

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 811 270**

51 Int. Cl.:

C12N 9/78 (2006.01)

C12N 9/80 (2006.01)

A23J 3/14 (2006.01)

A23L 33/185 (2006.01)

A23P 30/40 (2006.01)

A23L 29/206 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.07.2016 PCT/EP2016/065791**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.01.2017 WO17009100**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.07.2016 E 16736070 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.07.2020 EP 3322305**

54 Título: **Uso de peptidilarginina deiminasa para solubilizar proteínas, opcionalmente también para reducir su tendencia a la formación de espuma**

30 Prioridad:

13.07.2015 EP 15176470

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

11.03.2021

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL**

72 Inventor/es:

**VLASIE, MONICA DIANA y
VEERMAN, CECILE**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 811 270 T3

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

DESCRIPCIÓN

5 Uso de peptidilarginina deiminasa para solubilizar proteínas, opcionalmente también para reducir su tendencia a la formación de espuma

La presente invención se refiere al uso de una enzima para mejorar la solubilidad de proteínas.

Antecedentes

10 En un mundo con una población en crecimiento existe una demanda cada vez mayor de proteínas. Para responder a esta demanda creciente de proteínas es necesario observar aplicaciones más amplias de proteínas. Además, se desea buscar proteínas vegetales como una alternativa a las proteínas animales, ya que se considera que las plantas son una fuente de proteínas más sostenible que los animales. El uso de proteínas vegetales en los alimentos sigue siendo limitado porque la solubilidad es generalmente baja, lo que es indicativo de propiedades funcionales deficientes. La solubilidad de las proteínas puede mejorarse mediante proteólisis. No obstante, esto puede conducir a la destrucción de otras propiedades funcionales, tales como gelificación, emulsificación u otros atributos sensoriales. Yong et al., J. of Agric. Food Chem. 2006, 54, 6034-6040, divulgan el uso de la proteína glutaminasa para aumentar la solubilidad del gluten de trigo. La proteína glutaminasa desamida las proteínas y, por lo tanto, aumenta la carga de la proteína desamidada, lo que mejora la solubilidad de la proteína sin la proteólisis de la proteína.

20 Existe la necesidad de vías enzimáticas alternativas para mejorar la solubilidad de las proteínas.

Descripción detallada

25 La presente invención se refiere al uso de peptidil arginina deiminasa para mejorar la solubilidad de una proteína vegetal a un pH de entre 5 y 8,5, en el que la proteína vegetal es guisante, soja o cereal. Otras propiedades físicas de las proteínas incluyen propiedades gelificantes, espumantes o emulsionantes.

30 En una forma de realización, la presente divulgación se refiere al uso de peptidil arginina deiminasa para mejorar la solubilidad de una proteína vegetal a un pH de entre 5 y 8,5, en el que la proteína vegetal es guisante, soja o cereal.

35 La presente divulgación se refiere además a un proceso para mejorar la solubilidad de una proteína vegetal que comprende incubar la proteína vegetal con una peptidil arginina deiminasa a un pH de entre 4 y 9, en el que la proteína vegetal muestra una solubilidad mejorada a un pH de entre 5 y 8,5, siendo la proteína vegetal proteína de guisante, de soja o de cereal.

Mejorar una propiedad física de una proteína en un uso o un proceso tal como se divulgan en el presente documento incluye solubilizar la proteína y opcionalmente reducir la capacidad de formación de espuma de la proteína.

40 En una forma de realización, la presente invención se refiere al uso de peptidil arginina deiminasa para solubilizar proteínas vegetales seleccionadas de guisante, soja o cereal a un pH de entre 5 y 8,5. Solubilizar, tal como se utiliza en el presente documento, comprende incubar la proteína vegetal con una peptidil arginina deiminasa a un pH de entre 4 y 9, tal como un pH de entre 5 y 8, o un pH de entre 5,5 a 7,5, o un pH de entre 6 y 7, o un pH de entre 6,2 y 6,8, o un pH de 6,5, y solubilizar la proteína en una solución que tiene un pH de entre 5 y 8,5.

45 Las peptidil argininas deiminasas se conocen, por ejemplo, por el documento WO2008/000174. El documento WO2008/000174 divulga un proceso para tratar enzimáticamente una proteína con una proteína arginina deiminasa, en el que al menos el 30% de la arginina se transforma en citrulina. Sorprendentemente, hemos descubierto que cuando la proteína arginina deiminasa se incuba con proteínas seleccionadas a partir de guisante, soja o cereal, la solubilidad de las proteínas aumenta, por ejemplo la solubilidad de la proteína aumenta a un pH neutro, en comparación con una proteína que no se ha incubado con una proteína arginina deiminasa, sin influir en otras propiedades funcionales de la proteína, o sin la proteólisis de la proteína.

50 Los términos proteína arginina deiminasa y peptidil arginina deiminasa (PAD) se utilizan indistintamente en el presente documento. La proteína o peptidil arginina deiminasa pertenece a una familia de enzimas (EC 3.5.3.15) que convierten la arginina unida a péptidos o proteínas en citrulina unida a péptidos o proteínas. Este proceso se denomina desaminación o citrulinación. En la reacción de arginina para dar citrulina, uno de los átomos de nitrógeno terminales de la cadena lateral de la arginina se reemplaza por un oxígeno. La reacción utiliza una molécula de agua y proporciona amoníaco como subproducto (<http://en.wikipedia.org/wiki/Citrullination>). Mientras que la arginina se carga positivamente a un pH neutro, la citrulina no se carga. Sorprendentemente, se ha descubierto que una proteína en la que al menos parte de la arginina se ha convertido en citrulina y, por lo tanto, en una proteína con menos carga, mostraba una mayor solubilidad en una solución con un pH de entre 5 y 8,5, o un pH de entre 5,5 y 8.

65 La solubilidad de una proteína, tal como se utiliza en el presente documento, es la cantidad de nitrógeno en el sobrenadante después de la separación sólido-líquido de la proteína. La cantidad de nitrógeno se puede medir después de la incubación de la proteína con PAD y/o la incubación de la proteína sin PAD. La separación de la proteína

se puede realizar por centrifugación o por filtración. El contenido de nitrógeno se puede medir según el procedimiento Kjeldahl. La solubilización de la proteína se mide como solubilización de nitrógeno.

5 En una forma de realización, la solubilidad de la proteína se aumenta mediante el uso de peptidil arginina deiminasa. El aumento en la solubilidad de la proteína es de al menos el 2%, 3%, 5%, 10%, por ejemplo de al menos el 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60 %, 65%, 70%, 75%, 80%, 85% o al menos el 90% o el 95%. El aumento en la solubilidad de una proteína que se ha incubado con PAD se compara con una proteína que no se ha incubado con PAD en las mismas condiciones.

10 Sorprendentemente, también se ha descubierto que la capacidad de formación de espuma de una proteína, tal como se utiliza en el presente documento, que se había tratado con una peptidil arginina deiminasa se redujo; por ejemplo, la capacidad de espuma se redujo en al menos el 2%, 3%, 4%, 5% o el 6%. Una capacidad reducida de formación de espuma es ventajosa, en particular, en una bebida que comprende una proteína vegetal, por ejemplo, leche derivada de una fuente vegetal.

15 La capacidad de formación de espuma, tal como se utiliza en el presente documento, se determina dividiendo el volumen de espuma inmediatamente después de mezclar una bebida entre el volumen del líquido antes de mezclar multiplicado por 100.

20 Las proteínas vegetales seleccionadas a partir de guisante, soja o cereal pueden utilizarse en un uso o un proceso de la presente invención. Ventajosamente, una proteína comprende arginina unida a proteínas, tal como al menos el 1% en moles, el 2, 3, 4, 5 o al menos el 6% en moles. Ejemplos de proteína vegetal son proteína de cereal, proteína de patata, proteína de soja, proteína de colza, proteína de arroz, proteína de guisante, así como proteínas de otras plantas que se sabe que son ricas en arginina, tales como altramuces, sésamo, palmiste, etc. Según la invención, La proteína vegetal es proteína de guisante, de soja o de cereal. Ejemplos de proteína de cereal son trigo o maíz o fracciones de los mismos, por ejemplo, gluten tal como gluten de trigo.

30 En una forma de realización, el uso de peptidil arginina deiminasa para mejorar la solubilidad y opcionalmente para reducir la capacidad de formación de espuma comprende incubar una proteína vegetal elegida a partir de guisante, soja o cereal con una peptidil arginina deiminasa a una temperatura y un pH adecuados, por ejemplo incubar la proteína con una peptidil arginina deiminasa a un pH de entre 4 y 9, tal como un pH de entre 5 y 8,5, tal como un pH de entre 5,5 y 8, tal como un pH de entre 6 y 7, o un pH de entre 6,2 y 6,8, por ejemplo a un pH de aproximadamente 6,5. Una temperatura adecuada a la que se incuba la proteína con PAD puede encontrarse entre 20 y 60 grados Celsius, tal como entre 30 y 50, o entre 35 y 45 grados Celsius.

35 En una forma de realización, se mejora una propiedad física de la proteína cuando se mide la propiedad física de la proteína en una solución que tiene un pH entre 5 y 8,5, tal como un pH entre 5,5 y 8, tal como un pH entre 6 y 7, o un pH entre 6,2 y 6,8.

40 La peptidil arginina deiminasa (PAD) puede derivarse de cualquier origen adecuado, por ejemplo, de origen mamífero o microbiano. Las PAD que se utilizan en la presente invención se derivan ventajosamente de una fuente microbiana. Por ejemplo, las PAD pueden derivarse de un origen fúngico tal como *Fusarium sp.*, tal como *Fusarium graminearum*, *Chaetomium globosum*, *Phaesphaeria nodorum*, o de origen bacteriano tal como de la bacteria *Streptomyces*, por ejemplo *Streptomyces sarna*, *Streptomyces clavuligeres*. Los términos "derivado" o "derivable", con respecto al origen de un polipéptido tal como se divulga en el presente documento, significan que cuando se lleva a cabo una búsqueda BLAST con un polipéptido tal como se divulga en el presente documento, el polipéptido puede derivarse de una fuente natural, tal como un célula microbiana, en la que un polipéptido endógeno muestra el porcentaje más elevado de homología o identidad con el polipéptido tal como se divulga en el presente documento.

50 Una peptidil arginina deiminasa puede ser una peptidil arginina deiminasa pura o purificada. Una peptidil arginina deiminasa purificada es una enzima que puede ser al menos el 50% pura, por ejemplo, al menos el 60% pura, al menos el 70% pura, al menos el 75% pura, al menos el 80% pura, al menos el 85% pura, al menos el 80% pura, al menos el 90% pura, o al menos el 95% pura, el 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% pura, por ejemplo según se determina por SDS-PAGE o cualquier otro procedimiento de análisis adecuado para este propósito y conocido por el experto en la técnica.

55 Ventajosamente, la peptidil arginina deiminasa es un polipéptido que tiene al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o con la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID NO: 1, en las que el polipéptido tiene actividad de peptidil arginina deiminasa.

60 Para los fines de la presente invención, se establece en el presente documento que para determinar el porcentaje de identidad de secuencia de dos secuencias de aminoácidos las secuencias se alinean con fines de comparación óptimos. Para optimizar el alineamiento entre las dos secuencias, se pueden introducir huecos en cualquiera de las dos secuencias que se están comparando. Dicho alineamiento puede llevarse a cabo a lo largo de la longitud completa de las secuencias que se están comparando. Alternativamente, el alineamiento puede llevarse a cabo a lo largo de una longitud más corta, por ejemplo, a lo largo de aproximadamente 20, aproximadamente 50, aproximadamente 100

- o más aminoácidos. La identidad de secuencia es el porcentaje de coincidencias idénticas entre las dos secuencias a lo largo de la región alineada de la que se informa. El porcentaje de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar utilizando el algoritmo de Needleman y Wunsch para el alineamiento de dos secuencias. (Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48, 443-453). Con el algoritmo pueden alinearse tanto las secuencias de aminoácidos como las secuencias de nucleótidos. El algoritmo de Needleman-Wunsch se ha implementado en el programa informático NEEDLE. Para los fines de la presente invención, se utilizó el programa NEEDLE del paquete EMBOSS (versión 2.8.0 o superior, EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite (2000) Rice, P. Longden, I. y Bleasby, A. Trends in Genetics 16, (6) p. 276-277, <http://emboss.bioinformatics.nl/>). Para secuencias de proteínas, se utiliza EBLOSUM62 para la matriz de sustitución. Los parámetros opcionales utilizados son una penalización por apertura de hueco de 10 y una penalización por extensión de hueco de 0,5. El experto apreciará que todos estos parámetros diferentes producirán resultados ligeramente diferentes, pero que el porcentaje de identidad general de dos secuencias no se altera significativamente cuando se utilizan algoritmos diferentes.
- Un "polipéptido maduro" se define en el presente documento como un polipéptido en su forma final y se obtiene después de la traducción de un ARNm en un polipéptido y las modificaciones postraduccionales de dicho polipéptido. Las modificaciones postraduccionales incluyen procesamiento N-terminal, truncamiento C-terminal, glicosilación, fosforilación y eliminación de secuencias líderes tales como péptidos, propéptidos y/o prepropéptidos señal por escisión.
- Una secuencia de polipéptidos maduros de SEQ ID NO: 1 puede comprender o contener los aminoácidos 19, 20, 21, 22, 23, 24 a 640 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, ventajosamente la secuencia de polipéptidos maduros de SEQ ID NO: 1 comprende o contiene los aminoácidos 22 a 640 de la SEQ ID NO: 1, en la que la metionina presente en la posición 1 en la SEQ ID NO: 1 se cuenta como el número 1.
- El término "polipéptido" se refiere a una molécula que comprende residuos de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos y que contiene más de cinco residuos de aminoácidos. El término "proteína", tal como se utiliza en el presente documento, es sinónimo del término "polipéptido" y también puede referirse a dos o más polipéptidos. Por lo tanto, los términos "proteína" y "polipéptido" se pueden utilizar indistintamente. Opcionalmente, los polipéptidos pueden modificarse (por ejemplo, glicosilarse, fosforilarse, acilarse, farnesilarse, prenilarse, sulfonarse y similares) para añadir funcionalidad. Los polipéptidos que muestran actividad en presencia de un sustrato específico en determinadas condiciones pueden denominarse enzimas.
- Se puede producir una peptidil arginina deiminasa, o un polipéptido que tiene actividad de peptidil arginina deiminasa, en cualquier organismo huésped adecuado mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo en hongos *Aspergilli*, por ejemplo *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma*, o las levaduras *Saccharomyces* y *Kluyveromyces* o las bacterias del género *Streptomyces* o *Bacilli*. Un procedimiento adecuado para expresar un polipéptido que tiene actividad de peptidil arginina deiminasa en *Aspergillus niger* se divulga, por ejemplo, en los ejemplos 3 y 4 del documento WO2008/000714.
- En una forma de realización, el uso de peptidil arginina deiminasa según la reivindicación 1 para mejorar la propiedad física de una proteína comprende además el uso de una proteína glutaminasa.
- En una forma de realización, un proceso para mejorar una propiedad física según la reivindicación 3 comprende incubar adicionalmente la proteína con una proteína glutaminasa.
- Sorprendentemente, se ha descubierto que cuando un uso según la reivindicación 1 comprende además el uso de una proteína glutaminasa o un proceso según la reivindicación 3 para mejorar una solubilidad comprende además incubar proteína con una proteína glutaminasa, se solubiliza una cantidad más elevada de proteína que cuando la proteína se ha incubado o solubilizado con peptidil arginina deiminasa o con proteína glutaminasa sola.
- Una proteína glutaminasa es una enzima que hidroliza grupos amida de glutamina y/o asparagina en una proteína para dar ácido glutámico y/o ácido asparagínico y amoniaco. Una proteína glutaminasa pertenece a la clasificación enzimática EC 3.5.1.44.
- Una proteína glutaminasa puede derivarse de cualquier microorganismo adecuado, por ejemplo, bacterias del género *Chryseobacterium*, *Flavobacterium*, *Empedobacter*, *Sphingobacterium*, *Bacillus*, *Aureobacterium* o *Myroides*, por ejemplo *Chryseobacterium gleum*, *C. indologenes*, *C. meningosepticum* *C. proteolyticum*, *Flavobacterium aquatile*, *Empedobacter brevis*, *Sphingobacterium spiritivorum*, *S. heparinum*, *Bacillus circulans* *Aureobacterium esteroaromaticum* o *Myroides odoratus*. Una proteína glutaminasa puede derivarse de *C. proteolyticum*. Por ejemplo, una proteína glutaminasa es un polipéptido que tiene al menos el 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o el 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o con la secuencia de aminoácidos madura de SEQ ID NO: 2, teniendo el polipéptido actividad de proteína glutaminasa.
- Una secuencia de polipéptidos maduros de SEQ ID NO: 2 puede comprender o contener los aminoácidos 136 a 320 de la SEQ ID NO: 2, en la que la metionina presente en la posición 1 en la SEQ ID NO: 2 se cuenta como el número

1.

Se puede producir una proteína glutaminasa en cualquier organismo adecuado mediante procedimientos conocidos por un experto en la técnica. Se puede producir una proteína glutaminasa en bacterias, por ejemplo, del género *Pseudomonas*, *Bacillus* o *Escherichia*, por ejemplo *Pseudomonas putida*, *Bacillus subtilis* o *Escherichia coli*.

Una proteína glutaminasa puede ser una proteína glutaminasa pura o purificada. Una proteína pura de glutaminasa purificada es una enzima que puede ser al menos el 50% pura, por ejemplo, al menos el 60% pura, al menos el 70% pura, al menos el 75% pura, al menos el 80% pura, al menos el 85% pura, al menos el 80% pura, al menos el 90% pura, o al menos el 95% pura, el 96%, 97%, 98%, 99%, 99,5%, 99,9% pura, por ejemplo, según se determina por SDS-PAGE o cualquier otro procedimiento analítico adecuado para este propósito y conocido por el experto en la técnica.

En una forma de realización, la presente divulgación se refiere a un proceso según la reivindicación 3 para mejorar la solubilidad de una proteína vegetal elegida a partir de guisante, soja o cereal y opcionalmente para reducir la capacidad de formación de espuma de dicha proteína vegetal que comprende incubar la proteína con una peptidil arginina deiminasa, en la que la proteína se solubiliza y, opcionalmente, se reduce su capacidad de formación de espuma. La solubilidad de la proteína aumenta y, opcionalmente, la capacidad de formación de espuma de la proteína se reduce en comparación con una proteína que no se ha incubado con una proteína arginina deiminasa en un proceso tal como se divulga en el presente documento.

La proteína se puede incubar con peptidil arginina deiminasa y opcionalmente proteína glutaminasa a cualquier pH y temperatura adecuados. Preferentemente, la proteína se incuba con peptidil arginina deiminasa y opcionalmente proteína glutaminasa a un pH de entre 5 y 8,5, tal como un pH de entre 5,5 y 8, tal como un pH de entre 6 y 7, o un pH de entre 6,2 y 6,8. Una temperatura adecuada a la que se incuba la proteína con peptidil arginina deiminasa y opcionalmente proteína glutaminasa puede encontrarse entre 20 y 60 grados Celsius, tal como entre 30 y 50, o entre 35 y 45 grados Celsius.

La proteína vegetal tal como se utiliza en el presente documento puede ser una solución que comprende proteína vegetal seleccionada a partir de proteína de guisante, de soja o de cereal. Una solución que comprende proteína vegetal puede ser una bebida que comprende proteína vegetal, por ejemplo una bebida puede ser leche derivada de fuentes vegetales. Las fuentes vegetales de leche incluyen, pero sin limitación, leche extraída de soja, guisante, cacahuete, cebada, arroz, avena, quinoa, almendras, anacardos, coco, avellanas, cáñamo, semillas de sésamo y semillas de girasol.

Figuras

Figura 1. Análisis por SDS PAGE de diversas proteínas incubadas con y sin PAD. Carril 1: marcador MW; Carril 2: proteína de guisante; Carril 3: proteína de guisante + PAD; Carril 4: gluten de trigo; Carril 5: gluten de trigo + PAD; Carril 6: proteína de soja; Carril 7: proteína de soja + PAD; Carril 8: colágeno óseo; Carril 9: colágeno óseo + PAD.

Figura 2. La solubilidad de la proteína de guisante a diferentes valores de pH incubada con PAD a pH de 6,5 y a 40 °C.

Figura 3. Capacidad de formación de espuma de la proteína de guisante tratada con PAD y PAD y PG a pH de 6,5 y a 40 °C en comparación con la capacidad de formación de espuma de la proteína de guisante y clara de huevo sin tratar.

Ejemplos

Materiales

Técnicas de biología molecular

Las técnicas de biología molecular conocidas por el experto se realizan tal como se establece en Sambrook & Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3ª ed., CSHL Press, Cold Spring Harbor, NY, 2001).

Clonación y expresión de peptidil arginina deiminasa en *Aspergillus niger*

La clonación y la expresión del polipéptido que tiene actividad de peptidil arginina desaminasa según la SEQ ID NO: 1 se realizó tal como se divulga en los ejemplos 3 y 4 del documento WO2008/000714.

Actividad de peptidil arginina deiminasa

La actividad de la peptidilarginina deiminasa se determinó midiendo la formación de residuos de citrulina en el éster etílico de α -N-benzoil-L-arginina (BAEE). La mezcla de incubación contenía tampón tris-HCl 100 mM (pH 7,5), CaCl₂

5 mM, DTT 10 mM, BAEE 10 mM en un volumen final de 700 μ l. La incubación se realizó a 55 °C durante 30 min, y la reacción se detuvo mediante la adición de 100 μ l de HClO₄ 8 N. La citrulina se determinó por colorimetría según el procedimiento de Guthöhrlein y Knappe, (1968) Anal. Biochem. 26, 188.

5 Una unidad de peptidil arginina deiminasa se expresa como 1 μ mol de citrulina formada/min/mg de proteína.

Clonación y expresión de proteína glutaminasa (PrgA) de *Chryseobacterium proteolyticum* en *Bacillus subtilis*

10 El vector lanzadera de *E. coli B. subtilis* pGGB09 que se describe en el documento US 8426182 B1 se utilizó para la expresión de proteína-glutaminasa (PrgA) (SEQ ID NO: 2) a partir de la cepa 9670 de *Chryseobacterium proteolyticum* (S. Yamaguchi, David J. Jeenes y David B. Archer (2001) Eur. J. Biochem. 268, 1410-1421). El gen *prgA* se sintetizó con un sitio de restricción Pacl y un sitio de unión a ribosoma en el extremo 5' y un doble codón de detención y sitio de restricción Pmel en el extremo 3' y este fragmento de ADN se cataloga como SEQ ID NO: 3. El fragmento se clonó
15 de PrgA pBHA12-PGU-1. La secuencia del plásmido se confirmó por secuenciación de ADN.

20 El vector pBHA12-PGU-1 se transformó en la cepa BS154 de *B. subtilis* (CBS 363.94) ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $amyE$, spo^+) tal como se describe por Quax y Broekhuizen, 1994 Appl Microbiol Biotechnol. 41: 425-431. La cepa BS154 de *B. subtilis* que contiene el vector de expresión PrgA se denominó BSU154 PGU-1. Se cultivó BSU154 PGU-1 de *B. subtilis* en un matraz con agitación. Estos matraces con agitación contenían 20 ml de medio 2xTY compuesto por el 1,6% (p/v) de Bacto-triptona, el 1% (p/v) de extracto de levadura y el 0,5% (p/v) de NaCl. Los cultivos se agitaron vigorosamente a 37 °C y 250 rpm durante 16 horas y se utilizaron 0,2 ml de medio de cultivo para inocular 20 ml de medio SMM.

25 El premedio SMM contenía el 1,25% (p/p) de extracto de levadura, el 0,05% (p/p) de CaCl₂, el 0,075% (p/p) de MgCl₂.6H₂O, 15 μ g/l de MnSO₄.4H₂O, 10 μ g/l de CoCl₂.6H₂O, el 0,05% (p/p) de ácido cítrico, el 0,025% (p/p) de antiespumante 86/013 (Basildon Chemicals, Abingdon, Reino Unido). Para completar el medio SMM, se añadieron 20 ml de maltosa al 5% (p/v) y 20 ml de una solución madre de tampón de fosfato de Na 200 mM (pH 6,8), preparados y esterilizados por separado, a 60 ml de premedio SMM.

30 Los cultivos se incubaron a 37 °C y 250 rpm durante 48 horas. Los sobrenadantes se cosecharon por centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos, después de lo cual se almacenaron a -20 °C hasta su uso posterior.

Actividad de proteína glutaminasa (PG)

35 La actividad de PG se midió utilizando un procedimiento modificado descrito por Yamaguchi S. et al. en Appl. Reinar. Microbiol (2000), Vol 66, N° 8, p. 3337-3343. El sustrato Z-Gln-Gly 10 mM (Sigma) se preparó en tampón de fosfato de sodio 65 mM a pH 6,5 y se incubó con la enzima a 40 °C. La reacción se detuvo con 255 de ácido tricloroacético, operación seguida de centrifugación a 20000 g durante 5 minutos. El amoniaco liberado se midió por medio del procedimiento de Berthelot. La actividad enzimática se expresó como la cantidad de amoniaco (en mmol) liberada a
40 40 °C en 30 min.

Ejemplo 1. La peptidil arginina deiminasa (PAD) es activa en varios sustratos proteicos

45 La peptidil arginina deiminasa (PAD) convierte la arginina en citrulina, por lo que se libera amoniaco. Por lo tanto, la liberación de amoniaco es una medida de la actividad enzimática en los sustratos proteicos elegidos.

50 Se pesaron 40 mg de sustratos proteicos de aislado de proteína de soja (Wilmar International Ltd), aislado de proteína de guisante (Pisane F9, Cosucra), gluten de trigo (Sigma) y colágeno insoluble (Sigma) en vasos Eppendorf de 2 ml y se añadió 1 ml de fosfato de sodio 50 mM a pH de 6,5. Las incubaciones se iniciaron añadiendo enzima PAD a una dosis de 0,1% v/v sobre materia seca. Después de 16 horas de incubación a 40 °C, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 14.000 rpm a 25-40 °C. Las muestras se diluyeron una vez, excepto el colágeno, que se diluyó dos veces, y las muestras se centrifugaron nuevamente sobre el filtro 10K PES. Los sustratos proteicos sin adición de PAD se incubaron en las mismas condiciones para que sirvieran como blanco. El sobrenadante de las muestras se almacenó a 4 °C.

55 *El análisis de amoniaco se realizó con el kit de ensayo de amoniaco (Sigma-Aldrich)*

60 El kit está diseñado para la determinación cuantitativa y enzimática de amoniaco en alimentos y muestras biológicas. El amoniaco reacciona con ácido α -cetoglutárico y reduce el NADPH en presencia de L-glutamato deshidrogenasa para formar L-glutamato y NADP⁺. La disminución de la absorbancia a 340 nm (NADPH \rightarrow NADP⁺) es proporcional a la concentración de amoniaco.

65 Se añadieron 100 μ l del sobrenadante de las incubaciones de proteínas a 1 ml de reactivo de ensayo de amoniaco. Después de mezclar, la solución se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia a 340 nm. Posteriormente se añadieron 10 μ l de la deshidrogenasa. La absorbancia se midió nuevamente después de 5 minutos de incubación. La cantidad de amoniaco se calculó utilizando el coeficiente de extinción molar de NADPH.

Se utilizó una solución estándar de amoníaco como control.

La tabla 1 muestra la cantidad de amoníaco liberado después de incubar el sustrato proteico con PAD a 40 °C durante 16 h, menos la cantidad de amoníaco medido en el sustrato incubado sin PAD.

5 Tabla 1. Amoníaco liberado a partir de varios sustratos proteicos después de incubación con PAD a 40 °C durante 16 h.

Sustrato	Cantidad de amoníaco liberado (µg de NH ₃ /ml)
soja	29,5
guisante	22,1
gluten	25,0
colágeno	25,4

10 **Ejemplo 2.** Cambios en la solubilización de proteínas después de incubación con peptidil arginina deiminasa

Se incubaron sustratos proteicos de aislado de proteína de soja (Wilmar International Ltd), guisante (Pisane C9, Cosucra), gluten de trigo (Sigma) y colágeno insoluble (Sigma) con peptidil arginina deiminasa (PAD) y se midió la cantidad de proteína solubilizada.

15 Se mezclaron 200 mg de sustrato con 4,8 ml de tampón de fosfato de sodio 50 mM, pH 6,5, en tubos Greiner que contenían un agitador magnético y se dispusieron en un baño de agua con un dispositivo para agitación magnética de 40 °C. Se añadió proteína enzimática PAD al 0,1% sobre materia seca. Las muestras se incubaron durante la noche y se centrifugaron durante 25 minutos a 3220 * g. Los sobrenadantes se centrifugaron de nuevo durante 20 minutos a 14.000 rpm.

20 Las muestras se utilizaron para medir la solubilización de proteínas midiendo el contenido de nitrógeno (N) en el sobrenadante después de centrifugación utilizando el análisis de Kjeldahl. Los resultados del análisis de proteínas se presentan en la tabla 2.

25 Tabla 2. Solubilización de proteínas después de incubación con PAD a 40 °C durante 16 h, medida como nitrógeno (Kjeldahl)

Proteína sustrato	Nitrógeno Kjeldahl (mg/kg)		% de aumento en la solubilización por PAD a pH 6,5
	Adición de PAD		
	-	+	
soja	656	898	37
guisante	493	734	49
gluten	327	639	95
colágeno	5320	5510	3,5

30 Análisis por SDS-PAGE

Los sustratos proteicos incubados con peptidil arginina deiminasa se analizaron mediante SDS-PAGE.

35 Se mezclaron 65 µl de los sobrenadantes con 25 µl de tampón de muestra LiDS y 10 µl de agente reductor de muestra. La mezcla se calentó durante 15 minutos a 70 °C. Posteriormente, se aplicaron 10 µl de cada muestra al gel Bis-Tris al 10% y las proteínas se separaron utilizando tampón MES como sistema de ejecución durante 39 minutos a 200 V. El gel se tiñó con Instant Blue.

40 El gel de SDS-PAGE que se muestra en la figura 1 muestra que no se observó proteólisis en las incubaciones de los diferentes sustratos proteicos con peptidil arginina deiminasa.

Ejemplo 3. Solubilidad de proteínas vegetales tratadas con peptidil arginina deiminasa o una combinación de peptidil arginina desaminasa y proteína glutaminasa

45 Se preparó una dispersión de 100 mg/ml de proteínas vegetales a partir de proteína de guisante (Pisane C9, Cosucra), aislado de proteína de soja (Wilmar Int. Ltd.) y aislado de proteína de arroz en agua a pH 6,5. A estas dispersiones, se añadieron el 0,1% en peso/peso de PAD o el 0,1% en peso de PAD y el 0,1% en peso de proteína enzimática PG a materia seca y se incubaron en un mezclador termostático durante 4 horas a 40 °C. Después de 4 h, el material se

centrifugó a 5600 g durante 10 min. El porcentaje de solubilización para cada material de proteína se calculó a partir del contenido de proteína en el sobrenadante después de la centrifugación.

5 La cuantificación de proteínas se realizó utilizando el procedimiento de Biuret después de precipitación de las proteínas con ácido tricloroacético.

La tabla 3 muestra que se solubiliza una cantidad más elevada de proteína cuando la proteína se incuba con PAD y PG que la cantidad de proteína solubilizada después de la incubación con PAD o PG sola.

10 Tabla 3. Solubilización de proteína de guisante, soja y arroz después de incubación con PAD, PG y una combinación de PAD + PG a pH de 6,5 y 40 °C durante 4 h

Sustrato proteico	% de proteína solubilizada a pH de 6,5			
	control	PAD	PG	PAD + PG
Guisante	20	31	36	43
Soja	12	14	18	21
Arroz	0,8	1	1,3	1,5

15 **Ejemplo 4.** Dependencia del pH de la solubilidad de las proteínas de guisante tratadas con peptidil arginina deiminasa

Se trató un material de proteína de guisante al 15% p/p con proteína enzimática PAD al 0,1% p/p a pH 6,5 y 40 °C durante 16 h. La enzima se inactivó mediante choque térmico a 85 °C durante 15 minutos y el material de proteína se liofilizó. Una solución al 1% p/p de proteína de guisante tratada con enzima tal como se ha descrito anteriormente se preparó en agua a diferentes valores de pH que varían de pH 8 a pH 3.

20 El pH se ajustó en etapas hasta pH 8 con la adición de hidróxido de sodio 4 N y después hasta pH 3 mediante la adición de ácido sulfúrico 4 N. En cada etapa del ajuste de pH, se tomó una parte alícuota, se mezcló durante otras 2 horas a temperatura ambiente y después se centrifugó durante 5 minutos a 20.000 g. La proteína presente en el sobrenadante se precipitó después con ácido tricloroacético y la proteína se cuantificó mediante el procedimiento de Biuret. La figura 2 muestra que a un pH de entre 5 y 8 la peptidil arginina deiminasa fue capaz de aumentar la solubilidad de la proteína de guisante en aproximadamente del 2 al 10%.

25 **Ejemplo 5.** Capacidad de formación de espuma de una solución que contiene proteína de guisante tratada con peptidil arginina deiminasa y una combinación de peptidil arginina deiminasa y proteína glutaminasa

30 Se suspendió proteína de guisante (Pisane C9, Cosucra) en agua al 15% p/p de materia seca y se incubó a pH 6,5 y a 40 °C durante 16 h, con enzimas (0,1% v/p) PAD, PG o PAD y PG tal como se ha descrito en el ejemplo 4. Las suspensiones de proteína se liofilizaron y el contenido de proteína en la materia seca se midió mediante análisis de Kjeldahl.

35 Se realizaron experimentos de formación de espuma en una solución proteica al 3% p/p de proteína de guisante tratada con enzimas. Los experimentos de formación de espuma se realizaron a una escala de 10 ml a 22 °C y pH 6,5.

40 La solución de proteína de guisante al 3% en peso/peso de 10 ml se mezcló con un Multimixer en un cilindro de medición de 50 ml durante 60 segundos. El volumen de espuma se midió después de 0 y 30 minutos. La capacidad de formación espuma se calculó de la forma siguiente:

45
$$\text{Capacidad de formación de espuma (FC)} = (\text{Volumen de espuma a } T=0 / \text{volumen de líquido inicial}) \times 100\%$$

La figura 3 muestra que la capacidad de formación espuma de la proteína de guisante tratada con PAD, PG y PAD y PG se redujo en comparación con la capacidad de formación de espuma de la proteína de guisante no tratada.

Listado de secuencias

50 <110> DSM IP Assets B.V.

<120> USO DE ENZIMA PARA MEJORAR UNA PROPIEDAD FÍSICA DE UNA PROTEÍNA

55 <130> 31264-WO-PCT

<160> 3

ES 2 811 270 T3

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1

<211> 640

<212> PRT

<213> Fusarium graminearum

<400> 1

Met His Leu Leu Asn Gly Lys Thr Ala Ala Val Ala Leu Ala Leu Leu
1 5 10 15
Asn Ser Cys Asn Ala Leu Lys Val Thr Ile Leu Ala Asp Thr Asn Arg
20 25 30
Asp Gly Lys Val Asp Asn Asn Asp Ile Asn Gly Lys Ser Thr Trp Thr
35 40 45
Asn Asn Arg Gly Ala Leu Ile Leu Pro Asn Ile Gly Asp Thr Gly Ser
50 55 60
Arg Cys Ala Lys Gln Trp Gly Pro Ser Val Asp Ile Gln Gly Asp Glu
65 70 75 80
Ser Tyr Leu Asp Lys Cys Asn Asp Ala Ser Asp Asn Val Gln Arg Asn
85 90 95
Pro Lys Tyr Leu Ala Ser Leu Lys Thr Leu Pro Leu Thr Thr Leu Ser
100 105 110
Ala Thr Ala Lys Gly Ser Ile Ile Ile Ala Asp Lys Thr Gly Ala Ser
115 120 125
Lys Val Arg Ile Phe Val Lys Gln Ser Gly Lys Trp Asn Tyr Val Ala
130 135 140
Ala Asp His Val Phe Thr Ala Lys Glu Leu Lys Ser Gly Leu Glu Leu
145 150 155 160
Gly Val Asp Ala Arg Asp Val Arg Arg Pro Gln Asp Trp Asn Gly Tyr
165 170 175
Ala Lys Ile Gln Phe Thr Val Thr Asp Gly Lys Thr Lys Ala Thr Asp
180 185 190
Ala Val Ala Val Arg Val Ala Pro Val Leu Thr His His His Gly Gln
195 200 205
His Ala Gln Arg Ile Phe Thr Thr Gly Val Asn Glu Ala Gly Val Asn
210 215 220
Lys Val Gln Glu Thr Phe Ile Ala Asp Ile Leu Arg Asn Val Ala Gly
225 230 235 240
Ala Gly Ile Lys Glu Pro Val Phe Gln Phe His Asn Gln Asp Ile Trp
245 250 255
Thr Gln Asp Phe Phe Glu Pro Gly Tyr Ala Ser Ile Pro Gly Pro Asn
260 265 270
Gly Pro Val Ser Ile Arg Ile Met Ile Arg Ser Ala Gln Ser Ser Arg
275 280 285
Arg Ser Gly Arg Asp Ala Phe His Asp Leu Arg Asn Asp Gln Val Gly
290 295 300
Ala Val Gln His Pro Gly Asp Gly Asp Ser Ile Asp Ser Thr Gly Asn
305 310 315 320
Leu Glu Thr Ile Pro Pro Tyr Ser His Asn Gly Lys Ser Phe Pro Val
325 330 335
Gly Arg Thr Ile Met Gly Ala Trp Asp Gly Arg Ala Pro Leu Met Val
340 345 350

5

10

ES 2 811 270 T3

Glu Phe Leu Lys Ala Gln Gln Val Gln Glu Pro Leu Ile Leu Asp Thr
 355 360 365
 Ser Trp Leu Tyr Val Gly His Val Asp Glu Phe Ile Gln Phe Leu Pro
 370 375 380
 Ser Asn Asn Lys Leu Gly Trp Val Ile Met Val Ala Asp Pro Met Lys
 385 390 395 400
 Gly Val Asp Leu Leu Lys Lys Ala Val Lys Thr Gly His Gly Lys Val
 405 410 415
 Lys Ala Val Ser Arg Pro Leu Ser Ala Asp Glu Lys Lys Glu Gln Leu
 420 425 430
 Cys Leu Pro Arg Gln Thr Ile Ala Glu Ala Leu Lys Phe Lys Ser Phe
 435 440 445
 Asp Ala Ile Asn Lys His Ser Ala Glu Arg Ile Gln Ala Asn Leu Asp
 450 455 460
 Ile Ile Lys Arg Glu Thr Gly Ile Thr Asp Glu Asp Ile His Arg Val
 465 470 475 480
 Pro Ala Leu Phe Tyr Tyr Thr Gln Ser Asn Ser Trp Leu Cys Pro Gly
 485 490 495
 Glu Thr Ala Glu Asp Asp Ser Ala Gln Pro Gln Lys Ala Ala Ser Asn
 500 505 510
 Ser Gly Ile Thr Met Lys Thr Ser Gln Gly Gly Pro Gly Phe Lys Ala
 515 520 525
 Lys Ser Ile Val Glu Ala Ala Thr Pro Gly Lys Ser Ile Gln Arg Arg
 530 535 540
 Val Ile Asp Pro Ala Thr Gln Val Thr Ala Leu Tyr Pro Gly Ser Val
 545 550 555 560
 Asn Gly Leu Val Met Thr Asp Thr Lys Ile Leu Ala Pro Ser Pro Trp
 565 570 575
 Gly Pro Val Ile Asn Lys Gln Asp Ile Phe Ala Ala Val Ser Gln
 580 585 590
 Val Tyr Thr Asn Ala Gly Tyr Asn Val Thr Tyr Gln Asp Asp Trp Phe
 595 600 605
 Ser His Phe Lys Leu Gln Gly Asp Val His Cys Gly Ser Asn Ser Trp
 610 615 620
 Arg Glu Ile Pro Lys Lys Trp Trp Asp Ser Leu Arg Val Asn Asn Tyr
 625 630 635 640

<210> 2
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> Chryseobacterium proteolyticum

5

<220>
 <223> cepa 9670

10

<400> 2

Met Lys Asn Leu Phe Leu Ser Met Met Ala Phe Val Thr Val Leu Thr
 1 5 10 15
 Phe Asn Ser Cys Ala Asp Ser Asn Gly Asn Gln Glu Ile Asn Gly Lys
 20 25 30
 Glu Lys Leu Ser Val Asn Asp Ser Lys Leu Lys Asp Phe Gly Lys Thr
 35 40 45
 Val Pro Val Gly Ile Asp Glu Glu Asn Gly Met Ile Lys Val Ser Phe
 50 55 60
 Met Leu Thr Ala Gln Phe Tyr Glu Ile Lys Pro Thr Lys Glu Asn Glu
 65 70 75 80
 Gln Tyr Ile Gly Met Leu Arg Gln Ala Val Lys Asn Glu Ser Pro Val
 85 90 95
 His Ile Phe Leu Lys Pro Asn Ser Asn Glu Ile Gly Lys Val Glu Ser
 100 105 110
 Ala Ser Pro Glu Asp Val Arg Tyr Phe Lys Thr Ile Leu Thr Lys Glu

ES 2 811 270 T3

```

      115                120                125
Val Lys Gly Gln Thr Asn Lys Leu Ala Ser Val Ile Pro Asp Val Ala
  130                135                140
Thr Leu Asn Ser Leu Phe Asn Gln Ile Lys Asn Gln Ser Cys Gly Thr
  145                150                155                160
Ser Thr Ala Ser Ser Pro Cys Ile Thr Phe Arg Tyr Pro Val Asp Gly
      165                170                175
Cys Tyr Ala Arg Ala His Lys Met Arg Gln Ile Leu Met Asn Asn Gly
      180                185                190
Tyr Asp Cys Glu Lys Gln Phe Val Tyr Gly Asn Leu Lys Ala Ser Thr
      195                200                205
Gly Thr Cys Cys Val Ala Trp Ser Tyr His Val Ala Ile Leu Val Ser
  210                215                220
Tyr Lys Asn Ala Ser Gly Val Thr Glu Lys Arg Ile Ile Asp Pro Ser
  225                230                235                240
Leu Phe Ser Ser Gly Pro Val Thr Asp Thr Ala Trp Arg Asn Ala Cys
      245                250                255
Val Asn Thr Ser Cys Gly Ser Ala Ser Val Ser Ser Tyr Ala Asn Thr
      260                265                270
Ala Gly Asn Val Tyr Tyr Arg Ser Pro Ser Asn Ser Tyr Leu Tyr Asp
      275                280                285
Asn Asn Leu Ile Asn Thr Asn Cys Val Leu Thr Lys Phe Ser Leu Leu
      290                295                300
Ser Gly Cys Ser Pro Ser Pro Ala Pro Asp Val Ser Ser Cys Gly Phe
  305                310                315                320

```

<210> 3

<211> 1000

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<222> 1..1000

<223> /organismo = "Secuencia artificial"

/nota = "Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína glutaminasa a partir de la cepa 9670 de Chryseobacterium proteolyticum con un sitio de restricción PacI y un sitio de unión a ribosoma en el extremo 5'222, y un doble codón de detención y un sitio de restricción PmeI en el extremo 3'222"

/tipo de molécula =" ADN no asignado"

<400> 3

```

ttaattaa aaggagc gat ttacatatg aaaaatctttt ttatcaatg atggcctttg      60
tgaccgtctt aacttttaaat tcctgtgccc attccaacgg gaatcaggaa atcaacggaa      120
aggaaaaact aagtgtaaat gattctaagc tgaaagattt cggaaagact gtaccggtag      180
ggatagacga agaaaacgga atgataaagg tgtcatttat gttaactgcg caattctatg      240
aaattaagcc gaccaaagaa aatgagcagt atatcggaat gcttagacag gctgttaaga      300
atgaatctcc tgtacacatt ttcttaaagc ctaatagcaa tgaaatagga aaagtggagt      360
ctgcaagtcc ggaagacgta agatatttta aaacgatcct gacaaaagaa gtaaaagggc      420
aaaccaataa attggcgagt gtaattcctg atgtagctac attaaattct ttattcaatc      480
aaataaagaa tcagtcttgc ggtacctcta cggcgtcctc accatgcatc acattcagat      540
atcctgtaga cggatggtat gcaagagccc ataagatgag acaaatctta atgaacaacg      600

```

ES 2 811 270 T3

-

gctatgactg tgaaaaacaa tttgtatagc gaaacctaaa ggcatacaaca ggaacttgct	660
gtgtggcgtg gagctaccac gttgcaatat tggtaagcta taaaaatgct tccggagtaa	720
cggaaaaaag aattattgat ccttcactat tttcaagcgg tcctgtaaca gatacagcat	780
ggagaaacgc ttgcgttaac acctcttgcg gatctgcatac cgtttcctct tatgctaata	840
ctgcaggaaa tgtttattac agaagtccta gtaattctta cctgtatgac aacaatctga	900
tcaataccaa ctgtgtactg actaaatfff cactgctttc cggatggttct ccttcacctg	960
caccggatgt atccagctgt ggattttaat aagtttaaac	1000

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de peptidil arginina deiminasa (EC 3.5.3.15) para mejorar la solubilidad de una proteína vegetal a un pH de entre 5 y 8,5, en el que la proteína vegetal es guisante, soja o cereal.
2. Uso según la reivindicación 1, que comprende además el uso de una proteína glutaminasa (EC 3.5.1.44).
- 10 3. Un proceso para mejorar la solubilidad de una proteína vegetal que comprende incubar la proteína vegetal con una peptidil arginina deiminasa a un pH de entre 4 y 9, en el que la proteína vegetal muestra una solubilidad mejorada a un pH de entre 5 y 8,5, siendo la proteína vegetal proteína de guisante, de soja o de cereal.
4. Un proceso según la reivindicación 3, en el que la proteína vegetal se incuba adicionalmente con una proteína glutaminasa (EC 3.5.1.44).
- 15 5. Uso según la reivindicación 1 o 2 o proceso según la reivindicación 3 o 4, comprendiendo también el uso o el proceso reducir la capacidad de formación de espuma de la proteína.
- 20 6. Uso según las reivindicaciones 1, 2 o 5 o un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en los que que la solubilidad de la proteína se aumenta en al menos un 2%.
7. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6 o un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en los que la proteína de cereal es gluten.
- 25 8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 o 6 o 7 o un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en los que la proteína vegetal es una solución que comprende proteína vegetal.
9. Uso o proceso según la reivindicación 8, en los que la solución es una bebida.
- 30 10. Uso o proceso según la reivindicación 9, en los que la bebida es leche derivada de una fuente vegetal.
11. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 5 a 10 o un proceso según una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 10, en los que la peptidil arginina deiminasa tiene al menos el 80% de identidad con la SEQ ID NO: 1, o con la secuencia de aminoácidos madura de la SEQ ID NO: 1.

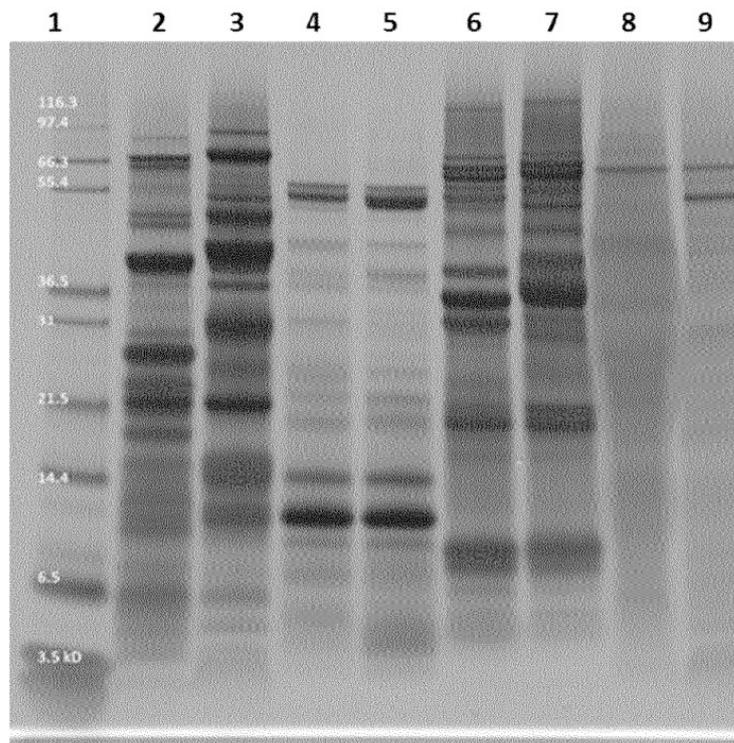


Fig.1

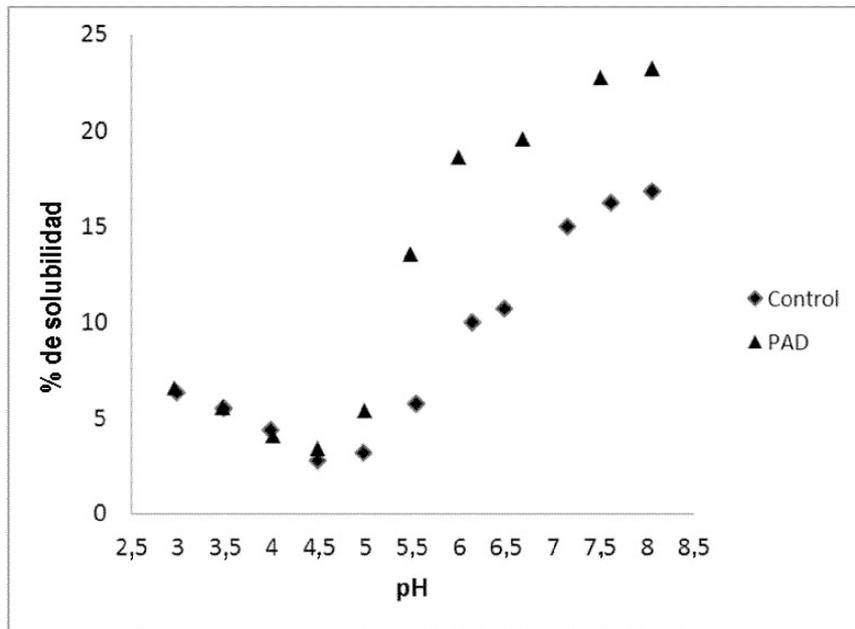


Fig. 2

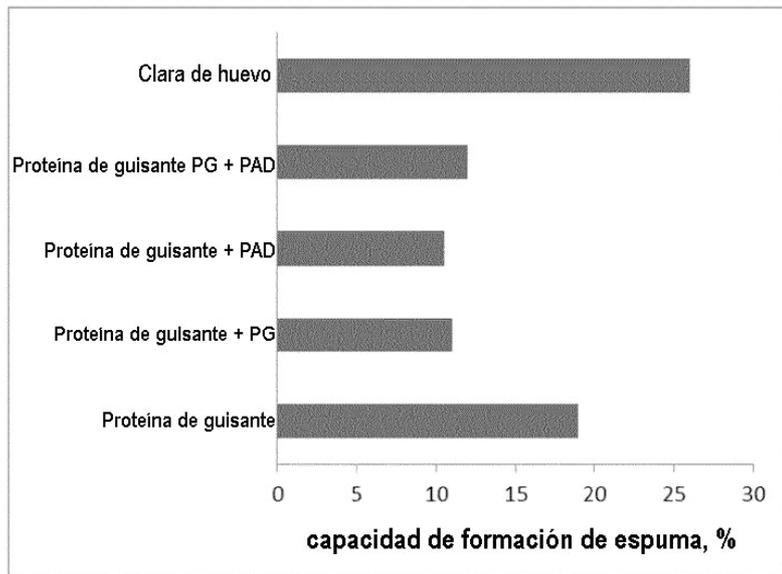


Fig. 3