	-----	-----	-----
CN101200754 B	02.06.2010	NONE	
-----	-----	-----	-----

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070473

## CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*C12P33/00* (2006.01)  
*C07J9/00* (2006.01)  
*A23L1/30* (2006.01)  
*A61K31/575* (2006.01)

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070473

## A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

### Ver Hoja Adicional

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

## B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12P, C07J, A23L, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, BIOSIS, CA

## C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	WO 0175083 A1 (ENZYMOTEC LTD ET AL.) 11/10/2001, todo el documento.	1-35
A	WO 03064444 A1 (ENZYMOTEC LTD ET AL.) 07/08/2003, todo el documento.	1-35
A	ES 2334313 A1 (UNIV MADRID AUTONOMA ET AL.) 08/03/2010, todo el documento.	1-35
A	WO 9956558 A1 (RAISIO BENECOL OY ET AL.) 11/11/1999, todo el documento.	1-35
A	WO 0132035 A1 (RAISIO BENECOL OY ET AL.) 10/05/2001, todo el documento.	1-35
A	EP 0195311 A2 (YOSHIKAWA OIL & FAT ) 24/09/1986, todo el documento.	1-35

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

<p>* Categorías especiales de documentos citados:</p> <p>"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).</p> <p>"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.</p> <p>"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.</p> <p>"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.</p> <p>"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p> <p>"&amp;" documento que forma parte de la misma familia de patentes.</p>
--	--

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.  
11/10/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.  
**17 de octubre de 2012 (17/10/2012)**

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional  
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS  
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)  
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado  
A. Maquedano Herrero

Nº de teléfono 91 3495474

**INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070473

C (Continuación).		DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES
Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	WO 02075045 A1 (CONSEJO SUPERIOR INVESTIGACION ET AL.) 26/09/2002, todo el documento.	1-35
A	WO 0061694 A1 (EUGENE SCIENCE INC ET AL.) 19/10/2000, todo el documento.	1-35
A	CN 101200754 A (INST OF OIL CROPS RES CHINESE) 18/06/2008, (resumen) BASE DE DATOS WPI [en línea], Thomson Corp., Philadelphia, USA, [recuperado el 08/10/2012]. Recuperado de WPI en EPOQUENET, (EPO), DW 200875, N° DE ACCESO 2008-M65459.	1-35

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070473

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
WO0175083 A	11.10.2001	CA2405330 A	11.10.2001
		AU4679501 A	15.10.2001
		EP1268754 A	02.01.2003
		JP2003529366 A	07.10.2003
		US2004105931 A	03.06.2004
		NZ521726 A	29.10.2004
		IL135466 A	05.07.2006
-----	-----	-----	-----
WO03064444 A	07.08.2003	CA2473250 A	07.08.2003
		EP1472270 A	03.11.2004
		BR0307101 A	28.12.2004
		US2005054621 A	10.03.2005
		MXPA04007372 A	08.06.2005
		JP2005518421 A	23.06.2005
		CN1668631 A	14.09.2005
		CN100408592 C	06.08.2008
		NZ534160 A	30.03.2007
		IL162764 A	07.08.2008
		AU2003209617 B	17.09.2009
-----	-----	-----	-----
ES2334313 AB	08.03.2010	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----
WO9956558 A	11.11.1999	FI981011 A	07.11.1999
		FI111513 B	15.08.2003
		CA2332000 AC	11.11.1999
		AU3934999 A	23.11.1999
		EP1075191 AB	14.02.2001
		BR9910248 A	02.10.2001
		JP2002513079 A	08.05.2002
		NZ508578 A	25.10.2002
		AU758747 B	27.03.2003
		AT236535 T	15.04.2003
		US6589588 B	08.07.2003
		DK1075191 T	04.08.2003
		PT1075191 E	29.08.2003
		ES2197640 T	01.01.2004
		DE69906719 T	29.01.2004
		US2004047969 A	11.03.2004
		US6800317 B	05.10.2004
		US2005079258 A	14.04.2005
US7771771 B	10.08.2010		
JP2012017468 A	26.01.2012		
JP4870262B2 B	08.02.2012		
-----	-----	-----	-----
WO0132035 A	10.05.2001	CA2388312 AC	10.05.2001
		AU1398401 A	14.05.2001
		US2002031595 A	14.03.2002
		US6562395 B	13.05.2003
		BR0015133 A	18.06.2002
		EP1225811 AB	31.07.2002
CN1399519 A	26.02.2003		

# INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

PCT/ES2012/070473

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
		CN1250113 C	12.04.2006
		JP2003513157 A	08.04.2003
		US2003170369 A	11.09.2003
		US6827964 B	07.12.2004
		ZA200203528 A	07.10.2003
		NZ519063 A	28.11.2003
		RU2002114575 A	20.01.2004
		RU2259750 C	10.09.2005
		AT259160 T	15.02.2004
		ES2213058 T	16.08.2004
		DE60008273 T	30.12.2004
		AU782264 B	14.07.2005
		JP4907816B2 B	04.04.2012
-----	-----	-----	-----
EP0195311 AB	24.09.1986	JP61204197 A	10.09.1986
		JP5033712 B	20.05.1993
		JP1825306 C	28.02.1994
		JP62048391 A	03.03.1987
		JP6095950 B	30.11.1994
		JP1985242 C	25.10.1995
		JP62166895 A	23.07.1987
		JP2554469B2 B	13.11.1996
		ES8706830 A	16.09.1987
		CH667284 A	30.09.1988
		US5219733 A	15.06.1993
		SG34093 G	09.07.1993
-----	-----	-----	-----
WO02075045 AB	26.09.2002	AU2002246136 A	03.10.2002
		ES2179768 AB	16.01.2003
-----	-----	-----	-----
WO0061694 A	19.10.2000	KR20000012176 A	06.03.2000
		AU5763499 A	14.11.2000
-----	-----	-----	-----
CN101200754 B	02.06.2010	NINGUNO	
-----	-----	-----	-----

**CLASIFICACIONES DE INVENCION**

*C12P33/00* (2006.01)

*C07J9/00* (2006.01)

*A23L1/30* (2006.01)

*A61K31/575* (2006.01)