

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 327**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/20** (2006.01)

**C12N 15/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2007 PCT/US2007/060825**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2007 WO07087503**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2007 E 07717338 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 1979476**

54 Título: **Polipéptidos con actividad de lipasa y polinucleótidos que codifican los mismos**

30 Prioridad:

**23.01.2006 US 761106 P**

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

**14.02.2017**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (50.0%)  
KROGSHÖJVEJ 36  
2880 BAGSVAERD, DK y  
NOVOZYMES, INC (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VIND, JESPER;  
BORCH, KIM;  
MIKKELSEN, MIKAEL y  
KNOTZEL, JURGEN CARSTEN FRANZ**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 601 327 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**

Polipéptidos con actividad de lipasa y polinucleótidos que codifican los mismos

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad de lipasa y polinucleótidos que codifican los mismos.

10 Antecedentes de la invención

[0002] Las lipasas son útiles, por ejemplo, como enzimas de detergente para eliminar manchas de lípidos o grasas de telas y otros tejidos, como aditivos para masa de pan y otros productos de panadería y pastelería.

15 De este modo, una lipasa obtenida de *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo de *Humicola lanuginosa*, EP258068 y EP305216) se vende para usarse como detergente bajo el nombre comercial Lipolasa® (producto de Novo Nordisk A/S).

WO 0060063 describe variantes de la lipasa de *T. lanuginosus* con un rendimiento de primer lavado particularmente bueno en una solución detergente.

WO9704079, WO9707202 y WO0032758 también describen variantes de la lipasa de *T. lanuginosus*.

20 WO02062973 describe la lipasa de *T. lanuginosus* con una extensión C-terminal con tendencia reducida a formar olor.

Resumen de la invención

25 [0003] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados con actividad de lipasa que comprenden mutaciones en la parte madura de la SEC ID N° 2 seleccionadas de entre: (a) I202G +T231R +N233R; (b) I86V +L227G +T231R +N233R +P256K; (c) Q4V +S58N +V60S +T231R +N233R; (d) S58N +V60S +I90R +T231 R +N233R; (e) I255Y +T231 R +N233R; o (f) I90A +T231 R +N233R +I255V.

30 [0004] La presente invención también se refiere a variantes de lipasa con potencial reducido para la generación de olores y a un método para prepararlas.

Particularmente se refiere a variantes de la lipasa de *Thermomyces lanuginosus* que tienen preferencia por cadenas largas de ácidos grasos mientras que al mismo tiempo tienen un buen rendimiento relativo.

35 [0005] En otro aspecto, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, un constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido, un vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos y una célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos.

40 [0006] La presente invención también se refiere a un método para producir las lipasas de la invención.

Listado de secuencias

[0007]

45 La SEC ID N° 1 muestra la secuencia de ADN que codifica la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*.  
La SEC ID N° 2 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Thermomyces lanuginosus*.  
Las SEC ID N° 3 a SEC ID N° 16 muestran secuencias para el alineamiento en la figura 1  
La SEC ID N° 17 y la SEC ID N° 18 muestran secuencias usadas como ejemplo de alineamiento.

50 Definiciones

[0008] Actividad de lipasa: el término "actividad de lipasa" se define en este documento como una actividad de hidrolasa de éster carboxílico que cataliza la hidrólisis de triacilglicerol bajo la formación de diacilglicerol y un carboxilato.

55 Para los fines de la presente invención, la actividad de lipasa se determina según el procedimiento descrito en "Actividad de lipasa" dentro de "Materiales y métodos". Una unidad de actividad de lipasa se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 10 µmoles de ácido butírico por minuto a 30°C y pH 7.

60 [0009] Los polipéptidos de la presente invención tienen al menos un 70 %, por ejemplo, al menos un 75 % o un 80 % o un 85 % o un 90 %, más preferiblemente al menos un 95 %, incluso más preferiblemente un 96 % o un 97 %, de la forma más preferible un 98 % o un 99 %, e incluso de la forma más preferible al menos un 100 % de la actividad de lipasa medida como rendimiento relativo del polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada como el polipéptido maduro de la SEC ID N° 2, con las sustituciones T231 R + N233R.

65 [0010] Polipéptido aislado: el término "polipéptido aislado" tal como se usa en este documento se refiere a un polipéptido que es al menos un 20 % puro, preferiblemente al menos un 40 % puro, más preferiblemente al menos

un 60 % puro, incluso más preferiblemente al menos un 80 % puro, de la forma más preferible al menos un 90 % puro, e incluso de la forma más preferible al menos un 95 % puro, según se determina mediante SDS-PAGE.

[0011] Polipéptido sustancialmente puro: el término "polipéptido sustancialmente puro" denota en este documento un preparado polipeptídico que contiene como mucho un 10 %, preferiblemente como mucho un 8 %, más preferiblemente como mucho un 6 %, más preferiblemente como mucho un 5 %, más preferiblemente como mucho un 4 %, como mucho un 3 %, incluso más preferiblemente como mucho un 2 %, de la forma más preferible como mucho un 1 %, e incluso de la forma más preferible como mucho un 0,5 % en peso de otro material polipeptídico con el cual está originalmente asociado.

Se prefiere, por lo tanto, que el polipéptido sustancialmente puro sea al menos un 92 % puro, preferiblemente al menos un 94 % puro, más preferiblemente al menos un 95 % puro, más preferiblemente al menos un 96 % puro, más preferiblemente al menos un 96 % puro, más preferiblemente al menos un 97 % puro, más preferiblemente al menos un 98 % puro, incluso más preferiblemente al menos un 99 %, de la forma más preferible al menos un 99,5 % puro, e incluso de la forma más preferible un 100 % puro en peso del material polipeptídico total presente en el preparado.

Los polipéptidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura.

En particular, se prefiere que los polipéptidos estén en "forma esencialmente pura", es decir, que el preparado polipeptídico esté esencialmente libre de otro material polipeptídico con el cual esté originalmente asociado.

Esto se puede lograr, por ejemplo, preparando el polipéptido mediante métodos recombinantes bien conocidos o por métodos tradicionales de purificación.

[0012] En este documento, el término "polipéptido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "polipéptido aislado" y "polipéptido en forma aislada".

[0013] Identidad: la relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro "identidad".

[0014] Para los fines de la presente invención, el alineamiento de dos secuencias de aminoácidos se determina usando el programa de Needle del paquete EMBOSS (<http://emboss.org>) versión 2.8.0.

El programa Needle implementa el algoritmo de alineamiento global descrito en Needleman, S. B. y Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48,443-453.

La matriz de sustitución usada es BLOSUM62, la penalización de abertura de gap es 10 y la penalización de extensión de gap es 0,5.

[0015] El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la presente invención ("secuencia de la invención", por ejemplo, los aminoácidos 1 a 269 de la SEC ID N° 2) y una secuencia de aminoácidos diferente ("secuencia extranjera") se calcula como el número exacto de coincidencias en un alineamiento de las dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de la invención" o la longitud de la "secuencia extranjera", la que sea más corta.

El resultado se expresa en porcentaje de identidad.

[0016] Una correspondencia exacta ocurre cuando la "secuencia de la invención" y la "secuencia extranjera" tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones del solapamiento (en el siguiente ejemplo de alineamiento esto se representa mediante "|"). La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (por ejemplo, la longitud de la SEC ID N° 2 es 269).

[0017] En el siguiente ejemplo de alineamiento, el solapamiento es la secuencia de aminoácidos "HTWGER-NL" de la Secuencia A; o la secuencia de aminoácidos "HGWGEDANL" de la Secuencia B. En el ejemplo un gap se indica mediante un "-".

Ejemplo de alineamiento

[0018]

Secuencia A: ACMSHTWGER-NL

Secuencia B:     | | | |   | |  
                  HGWGEDANLAMNPS

[0019] Fragmento de polipéptido: el término "fragmento de polipéptido" se define en este documento como un polipéptido que tiene uno o más aminoácidos eliminados del amino-terminal y/o del carboxilo-terminal de la SEC ID N° 2 o una secuencia homóloga a la misma, donde el fragmento tiene actividad de lipasa.

[0020] Subsecuencia: el término "subsecuencia" se define en este documento como una secuencia de nucleótidos que tiene uno o varios nucleótidos eliminados de los extremos 3' y/o 5' de la SEC ID N° 1 o una secuencia homóloga a la misma, donde la subsecuencia codifica un fragmento de polipéptido que tiene actividad de lipasa.

[0021] Variante alélica: el término "variante alélica" denota en este documento cualquiera de entre dos o más formas

alternativas de un gen que ocupan el mismo locus cromosómico.

La variante alélica surge naturalmente a través de mutaciones y puede dar lugar al polimorfismo dentro de las poblaciones.

Las mutaciones genéticas pueden ser silenciosas (sin cambios en el polipéptido codificado) o pueden codificar polipéptidos que tengan secuencias alteradas de aminoácidos.

Una variante alélica de un polipéptido es un polipéptido codificado por una variante alélica de un gen.

[0022] Polinucleótido sustancialmente puro: el término "polinucleótido sustancialmente puro" tal y como usa en este documento se refiere un preparado de polinucleótidos libre de otros nucleótidos extraños o no deseados y en una forma adecuada para su uso dentro de sistemas de producción de proteínas genéticamente modificadas.

Así, un polinucleótido sustancialmente puro contiene como mucho un 10 %, preferiblemente como mucho un 8 %, más preferiblemente como mucho un 6 %, más preferiblemente como mucho un 5 %, más preferiblemente como mucho un 4 %, más preferiblemente como mucho un 3 %, incluso más preferiblemente como mucho un 2 %, de la forma más preferible como mucho un 1 %, e incluso de la forma más preferible como mucho un 0,5 % en peso de otro material de polinucleótidos con el cual está originalmente asociado.

Un polinucleótido sustancialmente puro puede, sin embargo, incluir regiones no traducidas 5' y 3' de origen natural, tales como promotores y terminadores.

Se prefiere que el polinucleótido sustancialmente puro sea al menos un 90 % puro, preferiblemente al menos un 92 % puro, más preferiblemente al menos un 94 % puro, más preferiblemente al menos un 95 % puro, más preferiblemente al menos un 96 % puro, más preferiblemente al menos un 97 % puro, incluso más preferiblemente al menos un 98 % puro, de la forma más preferible al menos un 99 %, e incluso de la forma más preferible al menos un 99,5 % puro en peso.

Los polinucleótidos de la presente invención están preferiblemente en una forma sustancialmente pura.

En particular, se prefiere que los polinucleótidos que se describen en este documento estén en "forma esencialmente pura", es decir, que el preparado de polinucleótidos esté esencialmente libre de otro material de polinucleótidos con el cual esté originalmente asociado.

En este documento, el término "polinucleótido sustancialmente puro" es sinónimo de los términos "polinucleótido aislado" y "polinucleótido en forma aislada" los polinucleótidos pueden ser de origen genómico, de ADNc, de ARN, semisintético, sintético o cualquier combinación de los mismos.

[0023] ADNc: el término "ADNc" se define en este documento como una molécula de ADN que se puede preparar mediante transcripción inversa de una molécula de ARNm maduro empalmado, obtenido a partir de una célula eucariota. El ADNc carece de secuencias de intrones que están normalmente presentes en el ADN genómico correspondiente. El transcrito primario inicial de ARN es un precursor del ARNm que se procesa a través de una serie de pasos antes de aparecer como ARNm maduro empalmado. Estos pasos incluyen la eliminación de secuencias de intrones mediante un proceso llamado empalme. El ADNc obtenido a partir del ARNm carece, por lo tanto, de cualquier secuencia de intrones.

[0024] Constructo de ácidos nucleicos: el término "constructo de ácidos nucleicos" tal y como se utiliza en este documento se refiere a una molécula de ácidos nucleicos, tanto monocatenarios como bicatenarios, que se aísla a partir de un gen de origen natural o que se modifica para contener segmentos de ácidos nucleicos de manera que de otro modo no existirían en la naturaleza.

El término constructo de ácidos nucleicos es sinónimo del término "casete de expresión" cuando el constructo de ácidos nucleicos contiene las secuencias de control requeridas para la expresión de una secuencia codificante de la presente invención.

[0025] Secuencia de control: el término "secuencias de control" se define en este documento de manera que incluya todos los componentes que sean necesarios o beneficiosos para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención.

Cada secuencia de control puede ser nativa o extranjera a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

Tales secuencias de control incluyen, pero no se limitan a, un líder, una secuencia de poliadenilación, una secuencia de propéptido, un promotor, una secuencia de péptido señal y un terminador de transcripción.

Como mínimo, las secuencias de control incluyen un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional.

Se pueden proporcionar enlazadores a las secuencias de control con el fin de introducir sitios de restricción específicos que faciliten la unión de las secuencias de control con la región codificante de la secuencia de ácidos nucleicos que codifica un polipéptido.

[0026] Operativamente enlazado: el término "operativamente enlazado" denota en este documento una configuración en la que una secuencia de control se coloca apropiadamente en una posición relativa a la secuencia codificante de la secuencia de polinucleótidos de manera que la secuencia de control dirige la expresión de la secuencia codificante de un polipéptido.

[0027] Secuencia codificante: cuando se usa en este documento, el término "secuencia codificante" significa una secuencia de nucleótidos, que especifica directamente la secuencia de aminoácidos de su producto proteínico.

Los límites de la secuencia codificante están generalmente determinados por un marco de lectura abierto, que empieza normalmente con el codón de inicio ATG o codones de inicio alternativos tales como GTG y TTG. La

secuencia codificante puede ser ADN, ADNc o una secuencia recombinante de nucleótidos.

[0028] Expresión: el término "expresión" incluye cualquier paso implicado en la producción del polipéptido incluyendo, pero sin limitarse a, transcripción, modificación postranscripcional, traducción, modificación postraduccional y secreción.

[0029] Vector de expresión: el término "vector de expresión" se define en este documento como una molécula lineal o circular de ADN que comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención y que está operativamente enlazada a nucleótidos adicionales que se encargan de su expresión.

[0030] Célula huésped: el término "célula huésped", tal como se utiliza en este documento, incluye cualquier tipo de célula susceptible a transformación, transfección, transducción y similares con un constructo de ácidos nucleicos que comprende un polinucleótido de la presente invención.

[0031] Modificación: el término "modificación" significa en este documento cualquier modificación química del polipéptido que consiste en el polipéptido maduro de la SEC ID N° 2, así como la manipulación genética del ADN que codifica dicho polipéptido.

La(s) modificación(es) puede(en) ser sustitución(es), deleción(es) y/o inserción(es) de aminoácidos, así como sustitución(es) de cadena(s) lateral(es) de aminoácidos.

[0032] Variante artificial: cuando se usa en este documento, el término "variante artificial" significa un polipéptido con actividad de lipasa producido por un organismo que expresa una secuencia de nucleótidos modificada de la SEC ID N° 1. La secuencia de nucleótidos modificada se obtiene a través de intervención humana modificando la secuencia de nucleótidos descrita en la SEC ID N° 1.

[0033] Rendimiento relativo (RR): el término rendimiento relativo refleja el rendimiento de la variante enzimática comparada con una enzima de referencia cuando se mide como el brillo del color de las muestras de tejido lavadas con esa variante enzimática específica.

[0034] Factor riesgo-beneficio (RB): el factor riesgo-beneficio describe el rendimiento de lavado comparado con el riesgo de malos olores cuando se retira el sustrato.

Convenciones para la designación de variantes:

[0035] Al describir variantes de lipasa según la invención, la nomenclatura siguiente se usa para facilitar la referencia:

Aminoácido(s) original(es):posición(es):aminoácido(s) sustituido(s)

[0036] Según esta nomenclatura, por ejemplo, la sustitución de ácido glutámico por glicina en la posición 195 se muestra como G195E. Una deleción de glicina en la misma posición se muestra como G195\*, y la inserción de un residuo de aminoácido adicional tal como la lisina se muestra como G195GK.

[0037] Si una lipasa específica contiene una "deleción" en una posición determinada en comparación con otras lipasas y se realiza una inserción en dicha posición, esto se indica como \*36D para la inserción de un ácido aspártico en la posición 36.

[0038] Las mutaciones múltiples se separan por sumas, es decir: R170Y+G195E, que representa mutaciones en las posiciones 170 y 195 que sustituyen tirosina y ácido glutámico por arginina y glicina, respectivamente.

[0039] X231 indica el aminoácido en un polipéptido original que corresponde a la posición 231, cuando se aplica el procedimiento de alineamiento descrito.

X231R indica que el aminoácido se sustituye con R. Para la SEC ID N° 2 X es T, y T231R indica, de este modo, una sustitución de T en la posición 231 por R. Una sustitución de un aminoácido en una determinada posición (por ejemplo 231) por otro aminoácido seleccionado de un grupo de aminoácidos, por ejemplo, el grupo que consiste en R y P e Y, se indicará mediante X231 R/P/Y.

[0040] En todos los casos, se emplea la abreviatura de aminoácidos de letra única o letra triple aceptada por la IUPAC.

Descripción detallada de la invención

Polipéptidos que tienen actividad de lipasa

[0041] La presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de lipasa seleccionados del grupo que consiste en lipasas con un RR de al menos 0,8 y un RB de al menos 1,1 en las condiciones de prueba dadas en la especificación.

[0042] En una realización preferida la lipasa tiene un RR de al menos 0,9, como, por ejemplo, 1,0 o 1,1.  
En una realización incluso más preferida la lipasa tiene un RR de al menos 1,2, como, por ejemplo, 1,3 o incluso 1,4.

5 [0043] En otra realización preferida la lipasa tiene un RB de al menos 1,2, como, por ejemplo, 1,3 o incluso 1,4.  
En una realización incluso más preferida la lipasa tiene un RB de al menos 1,5, como, por ejemplo, 1,6 o incluso 1,7.

[0044] En otro aspecto la lipasa de la presente invención tiene además una UL/A280 relativa menor que 1, como, por ejemplo, menor que 0,95 en las condiciones de prueba dadas en la especificación.

10 En una realización preferida la UL/A280 relativa es menor que 0,90, por ejemplo, menor que 0,85 o incluso menor que 0,80.

[0045] En otro aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o que está compuesta por la SEC ID N° 2 o una variante alélica de la misma, y que además tiene un RB de al menos 1,1 y un RR de al menos 0,8.

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende o que está compuesta por la parte madura de la SEC ID N° 2, o una variante alélica de la misma, y que además tiene un RB de al menos 1,1 y un RR de al menos 0,8

[0046] Incluso en otro aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen una secuencia de aminoácidos con un grado de identidad con el polipéptido maduro de la SEC ID N° 2 (es decir, el polipéptido maduro) de al menos un 80 %, tal como de al menos un 85 % o un 90 %, o de al menos un 95 %, preferiblemente de al menos un 97 %, de la forma más preferible de al menos un 98 %, e incluso de la forma más preferible de al menos un 99 %, que tiene actividad de lipasa (de ahora en adelante "polipéptidos homólogos"). En un aspecto preferido, los polipéptidos homólogos tienen una secuencia de aminoácidos que difiere en diez aminoácidos, en nueve aminoácidos, en ocho aminoácidos, en siete aminoácidos, en seis aminoácidos, preferiblemente en cinco aminoácidos, más preferiblemente en cuatro aminoácidos, incluso más preferiblemente en tres aminoácidos, de la forma más preferible en dos aminoácidos, e incluso de la forma más preferible en un aminoácido del polipéptido maduro de la SEC ID N° 2.

20 [0047] En otro aspecto, la presente invención se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de lipasa codificados por polinucleótidos que se hibridan bajo condiciones de astringencia muy bajas, preferiblemente condiciones de astringencia bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia medias, más preferiblemente condiciones de astringencia medias-altas, incluso más preferiblemente condiciones de astringencia altas, y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con (i) los nucleótidos 644 a 732 de la SEC ID N° 1; (ii) la secuencia de ADNc contenida en los nucleótidos 644 a 732 de la SEC ID N° 1; (iii) una subsecuencia de (i) o (ii); o (iv) una cadena complementaria de (i), (ii) o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, y T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York).

25 Una subsecuencia de la SEC ID N° 1 contiene como mínimo 100 nucleótidos contiguos o preferiblemente al menos 200 nucleótidos contiguos.  
Además, la subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido que tiene actividad de lipasa.

[0048] La secuencia de nucleótidos de la SEC ID N° 1 o una subsecuencia de la misma, así como la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 o un fragmento de la misma, se pueden utilizar para diseñar una sonda de ácidos nucleicos para identificar y clonar ADN que codifica polipéptidos que tienen actividad de lipasa de cepas de diferentes géneros o especies según métodos bien conocido en la técnica. En particular, tales sondas se pueden usar para la hibridación con el ADN genómico o el ADNc del género o especie de interés, siguiendo procedimientos estándar de Southern blot, para identificar y aislar el correspondiente gen en ellas.

30 Tales sondas pueden ser considerablemente más cortas que la secuencia entera, pero deberían ser al menos de 14, preferiblemente al menos de 25, más preferiblemente al menos de 35, y de la forma más preferible al menos de 70 nucleótidos de longitud.

Se prefiere, sin embargo, que la sonda de ácidos nucleicos sea al menos de 100 nucleótidos de longitud.

35 Por ejemplo, la sonda de ácidos nucleicos puede ser al menos de 200 nucleótidos, preferiblemente al menos de 300 nucleótidos, más preferiblemente al menos de 400 nucleótidos, o de la forma más preferible al menos de 500 nucleótidos de longitud.

Se pueden utilizar sondas incluso más largas, por ejemplo, sondas de ácidos nucleicos que son al menos de 600 nucleótidos, preferiblemente al menos de 700 nucleótidos, o más preferiblemente al menos de 800 nucleótidos de longitud.

Se pueden usar sondas tanto de ADN como de ARN.

40 Las sondas típicamente se marcan para detectar el gen correspondiente (por ejemplo, con <sup>32</sup>P, <sup>3</sup>H, <sup>35</sup>S, biotina o avidina).

Tales sondas están incluidas en la presente invención.

[0049] Una genoteca de ADN genómico o de ADNc preparada a partir de dichos otros organismos puede, por lo tanto, seleccionarse para ADN que se hibrida con las sondas anteriormente descritas y que codifica un polipéptido con actividad de lipasa.

65

El ADN genómico o de otro tipo de dichos otros organismos se puede separar mediante electroforesis en gel de poliacrilamida o de agarosa, u otras técnicas de separación.

El ADN de las genotecas o el ADN separado se pueden transferir e inmovilizar en nitrocelulosa u otro material portador adecuado.

5 Para identificar un clon o un ADN que sea homólogo a la SEC ID N° 1 o una subsecuencia de la misma, el material portador se usa en un Southern blot.

[0050] Para los fines de la presente invención, la hibridación indica que la secuencia de nucleótidos se hibrida con una sonda de ácidos nucleicos marcada que corresponde a la secuencia de nucleótidos mostrada en SEC ID N° 1, su cadena complementaria o una subsecuencia de la misma, bajo condiciones de astringencia de muy bajas a muy altas.

Las moléculas con las que la sonda de ácidos nucleicos se hibrida bajo estas condiciones se pueden detectar usando una película radiográfica.

15 [0051] En otro aspecto adicional, la presente invención se refiere a variantes artificiales que comprenden una sustitución conservadora, una delección y/o una inserción de uno o varios aminoácidos de la SEC ID N° 2 o el polipéptido maduro de la misma, teniendo dichas variantes un RB de al menos 1,1 y un RR de al menos 0,8.

Preferiblemente, los cambios en los aminoácidos son de una naturaleza menor, esto es, sustituciones conservadoras de aminoácidos o inserciones que no afectan significativamente al plegado y/o la actividad de la proteína; delecciones pequeñas, típicamente de uno hasta aproximadamente 30 aminoácidos; pequeñas extensiones del amino-terminal o el carboxilo-terminal, tales como un residuo de metionina en el amino-terminal; un pequeño péptido enlazador de hasta aproximadamente 20-25 residuos; o una pequeña extensión que facilita la purificación mediante el cambio de la carga neta u otra función, tal como un tracto de polihistidina, un epítipo antigénico o un dominio de unión.

25 [0052] Los ejemplos de sustituciones conservadoras están dentro del grupo de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), los aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), los aminoácidos polares (glutamina y asparagina), los aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina y valina), los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y los aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina, treonina y metionina).

30 Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica se conocen en la técnica y han sido descritas, por ejemplo, por H. Neurath y R.L. Hill, 1979, In, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York.

Los intercambios más frecuentes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly.

35 [0053] Además de los 20 aminoácidos estándar, los aminoácidos no estándar (tales como 4-hidroxiprolina, 6-N-metil lisina, ácido 2-aminoisobutírico, isovalina, y alfa-metil serina) se pueden sustituir por residuos de aminoácidos de un polipéptido de tipo salvaje.

Se puede sustituir un número limitado de aminoácidos no conservadores, aminoácidos que no están codificados por el código genético, y de aminoácidos no naturales por residuos de aminoácidos. Los "aminoácidos no naturales" han sido modificados después la síntesis de proteínas y/o tienen una estructura química en su(s) cadena(s) lateral(es) diferente de los aminoácidos estándar.

40 Los aminoácidos no naturales pueden ser sintetizados químicamente y, preferiblemente, están disponibles comercialmente, e incluyen el ácido piperídico, el ácido tiazolidín carboxílico, la dehidroprolina, la 3-metilprolina, la 4-metilprolina y la 3,3-dimetilprolina.

45 [0054] Alternativamente, los cambios de aminoácidos son de tal naturaleza que se alteran las propiedades físico-químicas de los polipéptidos.

Por ejemplo, los cambios de aminoácidos pueden mejorar la termoestabilidad del polipéptido, alterar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo, y similares.

50 [0055] Los aminoácidos esenciales en el polipéptido original se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis por escaneo de alanina (Cunningham y Wells, 1989, *Science* 244: 1081-1085).

En esta última técnica se introducen mutaciones individuales de alanina en cada residuo de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se examinan en busca de actividad biológica (es decir, actividad de lipasa) para identificar residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula.

Ver también, Hilton et al., 1996, *J. Biol. Chem.* 271: 4699-4708.

60 El sitio activo de la enzima u otra interacción biológica puede también ser determinado mediante el análisis físico de la estructura, según se determina mediante técnicas tales como resonancia magnética nuclear, cristalografía, difracción electrónica o marcaje por fotoafinidad, conjuntamente con mutación de aminoácidos de sitios de contacto putativos.

Ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, *Science* 255: 306-312; Smith et al., 1992, *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, *FEBS Lett.* 309:59-64.

65 Las identidades de los aminoácidos esenciales también pueden ser inferidas del análisis de las identidades con polipéptidos que están relacionados con un polipéptido según la invención.

[0056] Se pueden realizar y examinar sustituciones de aminoácidos únicas o múltiples usando métodos conocidos de mutagénesis, recombinación y/o barajado, seguidos de un procedimiento de selección pertinente, como los descritos por Reidhaar-Olson y Sauer, 1988, Science 241: 53-57; Bowie y Sauer, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2152-2156; WO 95/17413; o WO 95/22625.

5 Otros métodos que se pueden usar incluyen PCR propensa a error, presentación en fagos (por ejemplo, Lowman et al., 1991, Biochem. 30:10832-10837; US Patent N° 5,223,409; WO 92/06204), y mutagénesis dirigida (Derbyshire et al., 1986, Gene 46:145; Ner et al., 1988, ADN 7:127).

10 [0057] Los métodos de mutagénesis/barajado se pueden combinar con métodos de selección automatizados de alto rendimiento para detectar actividad de polipéptidos clonados y mutagenizados expresados por células huésped. Las moléculas de ADN mutagenizadas que codifican polipéptidos activos se pueden recuperar de las células huésped y secuenciar rápidamente usando métodos estándar en la técnica. Estos métodos permiten la determinación rápida de la importancia de los residuos de aminoácidos individuales en un polipéptido de interés, y se pueden aplicar a polipéptidos de estructura desconocida.

15 [0058] El número total de sustituciones, deleciones y/o inserciones de los aminoácidos 1 a 291 de la SEC ID N° 2 es 10, preferiblemente 9, más preferiblemente 8, más preferiblemente 7, más preferiblemente como mucho 6, más preferiblemente como mucho 5, incluso preferiblemente 4, incluso más preferiblemente 3, de la forma más preferible 2, e incluso de la forma más preferible 1.

20 Identificación de regiones y sustituciones

[0059] Las sustituciones abarcadas por la presente aplicación se pueden identificar como descritas en esta sección.

25 [0060] Las posiciones referidas más adelante en las regiones de la I a la IV son las posiciones de los residuos de aminoácidos en la SEC ID N° 2. Para encontrar las posiciones correspondientes (u homólogas) en una lipasa diferente, se usa el procedimiento descrito en "Homología y alineamiento".

30 Sustituciones en la región I

[0061] La región I consiste en residuos de aminoácidos que rodean al residuo N-terminal E1. En esta región se prefiere sustituir un aminoácido de la lipasa original por un aminoácido más positivo.

35 [0062] Los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones siguientes están incluidos en la región I: 2 a 11 y 223-239. Las posiciones siguientes son de interés particular: 4, 8, 11, 223, 229, 231,233,234,236.

40 [0063] En particular se han identificado las siguientes sustituciones: X4V, X231 R y X233R.

[0064] En una realización preferida, la variante de lipasa tiene al menos un 80 %, tal como un 85 % o un 90 %, tal como al menos un 95 % o un 98 % o un 99 % de identidad con la SEC ID N° 2

45 Sustituciones en la región II

[0065] La región II consiste en residuos de aminoácidos en contacto con el sustrato en un lado de la cadena de acilo y en un lado de la parte alcoholica. En esta región se prefiere sustituir un aminoácido de la lipasa original por un aminoácido más positivo o por un aminoácido menos hidrófobo.

50 [0066] Los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones siguientes están incluidos en la región II: 202 a 211 y 249 a 269. Las posiciones siguientes son de interés particular: 202, 210, 211, 253, 254, 255, 256.

55 [0067] En particular se han identificado las siguientes sustituciones: X202G, X255Y/V y X256K/R.

[0068] En una realización preferida la variante de lipasa tiene al menos un 80 %, tal como un 85 % o un 90 %, tal como al menos un 95 % o un 98 % o un 99 % de identidad con la SEC ID N° 2

60 Sustituciones en la región III

[0069] La región III consiste en residuos de aminoácidos que forman una estructura flexible y así permiten que el sustrato entre en el sitio activo.

65 En esta región se prefiere sustituir un aminoácido de la lipasa original por un aminoácido más positivo o un aminoácido menos hidrófobo.

[0070] Los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones siguientes están incluidos en la región III: 82 a 102.

Las posiciones siguientes son de interés particular: 86, 87, 90, 91, 95, 96, 99.

5 [0071] En particular se han identificado las siguientes sustituciones: X86V y X90A/R.

[0072] En una realización preferida la variante de lipasa tiene al menos un 80 %, tal como un 85 % o un 90 %, tal como al menos un 95 % o un 98 % o un 99 % de identidad con la SEC ID N° 2

10 Sustituciones en la región IV

[0073] La región IV consiste en residuos de aminoácidos que se unen electrostáticamente a una superficie. En esta región se prefiere sustituir un aminoácido de la lipasa original por un aminoácido más positivo.

15 [0074] Los residuos de aminoácidos correspondientes a las posiciones siguientes están incluidos en la región IV: 27 y 54 a 62.

Las posiciones siguientes son de interés particular: 27, 56, 57, 58, 60.

20 [0075] En particular se han identificado las siguientes sustituciones: X27R, X58N/AG/T/P y X60V/S/G/N/R/K/A/L.

[0076] En una realización preferida la variante de lipasa tiene al menos un 80 %, tal como un 85 % o un 90 %, tal como al menos un 95 % o un 98 % o un 99 % de identidad con la SEC ID N° 2

Aminoácidos en otras posiciones

25 [0077] La lipasa original puede comprender opcionalmente sustituciones de otros aminoácidos, particularmente menos de 10 o menos de 5 de dichas sustituciones.

Los ejemplos son sustituciones correspondientes a una o varias de las posiciones 24, 46, 74, 81, 83, 127, 131, 137, 147, 150, 203, 206, 211, 263, 264, 265, 267 y 269 de la SEC N° 2. En una realización particular hay una sustitución

30 en al menos una de las posiciones correspondientes a las posiciones 81, 147, 150, 227 y 249.

En una realización preferida dicha sustitución se selecciona del grupo que consiste en X81Q/E, X147M/Y, X150G, X227G y X249R/I/L.

35 [0078] Otras sustituciones pueden, por ejemplo, realizarse según principios conocidos en la técnica, por ejemplo, las sustituciones descritas en WO 92/05249, WO 94/25577, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

Homología y alineamiento

40 [0079] Para los fines de la presente invención, el grado de homología se puede determinar adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica, tales como el programa GAP proporcionado en el paquete de programas GCG (Manual de programa del Paquete de Wisconsin, versión 8, agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 53711) (Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48,443-45), usando GAP con los siguientes ajustes para la comparación de secuencias polipeptídicas: penalización de creación de GAP de 3,0 y penalización de extensión de GAP de 0,1.

45 [0080] En la presente invención, las posiciones correspondientes (u homólogas) en las secuencias de la lipasa de *Absidia reflexa*, *Absidia corymbifera*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubigensis*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium heterosporum*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo: *Humicola lanuginosa*) y *Landerina penisapora* se definen mediante el alineamiento mostrado en la figura 1.

50 [0081] Para encontrar las posiciones homólogas en las secuencias de lipasa no mostradas en el alineamiento, la secuencia de interés se alinea con las secuencias mostradas en la figura 1. La nueva secuencia se alinea con el alineamiento actual en la figura 1 usando el alineamiento de GAP con la secuencia que tenga mayor homología encontrada por el programa GAP.

GAP se incluye en el paquete de programas GCG (Manual de programa del Paquete de Wisconsin, versión 8, agosto de 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU. 53711) (Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48,443-45).

60 Los ajustes siguientes se usan para la comparación de secuencias polipeptídicas: penalización de creación de GAP de 3,0 y penalización de extensión de GAP de 0,1.

[0082] Se puede utilizar cualquier lipasa original adecuada.

En una realización preferida, la lipasa original tiene una homología de al menos un 50 % con la lipasa de *T. lanuginosus* (SEC ID N° 2), particularmente al menos un 55 %, al menos un 60 %, al menos un 75 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, más del 95 %, 96 %, 97 % o más del 98 % o del 99 %.

65 En una realización particular la lipasa original es idéntica a la lipasa de *T. lanuginosus* (SEC ID N° 2).

Fuentes de polipéptidos con actividad de lipasa

- [0083] Un polipéptido de la presente invención puede obtenerse a partir de microorganismos de cualquier género.  
 5 Para los fines de la presente invención, el término "obtenerse a partir de" tal y como se utiliza en este documento en conexión con una fuente dada, significará que el polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos es producido por la fuente o por una cepa en la que se ha insertado la secuencia de nucleótidos de la fuente. En un aspecto preferido, el polipéptido obtenido de una fuente dada se secreta extracelularmente.
- [0084] Un polipéptido de la presente invención puede ser un polipéptido bacteriano.  
 10 Por ejemplo, el polipéptido puede ser un polipéptido bacteriano gram positivo tal como un polipéptido de *Bacillus*, por ejemplo, un polipéptido de *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* o *Bacillus thuringiensis*; o un polipéptido de *Streptomyces*, por ejemplo, un polipéptido de *Streptomyces lividans* o *Streptomyces murinus*; o un polipéptido bacteriano gram negativo, por ejemplo, un polipéptido de *E. coli* o de *Pseudomonas sp.*
- [0085] Un polipéptido de la presente invención también puede ser un polipéptido fúngico, y más preferiblemente un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*; o más preferiblemente un polipéptido fúngico filamentoso tal como un polipéptido de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium* o *Trichoderma*.
- [0086] En un aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis* con actividad de lipasa.
- [0087] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tubingensis*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo: *Humicola lanuginosa*), *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.
- [0088] En otro aspecto preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Thermomyces*.
- [0089] En un aspecto más preferido, el polipéptido es un polipéptido de *Thermomyces lanuginosus*, por ejemplo, el polipéptido de la SEC ID N° 2 con mutaciones según se describe en la presente aplicación.
- [0090] Se entiende que, para las especies anteriormente mencionadas, la invención abarca los estados perfectos e imperfectos, y otros equivalentes taxonómicos, por ejemplo, anamorfos, independientemente del nombre de especie por el que son conocidos.  
 45 Los expertos en la técnica reconocerán fácilmente la identidad de los equivalentes apropiados.
- [0091] Las cepas de estas especies son fácilmente accesibles al público en varias colecciones de cultivos, tales como la American Type Culture Collection (ATCC), la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), la Centraalbureau Voor Schimmelcultures (CBS) y la Agricultural Research Service Patent Culture Collection, Northern Regional Research Center (NRRL).
- [0092] Además, tales polipéptidos se pueden identificar y obtener a partir de otras fuentes que incluyen microorganismos aislados de la naturaleza (por ejemplo, tierra, abonos, agua, etc.) utilizando las sondas mencionadas anteriormente.  
 55 Las técnicas para aislar microorganismos de hábitats naturales son bien conocidas en la técnica. El polinucleótido puede entonces obtenerse seleccionando de forma similar una genoteca de ADNc o genómica de otro microorganismo.
- [0093] Una vez que se ha detectado con la(s) sonda(s) una secuencia de polinucleótidos que codifica un polipéptido, el polinucleótido se puede aislar o clonar utilizando técnicas que son bien conocidas por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).
- [0093] Los polipéptidos de la presente invención también incluyen polipéptidos fusionados o polipéptidos divisibles de fusión en los que otro polipéptido se fusiona al N-terminal o al C-terminal del polipéptido o fragmento del mismo.  
 65 Un polipéptido fusionado se produce fusionando una secuencia de nucleótidos (o una porción de la misma) que

codifica otro polipéptido a una secuencia de nucleótidos (o una porción de la misma) de la presente invención. Los procedimientos para producir polipéptidos de fusión se conocen en la técnica, e incluyen ligar las secuencias codificantes que codifican los polipéptidos de modo que estén dentro del marco y que la expresión del polipéptido fusionado esté bajo el control del(los) los mismo(s) promotor(es) y terminador.

5 Polinucleótidos

[0094] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que tienen una secuencia de nucleótidos y que codifican un polipéptido de la presente invención.

10 La presente invención también abarca secuencias de nucleótidos que codifican un polipéptido que es una variante de la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2 o el polipéptido maduro de la misma, que difiere del polinucleótido codificante en virtud de la degeneración del código genético.

La presente invención también se refiere a subsecuencias de la SEC ID N° 1 que codifican fragmentos de la SEC ID N° 2 que tienen actividad de lipasa, teniendo dichos fragmentos un RB de al menos 1,1 y un RR de al menos 0,8.

15 [0095] Los procedimientos usados para aislar o clonar un polinucleótido que codifica un polipéptido se conocen en la técnica e incluyen el aislamiento del ADN genómico, la preparación a partir de ADNc, o una combinación de las mismas.

20 La clonación de los polinucleótidos de la presente invención a partir de dicho ADN genómico se puede efectuar, por ejemplo, usando la conocida reacción en cadena de polimerasa (PCR) o la selección de anticuerpos de bibliotecas de expresión para detectar fragmentos de ADN clonado con características estructurales compartidas.

Ver, por ejemplo, Innis et al., 1990, PCR: A Guide to Methods and Application, Academic Press, Nueva York. Se pueden utilizar otros procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos tales como la reacción en cadena de ligasa (LCR), la transcripción activada ligada (LAT) y la amplificación basada en secuencias de nucleótidos (NASBA).

25 Los polinucleótidos se pueden clonar de una cepa de *Thermomyces* u otro organismo relacionado, y de este modo, por ejemplo, pueden ser una variante alélica o de especie de la región codificante de polipéptidos de la secuencia de nucleótidos.

30 [0096] La presente invención también se refiere a polinucleótidos con secuencias de nucleótidos que tienen un grado de identidad con la secuencia codificante del polipéptido maduro de la SEC ID N° 1 de al menos un 60 %, preferiblemente al menos un 65 %, más preferiblemente al menos un 70 %, más preferiblemente al menos un 75 %, más preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 %, incluso más preferiblemente al menos un 95 %, y de la forma más preferible al menos un 97 %, 98 % o 99 %, que codifican un polipéptido activo con actividad de lipasa, y un RB de al menos 1,1 y un RR de al menos 0,8.

[0097] La modificación de una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de la presente invención puede ser necesaria para la síntesis de polipéptidos sustancialmente similares al polipéptido.

40 El término "sustancialmente similares" al polipéptido se refiere a formas de origen no natural del polipéptido. Estos polipéptidos pueden diferir de alguna manera diseñada del polipéptido aislado de su fuente nativa, por ejemplo, las variantes artificiales que difieren en actividad específica, termoestabilidad, pH óptimo, o similares.

45 La secuencia variante se puede construir basándose en la secuencia de nucleótidos presentada como la región codificante de polipéptidos de la SEC ID N° 1, por ejemplo, una subsecuencia de la misma, y/o introduciendo sustituciones de nucleótidos que no dan lugar a otra secuencia de aminoácidos del polipéptido codificado por la secuencia de nucleótidos, pero que corresponden al uso de codones del organismo huésped destinado a la producción de la enzima, o introduciendo sustituciones de nucleótidos que pueden dar lugar a una secuencia de aminoácidos diferente.

Para una descripción general de la sustitución de nucleótidos, ver, por ejemplo, Ford et al., 1991, Protein Expression and Purification 2: 95-107.

50 [0098] Será evidente para los expertos en la técnica que tales sustituciones se pueden hacer fuera de las regiones críticas para la función de la molécula y aun así dar lugar a un polipéptido activo.

Los residuos de aminoácidos esenciales para la actividad del polipéptido codificado por un polinucleótido aislado de la invención, y, por lo tanto, preferiblemente no sometidos a sustituciones, se pueden identificar según procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis de escaneo de alanina (ver, por ejemplo, Cunningham y Wells, 1989, Science 244: 1081-1085).

55 En esta última técnica, se introducen mutaciones en cada residuo positivamente cargado de la molécula, y las moléculas mutantes resultantes se examinan en busca de actividad de lipasa para identificar los residuos de aminoácidos que son críticos para la actividad de la molécula.

60 Los sitios de interacción enzima-sustrato también se pueden determinar analizando la estructura tridimensional según se determina mediante técnicas tales como análisis de resonancia magnética nuclear, cristalografía o marcado por fotoafinidad (ver, por ejemplo, de Vos et al., 1992, Science 255: 306-312; Smith et al., 1992, Journal of Molecular Biology 224: 899-904; Wlodaver et al., 1992, FEBS Letters 309: 59-64).

65 [0099] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados que codifican un polipéptido de la presente invención, que se hibridan bajo condiciones de astringencia muy bajas, preferiblemente condiciones de

5 astringencia bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia medias, más preferiblemente condiciones de astringencia medias-altas, incluso más preferiblemente condiciones de astringencia altas, y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con (i) la SEC ID N° 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en la SEC ID N° 1, o (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii); o variantes alélicas y subsecuencias de las misma (Sambrook *et al.*, 1989, *supra*), tal y como se define en este documento.

10 [0100] La presente invención también se refiere a polinucleótidos aislados obtenidos (a) hibridando una población de ADN bajo condiciones de astringencia muy bajas, bajas, medias, medias-altas, altas, o muy altas con los nucleótidos de (i) la SEC ID N° 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en los nucleótidos de la SEC ID N° 1, o (iii) una cadena complementaria de (i) o (ii); y (b) aislando el polinucleótido que se hibrida, el cual codifica un polipéptido con actividad de lipasa.

#### Constructos de ácidos nucleicos

15 [0101] La presente invención también se refiere a constructos de ácidos nucleicos que incluyen un polinucleótido aislado de la presente invención operativamente enlazado a una o varias secuencias de control, que dirigen la expresión de la secuencia codificante en una célula huésped adecuada bajo condiciones compatibles con las secuencias de control.

20 [0102] Un polinucleótido aislado que codifica un polipéptido de la presente invención se puede manipular de múltiples maneras para garantizar la expresión del polipéptido. Dependiendo del vector de expresión, puede ser deseable o necesaria la manipulación de la secuencia de polinucleótidos antes de su inserción. Las técnicas para modificar las secuencias de polinucleótidos utilizando métodos de ADN recombinante se conocen bien en la técnica.

[0103] La secuencia de control puede ser una secuencia promotora apropiada, una secuencia de nucleótidos que es reconocida por una célula huésped para la expresión de un polinucleótido que codifica un polipéptido de la presente invención.

30 La secuencia promotora contiene secuencias de control transcripcionales que median en la expresión del polipéptido. El promotor puede ser cualquier secuencia de nucleótidos que muestre actividad transcripcional en la célula huésped seleccionada, incluyendo promotores mutantes, truncados e híbridos, y se puede obtener a partir genes que codifican polipéptidos extracelulares o intracelulares tanto homólogos como heterólogos a la célula huésped.

35 [0104] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención, especialmente en una célula huésped bacteriana, son los promotores obtenidos del operón *lac* de *E. coli*, del gen de agarasa (*dagA*) de *Streptomyces coelicolor*, del gen de levansucrasa (*sacB*) de *Bacillus subtilis*, del gen de alfa-amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, del gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, del gen de alfa-amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, del gen de penicilinas (*penP*) de *Bacillus licheniformis*, de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis* y del gen de beta-lactamasa procariótica (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU 75: 3727-3731), así como el promotor *tac* (DeBoer *et al.*, 1983, Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU 80: 21-25). Otros promotores se describen en "Useful proteins from recombinant bacteria" en Scientific American, 1980,242: 74-94; y en Sambrook *et al.*, 1989, *supra*.

40 [0105] Ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de los constructos de ácidos nucleicos de la presente invención en una célula huésped fúngica filamentosa son los promotores obtenidos de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger*, alfa-amilasa estable en ácido de *Aspergillus niger*, glucoamilasa (*glaA*) de *Aspergillus niger* o de *Aspergillus awamori*, lipasa de *Rhizomucor miehei*, proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*, acetamidasa de *Aspergillus nidulans*, amiloglucosidasa de *Fusarium venenatum* (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Daria (WO 00/56900), *Fusarium venenatum* Quinn (WO 00/56900), proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* (WO 96/00787), beta-glucosidasa de *Trichoderma reesei*, celobiohidrolasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa I de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa II de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa III de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa IV de *Trichoderma reesei*, endoglucanasa V de *Trichoderma reesei*, xilanasa I de *Trichoderma reesei*, xilanasa II de *Trichoderma reesei*, beta-xilosidasa de *Trichoderma reesei*, así como el promotor NA2-tpi (un híbrido de los promotores de los genes para alfa-amilasa neutra de *Aspergillus niger* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae*); y promotores mutantes, truncados e híbridos de los mismos.

60 [0106] En un huésped de levadura, los promotores útiles se obtienen de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, galactoquinasa (GAL1) de *Saccharomyces cerevisiae*, alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH1, ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*, triosa fosfato isomerasa (TPI) de *Saccharomyces cerevisiae*, metalotionina (CUP1) de *Saccharomyces cerevisiae* y 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*. Otros promotores útiles para las células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, Yeast 8: 423-

488.

[0107] La secuencia de control también puede ser una secuencia terminadora de transcripción adecuada, una secuencia reconocida por una célula huésped para terminar la transcripción.

5 La secuencia terminadora está operativamente enlazada al terminal 3' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

Cualquier terminador que sea funcional en la célula huésped elegida se puede utilizar en la presente invención.

[0108] Los terminadores preferidos para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger* y proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum*.

10

[0109] Los terminadores preferidos para las células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*, citocromo C (CYC1) de *Saccharomyces cerevisiae* y gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa de *Saccharomyces cerevisiae*.

15

Otros terminadores útiles para las células huésped de levadura son descritos por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0110] La secuencia de control también puede ser una secuencia líder adecuada, una región no traducida de un ARNm que es importante para que la célula huésped realice la traducción.

20 La secuencia líder está operativamente enlazada al terminal 5' de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido.

Cualquier secuencia líder que sea funcional en la célula huésped elegida se puede utilizar en la presente invención.

[0111] Los líderes preferidos para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae* y triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus nidulans*.

25

[0112] Los líderes adecuados para las células huésped de levadura se obtienen de los genes para enolasa (ENO-1) de *Saccharomyces cerevisiae*, 3-fosfoglicerato quinasa de *Saccharomyces cerevisiae*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* y alcohol deshidrogenasa/gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (ADH2/GAP) de *Saccharomyces cerevisiae*.

30

[0113] La secuencia de control también puede ser una secuencia de poliadenilación, una secuencia operativamente enlazada al terminal 3' de la secuencia de nucleótidos y que, cuando se transcribe, es reconocida por la célula huésped como una señal para añadir residuos de poliadenosina al ARNm transcrito. Cualquier secuencia de poliadenilación que sea funcional en la célula huésped elegida se puede utilizar en la presente invención.

35

[0114] Las secuencias de poliadenilación preferidas para las células huésped fúngicas filamentosas se obtienen de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, antranilato sintasa de *Aspergillus nidulans*, proteasa de tipo tripsina de *Fusarium oxysporum* y alfa-glucosidasa de *Aspergillus niger*.

40

[0115] Las secuencias de poliadenilación útiles para las células huésped de levadura son descritas por Guo y Sherman, 1995, *Molecular Cellular Biology* 15: 5983-5990.

[0116] La secuencia de control también puede ser una región codificante de péptido señal que codifica una secuencia de aminoácidos enlazada al amino terminal de un polipéptido y que dirige al polipéptido codificado hacia la vía secretora de la célula.

45

El extremo 5' de la secuencia codificante de la secuencia de nucleótidos puede contener intrínsecamente una región codificante de péptido señal naturalmente enlazada dentro del marco de lectura de traducción con el segmento de la región codificante que codifica el polipéptido segregado.

50

Alternativamente, el extremo 5' de la secuencia codificante puede contener una región codificante de péptido señal que es extranjera a la secuencia codificante.

La región codificante extranjera de péptido señal puede ser requerida allí donde la secuencia codificante no contenga de forma natural una región codificante de péptido señal.

55

Alternativamente, la región extranjera codificante de péptido señal puede simplemente reemplazar a la región codificante natural de péptido señal para mejorar la secreción del polipéptido.

Sin embargo, cualquier región codificante de péptido señal que dirige el polipéptido expresado hacia la vía secretora de una célula huésped elegida se puede utilizar en la presente invención.

[0117] Las regiones codificantes de péptido señal eficaces para las células huésped bacterianas son las regiones codificantes de péptido señal obtenidas de los genes para amilasa maltogénica de *Bacillus* NCIB 11837, alfa-amilasa de *Bacillus stearothermophilus*, subtilisina de *Bacillus licheniformis*, beta-lactamasa de *Bacillus licheniformis*, proteasas neutras (*nprT*, *nprS*, *nprM*) de *Bacillus stearothermophilus* y *prsA* de *Bacillus subtilis*. Otros péptidos señal son descritos por Simonen y Palva, 1993, *Microbiological Reviews* 57: 109-137.

60

[0118] Las regiones codificantes de péptido señal eficaces para las células huésped fúngicas filamentosas son las regiones codificantes de péptido señal obtenidas de los genes para TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, amilasa

65

neutra de *Aspergillus niger*, glucoamilasa de *Aspergillus niger*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, celulasa de *Humicola insolens* y lipasa de *Humicola lanuginosa*.

5 [0119] Los péptidos señal útiles para las células huésped de levadura son obtenidos de los genes para factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* e invertasa de *Saccharomyces cerevisiae*.  
Otras regiones codificantes de péptido señal útiles son descritas por Romanos *et al.*, 1992, *supra*.

[0120] La secuencia de control también puede ser una región codificante de propéptidos que codifica una secuencia de aminoácidos situada en el amino terminal de un polipéptido.  
10 El polipéptido resultante se conoce como proenzima o propropolipéptido (o zimógeno en algunos casos).  
Un propropolipéptido está generalmente inactivo y se puede convertir en un polipéptido activo maduro mediante escisión catalítica o autocatalítica del propéptido de dicho propropolipéptido.  
La región codificante del propéptido se puede obtener de los genes para proteasa alcalina (*aprE*) de *Bacillus subtilis*, proteasa neutra (*nprT*) de *Bacillus subtilis*, factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae*, proteinasa aspártica de  
15 *Rhizomucor miehei* y lacasa de *Myceliophthora thermophila* (WO 95/33836).

[0121] Allí donde las regiones tanto de péptido señal como de propéptido están presentes en el amino-terminal de un polipéptido, la región de propéptido está situada junto al amino-terminal de un polipéptido y la región de péptido señal está situada junto al amino-terminal de la región de propéptido.  
20

[0122] También puede ser deseable añadir secuencias reguladoras que permitan la regulación de la expresión del polipéptido en relación con el crecimiento de la célula huésped.  
Ejemplos de sistemas reguladores son los que causan que la expresión del gen se active o se desactive en respuesta a un estímulo químico o físico, incluyendo la presencia de un compuesto regulador.  
25 Los sistemas reguladores en sistemas procarióticos incluyen los sistemas operadores *lac*, *tac* y *trp*.  
En la levadura, se pueden utilizar los sistemas ADH2 o GAL1.  
En hongos filamentosos, el promotor de TAKA alfa-amilasa, el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus niger* y el promotor de glucoamilasa de *Aspergillus oryzae* se pueden utilizar como secuencias reguladoras. Otros ejemplos de secuencias reguladoras son los que permiten la amplificación génica.  
30 En sistemas eucarióticos, estos incluyen el gen de dihidrofolato reductasa que se amplifica en presencia de metotrexato y los genes de metalotioneína que se amplifican con metales pesados.  
En estos casos, la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido estaría operativamente enlazada a la secuencia reguladora.

35 Vectores de expresión

[0123] La presente invención también se refiere a vectores de expresión recombinantes que comprenden un polinucleótido de la presente invención, un promotor y señales de parada transcripcional y traduccional.  
Los diferentes ácidos nucleicos y secuencias de control descritos anteriormente se pueden unir para producir un  
40 vector de expresión recombinante que puede incluir uno o varios sitios de restricción convenientes para permitir la inserción o sustitución de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido en tales sitios.  
Alternativamente, una secuencia de nucleótidos de la presente invención se puede expresar insertando la secuencia de nucleótidos o un constructo de ácidos nucleicos que comprende dicha secuencia en un vector apropiado para la expresión.  
45 En la creación del vector de expresión, la secuencia codificante se ubica en el vector de modo que la secuencia codificante esté operativamente enlazada a las secuencias de control apropiadas para la expresión.

[0124] El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector (por ejemplo, un plásmido o un virus) que pueda ser convenientemente sometido a procedimientos de ADN recombinante y pueda provocar la expresión de la  
50 secuencia de nucleótidos.  
La elección del vector dependerá típicamente de la compatibilidad del vector con la célula huésped en la que el vector se va a introducir.  
Los vectores pueden ser plásmidos lineales o circulares cerrados.

[0125] El vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como entidad extracromosómica, cuya replicación es independiente de replicación cromosómica, por ejemplo, un plásmido, un elemento extracromosómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial.  
El vector puede contener cualquier medio para asegurar la autorreplicación.  
Alternativamente, el vector puede ser tal que, cuando se introduce en la célula huésped, se integra en el genoma y  
60 se replica con el(los) cromosoma(s) en el(los) que se ha integrado.  
Además, se puede usar un único vector o plásmido, o dos o más vectores o plásmidos que juntos contienen el ADN total que va a ser introducido en el genoma de la célula huésped, o un transposón.

[0126] Los vectores de la presente invención preferiblemente contienen uno o varios marcadores seleccionables que permiten seleccionar fácilmente células transformadas.  
65 Un marcador seleccionable es un gen cuyo producto proporciona resistencia a los biocidas o los virus, resistencia a

metales pesados, prototrofia para auxótrofos, y similares.

[0127] Un gen condicionalmente esencial puede funcionar como un marcador seleccionable no antibiótico.

5 Ejemplos no limitantes de marcadores seleccionables no antibióticos condicionalmente esenciales y bacterianos son los genes *dal* de *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* u otros *Bacilli*, que solo son esenciales cuando la bacteria se cultiva en ausencia de D-alanina.

También los genes que codifican enzimas implicadas en la producción de UDP-galactosa pueden funcionar como marcadores condicionalmente esenciales en una célula, cuando la célula se cultiva en presencia de galactosa o en un medio que da lugar a la presencia de galactosa.

10 Ejemplos no limitantes de tales genes son los de *B. subtilis* o *B. licheniformis* que codifican fosforilasa dependiente de la UTP (EC 2.7.7.10), uridililtransferasa dependiente de la UDP-glucosa (EC 2.7.7.12) o UDP-galactosa epimerasa (EC 5.1.3.2).

También se puede usar un gen de xilosa isomerasa tal como el *xylA* de *Bacilli* como marcador seleccionable en células cultivadas en un medio mínimo con xilosa como única fuente de carbono.

15 Los genes necesarios para utilizar gluconato, *gntK* y *gntP*, también pueden usarse como marcadores seleccionables en células cultivadas en un medio mínimo con gluconato como única fuente de carbono.

Otros ejemplos de genes condicionalmente esenciales son conocidos en la técnica. Los marcadores seleccionables antibióticos confieren resistencia antibiótica para antibióticos tales como ampicilina, kanamicina, cloranfenicol, eritromicina, tetraciclina, neomicina, higromicina o metotrexato.

20 [0128] Marcadores adecuados para células huésped de levadura son ADE2, HIS3, LEU2, LYS2, MET3, TRR1 y URA3.

Los marcadores seleccionables para usar en una célula huésped fúngica filamentosa incluyen, pero no se limitan a, *amdS* (acetamidasa), *argB* (ornitina-carbamoiltransferasa), *bar* (fosfotricina acetiltransferasa), *hph* (higromicina fosfotransferasa), *niaD* (nitrato-reductasa), *pyrG* (orotidina-5'-fosfato-descarboxilasa), *sC* (sulfato adeniltransferasa) y *trpC* (antranilato sintasa), así como equivalentes de los mismos.

25 Se prefieren para usar en una célula de *Aspergillus* los genes *amdS* y *pyrG* de *Aspergillus nidulans* o *Aspergillus oryzae* y el gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus*.

30 [0129] Los vectores de la presente invención contienen preferiblemente un(os) elemento(s) que permite(n) la integración del vector en el genoma de la célula huésped o la replicación autónoma del vector en la célula independiente del genoma.

[0130] Para su integración en el genoma de la célula huésped, el vector puede depender de la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido o de cualquier otro elemento del vector para integrarse en el genoma mediante recombinación homóloga o no homóloga.

35 Alternativamente, el vector puede contener secuencias de nucleótidos adicionales para dirigir la integración mediante recombinación homóloga en el genoma de la célula huésped en ubicaciones precisas dentro de los cromosomas.

40 Para aumentar la probabilidad de integración en una ubicación específica, los elementos integracionales deberían contener preferiblemente un número suficiente de ácidos nucleicos, tal como de 100 a 10 000 pares de bases, preferiblemente de 400 a 10 000 pares de bases, y de la forma más preferible de 800 a 10 000 pares de bases, que tengan un alto grado de identidad con la secuencia objetivo correspondiente para aumentar la probabilidad de recombinación homóloga.

45 Los elementos integracionales pueden ser cualquier secuencia homóloga a la secuencia objetivo en el genoma de la célula huésped.

Además, los elementos integracionales pueden ser secuencias de nucleótidos codificantes o no codificantes.

Por otro lado, el vector se puede integrar en el genoma de la célula huésped mediante recombinación no homóloga.

50 [0131] En el caso de replicación autónoma, el vector puede comprender además un origen de replicación permitiendo al vector replicarse de manera autónoma en la célula huésped en cuestión.

El origen de replicación puede ser cualquier replicador de un plásmido que media en la replicación autónoma que funciona en una célula.

55 El término "origen de replicación" o "replicador de un plásmido" se define en este documento como una secuencia de nucleótidos que permite a un plásmido o vector replicarse *in vivo*.

[0132] Ejemplos de orígenes bacterianos de replicación son los orígenes de replicación de los plásmidos pRB322, pUC19, pACYC177 y pACYC184 que permiten la replicación en *E. coli*, y pUB110, pE194, pTA1060 y pAMB1 que permiten la replicación en *Bacillus*.

60 [0133] Ejemplos de orígenes de replicación para usar en una célula huésped de levadura son el ARS1, el ARS4, la combinación de ARS1 y CEN3, la combinación de ARS4 y CEN6, y el origen de replicación del plásmido 2 micras.

[0134] Ejemplos de orígenes de replicación útiles en una célula fúngica filamentosa son el AMA1 y el ANS1 (Gems et al., 1991, Gene 98:61-67; Cullen et al., 1987, Nucleic Acids Research 15: 9163-9175; WO 00/24883).

65 Se puede lograr el aislamiento del gen AMA1 y la construcción de plásmidos o vectores que incluyen dicho gen

según los métodos descritos en WO 00/24883.

[0135] Se puede insertar más de una copia de un polinucleótido de la presente invención en la célula huésped para aumentar la generación del producto génico.

Se puede obtener un aumento en el número de copias del polinucleótido integrando al menos una copia adicional de la secuencia en el genoma de la célula huésped o incluyendo un gen marcador seleccionable y amplificable con el polinucleótido donde las células que contienen copias amplificadas del gen marcador seleccionable y, de este modo, copias adicionales del polinucleótido, se pueden seleccionar cultivando las células en presencia del agente seleccionable apropiado.

[0136] Los procedimientos usados para unir los elementos anteriormente descritos para construir los vectores de expresión recombinantes de la presente invención son conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

#### Células huésped

[0137] La presente invención también se refiere a células huésped recombinantes, que comprenden un polinucleótido de la presente invención, que se usan beneficiosamente en la producción recombinante de los polipéptidos.

Un vector que comprende un polinucleótido de la presente invención se introduce en una célula huésped de modo que el vector se mantiene como un integrante cromosómico o como un vector autorreplicante extracromosómico como se ha descrito anteriormente.

El término "célula huésped" abarca cualquier descendiente de una célula madre que no es idéntico a la célula madre debido a mutaciones que ocurren durante la replicación.

La elección de una célula huésped dependerá en gran medida del gen que codifica el polipéptido y su fuente.

[0138] La célula huésped puede ser un microorganismo unicelular, por ejemplo, un procarionta, o un microorganismo no unicelular, por ejemplo, un eucariota.

[0139] Microorganismos unicelulares útiles son las células bacterianas tales como bacterias gram positivas que incluyen, pero no se limitan a, una célula de *Bacillus*, por ejemplo, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus brevis*, *Bacillus circulans*, *Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus thuringiensis*; o una célula de *Streptomyces*, por ejemplo, *Streptomyces lividans* y *Streptomyces murinus*, o bacterias gram negativas tales como *E. coli* y *Pseudomonas sp.* En un aspecto preferido, la célula huésped bacteriana es una célula de *Bacillus lentus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus* o *Bacillus subtilis*. En otro aspecto preferido, la célula de *Bacillus* es un *Bacillus* alcalofílico.

[0140] La introducción de un vector en una célula huésped bacteriana puede, por ejemplo, efectuarse mediante la transformación de protoplastos (ver, por ejemplo, Chang y Cohen, 1979, *Molecular General Genetics* 168: 111-115), usando células competentes (ver, por ejemplo, Young y Spizzin, 1961, *Journal of Bacteriology* 81: 823-829, o Dubnau y Davidoff-Abelson, 1971, *Journal of Molecular Biology* 56: 209-221), electroporación (ver, por ejemplo, Shigekawa y Dower, 1988 *Biotechniques* 6: 742-751) o conjugación (ver, por ejemplo, Koehler y Thorne, 1987, *Journal of Bacteriology* 169: 5771-5278).

[0141] La célula huésped también puede ser un eucariota, tal como una célula de mamífero, insecto, planta o fúngica.

[0142] En un aspecto preferido, la célula huésped es una célula fúngica. "Hongos" tal y como se utiliza en este documento incluye los fila Ascomycota, Basidiomycota, Chytridiomycota y Zygomycota (según definieron Hawkswort *et al.*, In, Ainsworth and Bisby's Dictionary of The Fungi, 8ª edición, 1995, CAB International, University Press, Cambridge, Reino Unido) así como los Oomycota (según se cita en Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*, página 171) y todos hongos mitospóricos (Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*).

[0143] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula de levadura. "Levadura" tal y como se utiliza en este documento incluye levadura ascoesporógena (Endomycetales), levadura basidioesporógena y levadura perteneciente a los Fungi Imperfecti (Blastomycetes). Puesto que la clasificación de levadura puede cambiar en el futuro, para los fines de esta invención, la levadura debe definirse como se describe en *Biology and Activities of Yeast* (Skinner, F.A., Passmore, S.M., y Davenport, R.R., eds, Soc. App. Bacteriol. Serie de simposio N° 9, 1980).

[0144] En un aspecto aún más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Candida*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

[0145] En un aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*,

*Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.

En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Kluyveromyces lactis*.

En otro aspecto más preferido, la célula huésped de levadura es una célula de *Yarrowia lipolytica*.

5 [0146] En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica es una célula fúngica filamentosa. "Fúngica filamentosa" incluye todas las formas filamentosas de la subdivisión Eumycota y Oomycota (tal como definen Hawkswort *et al.*, 1995, *supra*).

Los hongos filamentosos se caracterizan generalmente por una pared micelial compuesta por quitina, celulosa, glucano, quitosano, manano y otros polisacáridos complejos.

10 El crecimiento vegetativo se produce mediante alargamiento hifal y el catabolismo de carbono es estrictamente aeróbico.

En cambio, el crecimiento vegetativo por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae* se realiza mediante el injerto de un talo unicelular y el catabolismo de carbono puede ser fermentativo.

15 [0147] En un aspecto incluso más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bjerkandera*, *Ceriporiopsis Coprinus*, *Coriolus*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Phanerochaete*, *Phlebia*, *Piromyces*, *Pleurotus*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, *Trametes* o *Trichoderma*.

20 [0148] En un aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*.

25 En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochroum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*.

30 En otro aspecto más preferido, la célula huésped fúngica filamentosa es una célula de las cepas *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis aneirina*, *Ceriporiopsis caregiea*, *Ceriporiopsis gilvescens*, *Ceriporiopsis pannocinta*, *Ceriporiopsis rivulosa*, *Ceriporiopsis subrufa* o *Ceriporiopsis subvermisporea*, *Coprinus cinereus*, *Coriolus hirsutus*, *Humicola insolens*, *Humicola lanuginosa*, *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus eryngii*, *Thielavia terrestris*, *Trametes villosa*, *Trametes versicolor*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

35 [0149] Las células fúngicas se pueden transformar mediante un proceso que implica formación de protoplastos, transformación de los protoplastos y regeneración de la pared celular de una manera conocida *per se*. Los procedimientos adecuados para la transformación de células huésped de *Aspergillus* y *Trichoderma* se describen en EP 238 023 y Yelton *et al.*, 1984, Proceedings of the National Academy of Sciences EE.UU. 81: 1470-1474. Los métodos adecuados para transformar especies de *Fusarium* son descritos por Malardier *et al.*, 1989, Gene 78: 147-156 y WO 96/00787. La levadura se puede transformar utilizando los procedimientos descritos por Becker y Guarente, In Abelson, J.N. y Simon, M.I., editores, Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Methods in Enzymology, volumen 194, págs 182-187, Academic Press, Inc., Nueva York; Ito *et al.*, 1983, Journal of Bacteriology 153: 163; y Hinnen *et al.*, 1978, Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75: 1920.

#### Métodos de producción

50 [0150] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula, que en su forma tipo salvaje sea capaz de producir el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido. Preferiblemente, la célula es del género *Aspergillus*, y más preferiblemente *Aspergillus oryzae*.

55 [0151] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y (b) recuperar el polipéptido.

60 [0152] La presente invención también se refiere a métodos para producir un polipéptido de la presente invención, que comprenden (a) cultivar una célula huésped bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido, donde la célula huésped comprende una secuencia mutante de nucleótidos que tiene al menos una mutación en la región codificante del polipéptido maduro de la SEC ID N° 1, donde la secuencia mutante de nucleótidos codifica un polipéptido que es una lipasa que comprende o que está compuesta por el polipéptido de la SEC ID N° 2, y (b) recuperar el polipéptido.

65 En una realización preferida la secuencia de nucleótidos codifica un polipéptido que es una lipasa que comprende o que está compuesta por la parte madura del polipéptido de la SEC ID N° 2, y (b) recuperar el polipéptido.

[0153] En los métodos de producción de la presente invención, las células se cultivan en un medio nutritivo adecuado para la producción de polipéptidos utilizando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la célula se puede cultivar mediante cultivo en matraz de agitación y fermentación a pequeña escala o a gran escala (incluyendo fermentación continua, por lote, lote alimentado o de estado sólido) en fermentadores de laboratorio o industriales realizada en un medio adecuado y bajo condiciones que permitan al polipéptido ser expresado y/o aislado.

El cultivo tiene lugar en un medio nutritivo adecuado que comprende fuentes de nitrógeno y carbono y sales inorgánicas, usando procedimientos conocidos en la técnica. Los medios adecuados están disponibles en proveedores comerciales o se pueden preparar según composiciones publicadas (por ejemplo, en catálogos de la American Type Culture Collection).

Si el polipéptido se segrega en el medio nutritivo, se puede recuperar directamente del medio.

Si el polipéptido no se segrega, se puede recuperar de lisados celulares.

[0154] Los polipéptidos se pueden detectar utilizando métodos conocidos en la técnica que son específicos para los polipéptidos.

Estos métodos de detección pueden incluir el uso de anticuerpos específicos, la formación de un producto enzimático o la desaparición de un sustrato enzimático.

Por ejemplo, un ensayo enzimático se puede usar para determinar la actividad del polipéptido tal y como se describe en este documento.

[0155] El polipéptido resultante se puede recuperar utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, el polipéptido se puede recuperar del medio nutritivo a través de procedimientos convencionales que incluyen, pero no se limitan a, centrifugación, filtración, extracción, secado por pulverización, evaporación o precipitación.

[0156] Los polipéptidos de la presente invención se pueden purificar mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica que incluyen, pero no se limitan a, cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, hidrofóbica, de cromatografía de exclusión de tamaño), solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitado de sulfato amónico), SDS-PAGE, o extracción (ver, por ejemplo, Protein Purification, J.-C. Janson y Lars Riden, editores, VCH Publishers, Nueva York, 1989).

#### Composiciones

[0157] La presente invención también se refiere a composiciones que comprenden un polipéptido de la presente invención.

Preferiblemente, las composiciones están enriquecidas con dicho polipéptido.

El término "enriquecido" indica que la actividad de lipasa de la composición se ha incrementado, por ejemplo, en un factor de enriquecimiento de 1,1.

[0158] La composición puede comprender un polipéptido de la presente invención como componente enzimático principal, por ejemplo, una composición monocomponente.

Alternativamente, la composición puede comprender actividades enzimáticas múltiples, tales como aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, haloperoxidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peptidoglucaminasa, peroxidasa, fitasa, polifenoloxidasas, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa o xilanasas.

La(s) enzima(s) adicional(es) puede(n) ser producida(s), por ejemplo, por un microorganismo perteneciente al género *Aspergillus*, preferiblemente *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger* o *Aspergillus oryzae*; *Fusarium*, preferiblemente *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides* o *Fusarium venenatum*; *Humicola*, preferiblemente *Humicola insolens* o *Humicola lanuginosa*; o *Trichoderma*, preferiblemente *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0159] Las composiciones polipeptídicas se pueden preparar conforme a métodos conocidos en la técnica y pueden estar en forma de composición líquida o seca.

Por ejemplo, la composición de polipéptido puede ser en forma de un granulado o un microgranulado.

El polipéptido que se va a incluir en la composición se puede estabilizar conforme a métodos conocidos en la técnica.

[0160] Más adelante se dan ejemplos de usos preferidos de las composiciones polipeptídicas de la invención.

Se pueden determinar las dosis de la composición polipeptídica de la invención y otras condiciones bajo las que se usa la composición basándose en métodos conocidos en la técnica.

Aplicaciones detergentes

[0161] La enzima de la invención puede añadirse y, de este modo, hacerse componente de una composición de detergente.

5 [0162] La composición de detergente de la invención puede, por ejemplo, ser formulada como una composición de detergente de lavandería para lavado a mano o a máquina, que incluye una composición de aditivo para lavado adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición de suavizante de tejidos para añadir durante el aclarado; o ser formulada como una composición de detergente para usar en operaciones domésticas  
10 generales de limpieza de superficies duras; o ser formulada para operaciones de lavado de vajillas a mano o a máquina.

Enzimas

15 [0163] En un aspecto específico, la invención proporciona un aditivo para detergente que comprende la enzima de la invención.

El aditivo para detergente, así como la composición de detergente pueden comprender una o varias enzimas adicionales tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanas, una oxidasa, por ejemplo, una lacasa y/o  
20 una peroxidasa.

[0164] En general las propiedades de la(s) enzima(s) elegida(s) deben ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la(s) enzima(s) debe(n) estar presente(s) en cantidades eficaces.

25 Proteasas:

[0165] Las proteasas adecuadas incluyen aquellas de origen animal, vegetal o microbiano.  
Se prefiere el origen microbiano.

30 Se incluyen mutantes químicamente modificados o diseñados genéticamente de proteínas.  
La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, preferiblemente una proteasa microbiana alcalina o una proteasa de tipo tripsina.

Ejemplos de proteasas alcalinas son las subtilisinas, especialmente aquellas obtenidas a partir de Bacillus, por ejemplo, la subtilisina Novo, la subtilisina Carlsberg, la subtilisina 309, la subtilisina 147 y la subtilisina 168 (descrita en WO 89/06279).

35 Ejemplos de proteasas de tipo tripsina son la tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino) y la proteasa de Fusarium descrita en WO 89/06270 y WO 94/25583.

[0166] Ejemplos de proteasas útiles son las variantes descritas en WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116, y  
40 WO 98/34946, especialmente las variantes con sustituciones en una o varias de las siguientes posiciones: 27, 36, 57, 68, 76, 87, 97, 101, 104, 106, 120, 123, 167, 170, 194, 206, 218, 222, 224, 235, 245, 252 y 274, y entre otras variantes con las mutaciones siguientes: (K27R, V104Y, N123S, T124A), (N76D, S103A, V104I) o (S101G, S103A, V104I, G159D, A232V, Q236H, Q245R, N248D, N252K).

45 [0167] Las enzimas proteasas preferidas disponibles comercialmente incluyen Alcalase™, Savinase™, Primase™, Duralase™, Esperase™, Coronase™, Polarzyme™ y Kannase™ (Novozymes A/S), Maxatase™, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect™, Purafect Prime™, Purafect OxP™, FN2, FN3 y FN4 (Genencor International Inc.).

50 Lipasas:

[0168] Las lipasas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico.

Se incluyen mutantes químicamente modificados o diseñados genéticamente de proteínas.

55 Los ejemplos de lipasas útiles incluyen lipasas de Humicola (sinónimo de Thermomyces), por ejemplo de H. lanuginosa (sinónimo de T. lanuginosus) tal y como se describe en EP 258 068 y EP 305 216 o de H. insolens tal y como se describe en WO 96/13580, una lipasa de Pseudomonas, por ejemplo de P. alcaligenes o P. pseudoalcaligenes (EP 218 272), P. cepacia (EP 331 376), P. stutzeri (GB 1,372,034), P. fluorescens, cepa SD 705 de Pseudomonas sp. (WO 95/06720 y WO 96/27002), P. wisconsinensis (WO 96/12012), una lipasa de Bacillus, por ejemplo de B. subtilis (Dartois et al. (1993), Biochemica et Biophysica Acta, 1131,253-360), B. stearothermophilus (JP 64/744992) o B. pumilus (WO 91/16422).

[0169] Otros ejemplos son variantes de lipasa tales como las descritas en WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407 225, EP 260 105, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 y WO 97/07202.

65 [0170] Otros ejemplos de enzimas lipasa disponibles comercialmente incluyen Lipolase™, Lipolase Ultra™ y Lipex™

(Novozymes A/S).

[0171] Las lipasas preferidas son las lipasas de la presente invención.

5 Amilasas:

[0172] Las amilasas adecuadas ( $\alpha$  y/o  $\beta$ ) incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico.

Se incluyen mutantes químicamente modificados o diseñados genéticamente de proteínas.

10 Las amilasas incluyen, por ejemplo,  $\alpha$ -amilasas obtenidas de Bacillus, por ejemplo, una cepa especial de B. licheniformis, descrita con más detalle en GB 1,296,839.

[0173] Ejemplos de amilasas útiles son las variantes descritas en WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873 y WO 97/43424, especialmente las variantes con sustituciones en una o varias de las siguientes posiciones: 15, 23, 105, 106, 124, 128, 133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 y 444.

15 [0174] Amilasas disponibles comercialmente son Duramyl™, Termamyl™, Stainzyme™, Stainzyme Ultra™, Fungamyl™ y BAN™ (Novozymes A/S), Rapidase™ y Purastar™ (de Genencor International Inc.).

20 Celulasas:

[0175] Las celulasas adecuadas incluyen aquellas de origen bacteriano o fúngico.

Se incluyen mutantes químicamente modificados o diseñados genéticamente de proteínas.

25 Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros Bacillus, Pseudomonas, Humicola, Fusarium, Thielavia, Acremonium, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas a partir de Humicola insolens, Myceliophthora thermophila y Fusarium oxysporum descritas en US 4,435,307, US 5,648,263, US 5,691,178, US 5,776,757 y WO 89/09259.

[0176] Celulasas especialmente adecuadas son las celulasas alcalinas o neutras que tienen beneficios para el cuidado del color.

30 Ejemplos de tales celulasas son las celulasas descritas en EP 0 495 257, EP 0 531 372, WO 96/11262, WO 96/29397, WO 98/08940.

Otros ejemplos son las variantes de celulasa tales como las descritas en WO 94/07998, EP 0 531 315, US 5,457,046, US 5,686,593, US 5,763,254, WO 95/24471, WO 98/12307 y PCT/DK98/00299.

35 [0177] Las celulasas disponibles comercialmente incluyen Renozyme™, Celluzyme™ y Carezyme™ (Novozymes A/S), Clazinase™ y Puradax HA™ (Genencor International Inc.), y KAC-500(B)™ (Kao corporación).

Peroxidasas/oxidadas:

40 [0178] Las peroxidasas/oxidadas adecuadas incluyen aquellas de origen vegetal, bacteriano o fúngico.

Se incluyen mutantes químicamente modificados o diseñados genéticamente de proteínas.

Los ejemplos de peroxidasas útiles incluyen peroxidasas de Coprinus, por ejemplo, de C. cinereus y variantes de las mismas como las descritas en WO 93/24618, WO 95/10602 y WO 98/15257.

45 [0179] Las peroxidasas disponibles comercialmente incluyen Guardzyme™ (Novozymes A/S).

Detergentes

50 [0180] La(s) enzima(s) para detergente se puede(n) incluir en una composición de detergente añadiendo aditivos separados que contengan una o varias enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprenda todas estas enzimas.

Un aditivo de detergente de la invención, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, se puede formular, por ejemplo, como un granulado, un líquido, una pasta, etc. Las formulaciones preferidas de los aditivos para detergente son granulados, en particular granulados no pulverulentos, líquidos, en particular líquidos estabilizados o pastas.

60 [0181] Los granulados no pulverulentos se pueden producir, por ejemplo, como se describe en US 4,106,991 y 4,661,452 y se pueden recubrir opcionalmente mediante métodos conocidos en la técnica. Ejemplos de materiales de recubrimiento ceroso son productos de poli(oxietileno) (polietilenglicol, PEG) con pesos molares medios de 1000 a 20 000; nonilfenoles etoxilados con de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que hay de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos.

Ejemplos de materiales de recubrimiento que forman películas adecuados para su aplicación mediante técnicas de lecho fluidificado se dan en GB 1483591.

65 Los preparados enzimáticos líquidos pueden, por ejemplo, estabilizarse añadiendo un poliol tal como propilenglicol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos.

Las enzimas protegidas se pueden preparar según el método descrito en EP 238,216.

[0182] La composición de detergente de la invención puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, en barra, en comprimido, en polvo, en gránulos, en pasta o en líquido.

5 Un detergente líquido puede ser acuoso, típicamente con un contenido de hasta un 70 % de agua y 0-30 % de solvente orgánico, o puede ser no acuoso.

[0183] La composición de detergente comprende uno o varios surfactantes, que pueden ser no iónicos incluyendo semipolar y/o aniónico y/o catiónico y/o zwitteriónico.

10 Los surfactantes están típicamente presentes en una cantidad del 0 % al 60 % en peso.

[0184] Cuando está incluido en el mismo, el detergente normalmente contendrá aproximadamente de un 0 % a un 40 % de un surfactante aniónico tal como sulfonato de alquilbenceno lineal, sulfonato de alfa-olefina, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxi sulfato alcohólico, alcano sulfonato secundario, alfa-sulfo metil éster de ácidos grasos, ácido alquil succínico o alquenil succínico o jabón.

15

[0185] Cuando está incluido en el mismo, el detergente normalmente contendrá aproximadamente de un 0 % a un 40 % de un surfactante no iónico tal como alcohol etoxilado, nonilfenol etoxilado, alquilpoliglucósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, polihidroxi alquil amida de ácido graso o los derivados de N-acilo N-alquilo de glucosamina ("glucamidas").

20

[0186] El detergente puede contener 0-65 % de un mejorador de detergente o de un agente complejante tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminotetraacético, ácido dietilentriaminopentaacético, ácido alquil succínico o alquenil succínico, silicatos solubles o silicatos estratificados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst).

25

[0187] El detergente puede comprender uno o varios polímeros.

Algunos ejemplos son carboximetilcelulosa, poli(vinilpirrolidona), poli(etilenglicol), alcohol (poli)vinílico, N-óxido de (poli)vinilpiridina, poli(vinilimidazol), policarboxilatos tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maléico/acrílico y copolímeros de ácido acrílico/ lauril metacrilato.

30

[0188] El detergente puede contener un sistema blanqueador que puede incluir una fuente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tal como perborato o percarbonato que se puede combinar con un activador de blanqueo que forma perácido como, por ejemplo, tetraacetilendiamina o nonanoiloxibencenosulfonato.

35 Alternativamente, el sistema blanqueador puede incluir peroxiácidos, por ejemplo, de los tipos amida, imida o sulfona.

[0189] La(s) enzima(s) de la composición de detergente de la invención se puede(n) estabilizar utilizando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol tal como propilenglicol o glicerol, un azúcar o alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, o un derivado de ácido bórico, por ejemplo, un éster de borato aromático, o un derivado de ácido fenilborónico tal como el ácido 4-formil fenilborónico, y la composición se puede formular como se describe, por ejemplo, en WO 92/19709 y WO 92/19708.

40

[0190] El detergente también puede contener otros ingredientes de detergentes convencionales tales como, por ejemplo, acondicionadores de tejidos incluyendo arcillas, espumantes, supresores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes suspensores de suciedad, agentes antirredeposición de suciedad, colorantes, bactericidas, blanqueadores ópticos, hidrótropos, inhibidores de la decoloración o perfumes.

45

[0191] Se considera actualmente que en las composiciones de detergente cualquier enzima, en particular la enzima de la invención, se puede añadir en una cantidad que corresponde a 0,001-100 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, tal como 0,01-50 mg o 0,03-30 mg, preferiblemente 0,05-5 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado, en particular 0,1-1 mg de proteína enzimática por litro de solución de lavado.

50

[0192] La enzima de la invención se puede incorporar además a las formulaciones de detergente descritas en WO 97/07202, WO 04/041979 y WO 04/074419.

55

Usos

[0193] La presente invención está dirigida también a métodos para utilizar los polipéptidos que tienen actividad de lipasa.

60

[0194] Las variantes de la invención se pueden usar en aplicaciones conocidas de las enzimas lipolíticas por analogía con la técnica previa, por ejemplo:

Una variante con actividad de lipasa se puede usar en la industria papelera para eliminar la resina o la tinta del papel usado.

65

WO 9213130, WO 9207138, JP 2160984 un, EP 374700.

[0195] Se puede usar una variante con actividad de fosfolipasa y/o galactolipasa en la preparación de masa, pan y pasteles, por ejemplo, para aumentar la estabilidad de la masa y sus propiedades, o para mejorar la elasticidad del pan o del pastel.

5 WO 94/04035, WO 00/32758.

[0196] Una variante con actividad de fosfolipasa se puede usar en un proceso para la reducción del contenido de fosfolípidos en un aceite para el consumo alimentario.

10 US 5,264,367 (Metallgesellschaft, Röhm); K. Dahlke & H. Buchold, INFORM, 6 (12), 1284-91 (1995); H. Buchold, Fat Sci. Technol., 95 (8), 300-304 (1993); JP-A 2-153997 (Showa Sangyo); o EP 654,527 (Metallgesellschaft, Röhm).

[0197] Una variante con actividad de lisofosfolipasa puede utilizarse para mejorar la filtrabilidad de una solución acuosa o una pasta procedente de carbohidratos, por ejemplo, un hidrolizado de almidón, especialmente un hidrolizado de almidón de trigo.

15 EP 219,269.

[0198] Una variante con actividad de fosfolipasa se puede usar para preparar lisofosfolípidos, por ejemplo, lisolecitina (EP 870840, JP-A 10-42884, JP-A 4-135456 o JP-A 2-49593) para la producción de mayonesa (EP 628256, EP 398666 o EP 319064).

20 [0199] Una variante con actividad de fosfolipasa también se puede usar en el procesamiento de lácteos y otros productos alimenticios, por ejemplo, según se describe en EP 567,662 (Nestlé), EP 426,211 (Unilever), EP 166,284 (Nestlé), JP-A 57-189638 (Yakult) o US 4,119,564 (Unilever).

25 [0200] Una variante con actividad de fosfolipasa se puede usar en la industria de cuero.

GB 2233665, EP 505920.

[0201] Una variante con actividad de lipasa se puede utilizar para eliminar materia grasa que contenga ésteres hidrófobos (por ejemplo, triglicéridos) durante el acabado de tejidos.

30 WO 93/13256.

[0202] La presente invención se describe además mediante los ejemplos siguientes que no deberían interpretarse como una limitación al alcance de la invención.

### 35 Ejemplos

[0203] Los productos químicos usados como tampones y sustratos eran productos comerciales de al menos calidad reactiva.

### 40 Medios y soluciones

Producto	Nombre comercial
LAS:	Surfac PS
Zeolita A	Wessalith P

### 45 Materiales

Producto	Proveedor
EMPA221	EMPA St. Gallen, Lerchfeldstrasse 5, CH-9014 St. Gallen, Suiza

### 50 Ejemplo 1

#### Producción de enzima

[0204] Un plásmido que contiene el gen que codifica la lipasa se construye y transforma en una célula huésped adecuada que usa métodos estándar de la técnica.

55 [0205] La fermentación se realiza como fermentación por lote alimentado usando una temperatura constante del medio de 34°C y un volumen de inicio de 1,2 litros.  
El pH inicial del medio se fija en 6,5.

Una vez que el pH ha aumentado hasta 7,0 este valor se mantiene a través de la adición de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> del 10 %.

60 El nivel de oxígeno disuelto en el medio se controla variando la tasa de agitación y utilizando una tasa de aireación fija de 1,0 litros de aire por litro de medio por minuto.

La tasa de adición de pienso se mantiene a un nivel constante durante toda la fase de lote alimentado.

El medio del lote contiene jarabe de maltosa como fuente de carbono, extracto de urea y levadura como fuente de nitrógeno y una mezcla de oligoelementos metálicos y sales.

65 El pienso añadido continuamente durante la fase lote alimentado contiene jarabe de maltosa como fuente de carbono mientras que el extracto de levadura y urea se añade para asegurar un suministro suficiente de nitrógeno.

[0206] La purificación de la lipasa puede realizarse usando métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante la filtración del sobrenadante de fermentación y posterior cromatografía hidrofóbica y de intercambio de iones, por ejemplo, tal y como se describe en EP 0 851 913 EP, ejemplo 3.

5 Ejemplo 2

AMSA - ensayo de esfuerzo mecánico automático - para calcular el RR

10 [0207] Las variantes enzimáticas de la presente aplicación son evaluadas utilizando el ensayo de esfuerzo mecánico automático (AMSA). Con la prueba AMSA se puede examinar el rendimiento de lavado de una gran cantidad de soluciones de detergente enzimático de volumen pequeño.

La placa AMSA tiene varias ranuras para soluciones de prueba y una tapa que tensa con firmeza la muestra de tejido que se va a lavar contra todas las aberturas de las ranuras.

15 Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de prueba, el tejido y la tapa se agitan energicamente para poner la solución de prueba en contacto con el tejido y aplicar la tensión mecánica.

Para una descripción en más detalle ver WO 02/42740, especialmente el párrafo "Realizaciones especiales de los métodos" en las páginas 23-24.

20 Los contenedores, que contienen la solución detergente de prueba, consisten en agujeros cilíndricos (6 mm de diámetro, 10 mm de profundidad) en una lámina metálica.

El tejido manchado (material de prueba) se extiende sobre las placas metálicas y se usa como tapa y sellado de los contenedores.

Otra placa metálica se extiende sobre el tejido manchado para evitar que haya derrames desde los contenedores.

25 Las dos placas metálicas junto con el tejido manchado vibran hacia arriba y hacia abajo a una frecuencia de 30 Hz con una amplitud de 2 mm.

[0208] El ensayo se lleva a cabo bajo las siguientes condiciones experimentales específicas:

Tabla 1

30

Solución de prueba	0,5 g/l LAS 0,52 g/l Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1,07 g/l Zeolita A 0,52 g/l Na <sub>3</sub> Citrato
Volumen de la solución de prueba	160 µl
pH	Tal cual (≈9,9)
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	30°C
Dureza del agua	15°dH proporción de Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> /NaHCO <sub>3</sub> : 4:1:7,5
Concentración enzimática en la solución de prueba	0,125, 0,25, 0,50, 1,0 mg pe/l
Secado	Rendimiento de lavado: después del lavado, las piezas de tejido se aclaran inmediatamente con agua del grifo y se secan con aire a 85°C en 5 min. Mal olor: después del lavado, las piezas de tejido se aclaran inmediatamente con agua del grifo y se secan a temperatura ambiente (20°C) durante 2 horas
Material de prueba	Muestra de crema-cúrcuma según se describe a continuación (EMPA221 usado como tejido de algodón)

[0209] Las muestras de crema-cúrcuma se prepararon mezclando 5g de cúrcuma (Santa Maria, Dinamarca) con 100g crema (38 % grasa, Aria, Dinamarca) a 50°C, la mezcla se dejó a esta temperatura durante aproximadamente 20 minutos y se filtró (50°C) para eliminar cualquier partícula no disuelta.

35 La mezcla se enfrió hasta 20°C y se sumergieron muestras de algodón tejido, EMPA221, en la mezcla de crema-cúrcuma, después se dejaron secar a temperatura ambiente durante la noche y se congelaron hasta su uso. La preparación de las muestras de crema-cúrcuma se describe en la patente WO 2006/125437.

40 [0210] El rendimiento de la variante enzimática se mide como el brillo del color de las muestras de tejido lavadas con esa variante enzimática específica.

El brillo puede también expresarse como la intensidad de la luz reflejada de la muestra de tejido cuando es iluminada con luz blanca.

Cuando el tejido se mancha, la intensidad de la luz reflejada es menor que la de un tejido limpio.

45 Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada puede utilizarse para medir el rendimiento lavado de una variante enzimática.

[0211] Las mediciones de color se han realizado con un escáner profesional de cama plana (PFU DL2400pro), que se utiliza para capturar una imagen de las muestras de tejido lavadas.

Las exploraciones se han realizado con una resolución de 200 dpi y con una profundidad de color de salida de 24 bits.

5 Para obtener resultados precisos, el escáner se calibra con frecuencia con un target IT8 reflectante de Kodak.

[0212] Para extraer un valor para la intensidad lumínica de las imágenes escaneadas, se usa una aplicación de software especialmente diseñada (Novozymes Color Vector Analyzer).

10 El programa recupera los valores de los píxeles de 24 bits de la imagen y los convierte en valores para rojo, verde y azul (RGB). El valor de intensidad (Int) se calcula sumando los valores RGB como vectores y luego tomando la longitud del vector resultante:

$$Int = \sqrt{r^2 + g^2 + b^2}$$

15 [0213] El rendimiento de lavado (R) de las variantes se calcula de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$P = Int(v) - Int(r)$$

Donde

Int(v) es el valor de intensidad lumínica de la superficie textil lavada con enzima, e

Int(r) es el valor de intensidad lumínica de la superficie textil lavada sin enzima.

20 [0214] Una puntuación de rendimiento relativo se da como resultado del lavado AMSA conforme a la definición: Las puntuaciones de rendimiento relativo (RR) suman los rendimientos (R) de las variantes enzimáticas examinadas contra la enzima de referencia:

$$RP: P(\text{enzima examinada})/P(\text{enzima de referencia})$$

25 RPavg indica el rendimiento relativo promedio comparado con la enzima de referencia en las tres concentraciones enzimáticas (0,125, 0,25, 0,5, 1,0 mg pe/l)

$$RP_{avg} = \text{avg}(RP(0.125), RP(0.25), RP(0.5), RP(1.0))$$

30 [0215] Se considera que una variante muestra rendimiento de lavado mejorado si tiene mayor rendimiento que la referencia.

En el contexto de la presente invención la enzima de referencia es la parte madura de la SEC ID N° 2 con las sustituciones T231 R + N233R.

35 Ejemplo 3

**GC - Cromatógrafo de Gas - para calcular el factor de riesgo**

40 [0216] La liberación de ácido butírico a partir de las muestras lavadas con lipasa se midió mediante cromatografía de gases por microextracción en fase sólida (SPME-GC) utilizando el método siguiente.

Cuatro piezas de tejido (5 mm de diámetro), lavadas en la solución especificada en la tabla 1 que contiene 1 mg / L de lipasa, se transfirieron a un vial del cromatógrafo de Gas (GC).

45 Las muestras se analizaron en un Varian 3800 GC equipado con una columna Stabilwax- DA con Integra-Guard (30 m, 0,32 mm DI y 0,25 µm de espesor) y una fibra de Carboxeno PDMS para SPME (75 µm).

Cada muestra fue preincubada durante 10 min a 40°C seguido de 20 min de muestreo con la fibra para SPME en el espacio vacío sobre las piezas de tejido.

La muestra se inyectó a continuación sobre la columna (temperatura del inyector = 250°C).

Flujo de columna = 2 ml helio/min.

50 Gradiente de temperatura del horno de columna: 0 min = 40°C, 2 min = 40°C, 22 min = 240°C, 32 min = 240°C. El ácido butírico se detectó mediante FID y la cantidad de ácido butírico se calculó basándose en una curva estándar de ácido butírico.

55 [0217] El riesgo rendimiento-mal olor, R, de una variante de lipasa es la proporción entre la cantidad de ácido butírico liberado de la muestra lavada con la variante de lipasa y la cantidad de ácido butírico liberado de una muestra lavada con la parte madura de la lipasa de la SEC ID N° 2, después de que ambos valores hayan sido

## ES 2 601 327 T3

corregidos respecto a la cantidad de ácido butírico liberado de una muestra lavada sin lipasa. El riesgo (R) de las variantes se calcula de acuerdo con la fórmula siguiente:

5 Olor = medido en micro g de ácido butírico desarrollado a 1 mg de proteína enzimática / l corregido para blanco

$$\text{Alfa}_{\text{enzima de prueba}} = \text{Olor}_{\text{enzima de prueba}} - \text{Blanco}$$

10

$$\text{Alfa}_{\text{enzima de referencia}} = \text{Olor}_{\text{enzima de referencia}} - \text{Blanco}$$

$$R = \text{Alfa}_{\text{enzima de prueba}} / \text{Alfa}_{\text{enzima de referencia}}$$

15 Se considera que una variante muestra un mal olor reducido en comparación con la referencia, si el factor R es inferior a 1.

### Ejemplo 4

#### 20 Actividad (UL) con respecto a la absorbancia a 280nm

[0218] La actividad de una lipasa con respecto a la absorbancia a 280 nm se determina mediante el ensayo siguiente:

25 UL/A280:

[0219] Se prepara un sustrato para lipasa emulsionando tributirina (glicerina tributirato) usando goma arábica como emulsionante.

Se sigue la hidrólisis de tributirina a 30 °C a pH 7 o 9 en un experimento de titulación con pH-stat.

30 Una unidad de actividad de lipasa (1 UL) equivale a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 μmol de ácido butírico/min a pH 7.

[0220] Se mide la absorbancia de la lipasa purificada a 280 nm (A280) y se calcula la proporción UL/A280.

La UL/A280 relativa se calcula como la UL/A280 de la variante dividida por la UL/A280 de una enzima de referencia.

35 En el contexto de la presente invención la enzima de referencia es la parte madura de la SEC ID N° 2 con las mutaciones T231 R y N233R.

### Ejemplo 5

#### 40 RB – riesgo-beneficio

[0221] El factor riesgo-beneficio que describe el rendimiento en comparación con el riesgo reducido de mal olor se define de esta forma como:

$$BR = RP_{\text{avg}} / R$$

45

[0222] Se considera que una variante muestra un rendimiento de lavado mejorado y mal olor reducido, si el factor RB es superior a 1.

50 [0223] Aplicando los métodos anteriores se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2

Variante	Mutaciones en la parte madura del polipéptido de la SEC ID N° 2	RR	BR	UL/A280
1	I202G + T231 R + N233R	0,84	1,41	No determinada
2	I86V + L227G + T231 R + N233R + P256K	1,08	1,52	1700
3	Q4V + S58N + V60S + T231 R + N233R	0,87	1,73	1950
4	S58N + V60S + I90R + T231 R, N233R	1,06	1,27	2250
5	I255Y + T231 R + N233R	1,19	1,17	3600
6	I90A + T231 R + N233R + I255V	1,13	1,14	2700
Referencia	T231 R + N233R	1,00	1,00	3650

# ES 2 601 327 T3

7	G91A + E99K + T231 R+N233R + Q249R + 270H + 271T + 272P + 273S + 274S + 275G + 276R + 277G + 278G + 279H + 280R	0,43	No determinado	850
8	G91A + E99K + T231 R, N233R + Q249R + 270H + 271T + 272P + 273S + 274S + 275G + 276R + 277G + 278G	0,13	No determinado	500

La lipasa de referencia y las variantes 7 y 8 en la tabla 2 se describen en WO 2000/060063.

## 5 LISTADO DE SECUENCIAS

```

<110>  Novozymes A/S
        Novozymes North America, Inc.
        Vind, Jesper
10      Borch, Kim
        Mikkelsen, Mikael

<120>  Polipéptidos con actividad de lipasa

15     <130>  10927.204-WO

        <160>  18

        <170>  PatentIn version 3.4
20

        <210>  1
        <211>  873
        <212>  DNA
        <213>  Thermomyces lanuginosus
25

        <220>
        <221>  CDS
        <222>  (1)..(873)
30

        <220>
        <221>  sig_peptide
        <222>  (1)..(51)

35     <220>
        <221>  propep
        <222>  (52)..(66)

        <220>
40     <221>  mat_peptide
        <222>  (67)..()

        <400>  1
45     atg agg agc tcc ctt gtg ctg ttc ttt gtc tct gcg tgg acg gcc ttg           48
        Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
        -20                               -15                               -10

        gcc agt cct att cgt cga gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc           96
        Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
        -5                               -1  1                               5                               10

        aat ctc ttt gca cag tat tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat           144
        Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
    
```

ES 2 601 327 T3

	15					20					25						
5	gat	gcc	cca	gct	ggt	aca	aac	att	acg	tgc	acg	gga	aat	gcc	tgc	ccc	192
	Asp	Ala	Pro	Ala	Gly	Thr	Asn	Ile	Thr	Cys	Thr	Gly	Asn	Ala	Cys	Pro	
				30					35					40			
10	gag	gta	gag	aag	gcg	gat	gca	acg	ttt	ctc	tac	tcg	ttt	gaa	gac	tct	240
	Glu	Val	Glu	Lys	Ala	Asp	Ala	Thr	Phe	Leu	Tyr	Ser	Phe	Glu	Asp	Ser	
			45						50					55			
15	gga	gtg	ggc	gat	gtc	acc	ggc	ttc	ctt	gct	ctc	gac	aac	acg	aac	aaa	288
	Gly	Val	Gly	Asp	Val	Thr	Gly	Phe	Leu	Ala	Leu	Asp	Asn	Thr	Asn	Lys	
			60					65					70				
20	ttg	atc	gtc	ctc	tct	ttc	cgt	ggc	tct	cgt	tcc	ata	gag	aac	tgg	atc	336
	Leu	Ile	Val	Leu	Ser	Phe	Arg	Gly	Ser	Arg	Ser	Ile	Glu	Asn	Trp	Ile	
						80					85					90	
25	ggg	aat	ctt	aac	ttc	gac	ttg	aaa	gaa	ata	aat	gac	att	tgc	tcc	ggc	384
	Gly	Asn	Leu	Asn	Phe	Asp	Leu	Lys	Glu	Ile	Asn	Asp	Ile	Cys	Ser	Gly	
					95					100					105		
30	tgc	agg	gga	cat	gac	ggc	ttc	act	tcg	tcc	tgg	agg	tct	gta	gcc	gat	432
	Cys	Arg	Gly	His	Asp	Gly	Phe	Thr	Ser	Ser	Trp	Arg	Ser	Val	Ala	Asp	
				110					115					120			
35	acg	tta	agg	cag	aag	gtg	gag	gat	gct	gtg	agg	gag	cat	ccc	gac	tat	480
	Thr	Leu	Arg	Gln	Lys	Val	Glu	Asp	Ala	Val	Arg	Glu	His	Pro	Asp	Tyr	
			125					130					135				
40	cgc	gtg	gtg	ttt	acc	gga	cat	agc	ttg	ggt	ggt	gca	ttg	gca	act	gtt	528
	Arg	Val	Val	Phe	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Val	
			140					145					150				
45	gcc	gga	gca	gac	ctg	cgt	gga	aat	ggg	tat	gat	atc	gac	gtg	ttt	tca	576
	Ala	Gly	Ala	Asp	Leu	Arg	Gly	Asn	Gly	Tyr	Asp	Ile	Asp	Val	Phe	Ser	
						160					165					170	
50	tat	ggc	gcc	ccc	cga	gtc	gga	aac	agg	gct	ttt	gca	gaa	ttc	ctg	acc	624
	Tyr	Gly	Ala	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Arg	Ala	Phe	Ala	Glu	Phe	Leu	Thr	
					175					180					185		
55	gta	cag	acc	ggc	gga	aca	ctc	tac	cgc	att	acc	cac	acc	aat	gat	att	672
	Val	Gln	Thr	Gly	Gly	Thr	Leu	Tyr	Arg	Ile	Thr	His	Thr	Asn	Asp	Ile	
				190					195					200			
60	gtc	cct	aga	ctc	ccg	ccg	cgc	gaa	ttc	ggt	tac	agc	cat	tct	agc	cca	720
	Val	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro	Arg	Glu	Phe	Gly	Tyr	Ser	His	Ser	Ser	Pro	
			205					210						215			
65	gag	tac	tgg	atc	aaa	tct	gga	acc	ctt	gtc	ccc	gtc	acc	cga	aac	gat	768
	Glu	Tyr	Trp	Ile	Lys	Ser	Gly	Thr	Leu	Val	Pro	Val	Thr	Arg	Asn	Asp	
			220					225					230				
70	atc	gtg	aag	ata	gaa	ggc	atc	gat	gcc	acc	ggc	ggc	aat	aac	cag	cct	816
	Ile	Val	Lys	Ile	Glu	Gly	Ile	Asp	Ala	Thr	Gly	Gly	Asn	Asn	Gln	Pro	
						240						245				250	
75	aac	att	ccg	gat	atc	cct	gcg	cac	cta	tgg	tac	ttc	ggg	tta	att	ggg	864

ES 2 601 327 T3

Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly  
 255 260 265

5 aca tgt ctt  
 Thr Cys Leu

10 <210> 2  
 <211> 291  
 <212> PRT  
 <213> Thermomyces lanuginosus

15 <400> 2

Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu  
 -20 -15 -10

20 Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe  
 -5 -1 1 5 10

25 Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn  
 15 20 25

30 Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro  
 30 35 40

35 Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser  
 45 50 55

40 Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys  
 60 65 70

45 Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile  
 75 80 85 90

50 Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly  
 95 100 105

55 Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp  
 110 115 120

Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr  
 125 130 135

Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val  
 140 145 150

873

ES 2 601 327 T3

Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser  
 155 160 165 170

5 Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr  
 175 180 185

10 Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile  
 190 195 200

15 Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro  
 205 210 215

Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp  
 220 225 230

20 Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro  
 235 240 245 250

25 Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly  
 255 260 265

30 Thr Cys Leu

<210> 3  
 <211> 265  
 35 <212> PRT  
 <213> Absidia reflexa

<400> 3

40 Ser Ser Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile  
 1 5 10 15

45 Lys Ala His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg  
 20 25 30

50 Thr Val Ile Pro Gly Gly Arg Trp Ser Cys Pro His Cys Gly Val Ala  
 35 40 45

Ser Asn Leu Gln Ile Thr Lys Thr Phe Ser Thr Leu Ile Thr Asp Thr  
 50 55 60

55 Asn Val Leu Val Ala Val Gly Glu Lys Glu Lys Thr Ile Tyr Val Val  
 65 70 75 80

ES 2 601 327 T3

Phe Arg Gly Thr Ser Ser Ile Arg Asn Ala Ile Ala Asp Ile Val Phe  
 85 90 95  
 5 Val Pro Val Asn Tyr Pro Pro Val Asn Gly Ala Lys Val His Lys Gly  
 100 105 110  
 10 Phe Leu Asp Ser Tyr Asn Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val  
 115 120 125  
 15 Lys Ala Gln Leu Asp Arg His Pro Gly Tyr Lys Ile Val Val Thr Gly  
 130 135 140  
 His Ser Leu Gly Gly Ala Thr Ala Val Leu Ser Ala Leu Asp Leu Tyr  
 145 150 155 160  
 20 His His Gly His Ala Asn Ile Glu Ile Tyr Thr Gln Gly Gln Pro Arg  
 165 170 175  
 25 Ile Gly Thr Pro Ala Phe Ala Asn Tyr Val Ile Gly Thr Lys Ile Pro  
 180 185 190  
 30 Tyr Gln Arg Leu Val His Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu Pro Pro  
 195 200 205  
 35 Gly Ala Phe Gly Phe Leu His Ala Gly Glu Glu Phe Trp Ile Met Lys  
 210 215 220  
 Asp Ser Ser Leu Arg Val Cys Pro Asn Gly Ile Glu Thr Asp Asn Cys  
 225 230 235 240  
 40 Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr  
 245 250 255  
 45 Leu Asp Met Asn Thr Gly Leu Cys Leu  
 260 265  
 <210> 4  
 50 <211> 264  
 <212> PRT  
 <213> Absidia corymbifera  
 <400> 4  
 55 Ser Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile Lys  
 1 5 10 15

ES 2 601 327 T3

Ala His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg Thr  
20 25 30

5 Val Ile Pro Gly Gly Gln Trp Ser Cys Pro His Cys Asp Val Ala Pro  
35 40 45

10 Asn Leu Asn Ile Thr Lys Thr Phe Thr Thr Leu Ile Thr Asp Thr Asn  
50 55 60

15 Val Leu Val Ala Val Gly Glu Asn Glu Lys Thr Ile Tyr Val Val Phe  
65 70 75 80

20 Arg Gly Thr Ser Ser Ile Arg Asn Ala Ile Ala Asp Ile Val Phe Val  
85 90 95

25 Pro Val Asn Tyr Pro Pro Val Asn Gly Ala Lys Val His Lys Gly Phe  
100 105 110

30 Ala Gln Leu Asp Arg His Pro Gly Tyr Lys Ile Val Val Thr Gly His  
130 135 140

35 Ser Leu Gly Gly Ala Thr Ala Val Leu Ser Ala Leu Asp Leu Tyr His  
145 150 155 160

40 His Gly His Asp Asn Ile Glu Ile Tyr Thr Gln Gly Gln Pro Arg Ile  
165 170 175

45 Gly Thr Pro Glu Phe Ala Asn Tyr Val Ile Gly Thr Lys Ile Pro Tyr  
180 185 190

50 Gln Arg Leu Val Asn Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu Pro Pro Gly  
195 200 205

55 Ala Phe Gly Phe Leu His Ala Gly Glu Glu Phe Trp Ile Met Lys Asp  
210 215 220

Ser Ser Leu Arg Val Cys Pro Asn Gly Ile Glu Thr Asp Asn Cys Ser  
225 230 235 240

Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr Leu  
245 250 255

ES 2 601 327 T3

Asp Met Asn Thr Gly Leu Cys Leu  
260

5  
<210> 5  
<211> 269  
<212> PRT  
<213> Rhizomucor miehei

10  
<400> 5

Ser Ile Asp Gly Gly Ile Arg Ala Ala Thr Ser Gln Glu Ile Asn Glu  
1 5 10 15

15  
Leu Thr Tyr Tyr Thr Thr Leu Ser Ala Asn Ser Tyr Cys Arg Thr Val  
20 25 30

20  
Ile Pro Gly Ala Thr Trp Asp Cys Ile His Cys Asp Ala Thr Glu Asp  
35 40 45

25  
Leu Lys Ile Ile Lys Thr Trp Ser Thr Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Ala  
50 55 60

30  
Met Val Ala Arg Gly Asp Ser Glu Lys Thr Ile Tyr Ile Val Phe Arg  
65 70 75 80

35  
Gly Ser Ser Ser Ile Arg Asn Trp Ile Ala Asp Leu Thr Phe Val Pro  
85 90 95

40  
Val Ser Tyr Pro Pro Val Ser Gly Thr Lys Val His Lys Gly Phe Leu  
100 105 110

45  
Asp Ser Tyr Gly Glu Val Gln Asn Glu Leu Val Ala Thr Val Leu Asp  
115 120 125

50  
Gln Phe Lys Gln Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Ala Val Thr Gly His Ser  
130 135 140

55  
Leu Gly Gly Ala Thr Ala Leu Leu Cys Ala Leu Asp Leu Tyr Gln Arg  
145 150 155 160

Glu Glu Gly Leu Ser Ser Ser Asn Leu Phe Leu Tyr Thr Gln Gly Gln  
165 170 175

Pro Arg Val Gly Asp Pro Ala Phe Ala Asn Tyr Val Val Ser Thr Gly  
180 185 190

ES 2 601 327 T3

Ile Pro Tyr Arg Arg Thr Val Asn Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu  
195 200 205

5  
Pro Pro Ala Ala Phe Gly Phe Leu His Ala Gly Glu Glu Tyr Trp Ile  
210 215 220

10  
Thr Asp Asn Ser Pro Glu Thr Val Gln Val Cys Thr Ser Asp Leu Glu  
225 230 235 240

15  
Thr Ser Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Leu Asp  
245 250 255

20  
His Leu Ser Tyr Phe Gly Ile Asn Thr Gly Leu Cys Thr  
260 265

<210> 6  
<211> 271  
<212> PRT  
25 <213> Rhizopus oryzae  
<400> 6

30  
Ser Ala Ser Asp Gly Gly Lys Val Val Ala Ala Thr Thr Ala Gln Ile  
1 5 10 15

35  
Gln Glu Phe Thr Lys Tyr Ala Gly Ile Ala Ala Thr Ala Tyr Cys Arg  
20 25 30

40  
Ser Val Val Pro Gly Asn Lys Trp Asp Cys Val Gln Cys Gln Lys Trp  
35 40 45

45  
Val Pro Asp Gly Lys Ile Ile Thr Thr Phe Thr Ser Leu Leu Ser Asp  
50 55 60

50  
Thr Asn Gly Tyr Val Leu Arg Ser Asp Lys Gln Lys Thr Ile Tyr Leu  
65 70 75 80

55  
Val Phe Arg Gly Thr Asn Ser Phe Arg Ser Ala Ile Thr Asp Ile Val  
85 90 95

60  
Phe Asn Phe Ser Asp Tyr Lys Pro Val Lys Gly Ala Lys Val His Ala  
100 105 110

65  
Gly Phe Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Val Val Asn Asp Tyr Phe Pro Val  
115 120 125

ES 2 601 327 T3

Val Gln Glu Gln Leu Thr Ala His Pro Thr Tyr Lys Val Ile Val Thr  
 130 135 140  
 5  
 Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Gln Ala Leu Leu Ala Gly Met Asp Leu  
 145 150 155 160  
 10 Tyr Gln Arg Glu Pro Arg Leu Ser Pro Lys Asn Leu Ser Ile Phe Thr  
 165 170 175  
 15 Val Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Glu  
 180 185 190  
 Ser Thr Gly Ile Pro Phe Gln Arg Thr Val His Lys Arg Asp Ile Val  
 195 200 205  
 20 Pro His Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu  
 210 215 220  
 25 Ser Trp Ile Lys Ser Gly Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr Ser Glu  
 225 230 235 240  
 30 Ile Glu Thr Lys Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Ile  
 245 250 255  
 35 Leu Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu  
 260 265 270  
 <210> 7  
 <211> 267  
 40 <212> PRT  
 <213> Aspergillus niger  
 <400> 7  
 45 Thr Ala Gly His Ala Leu Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ile Ser Glu Asp  
 1 5 10 15  
 50 Leu Tyr Ser Arg Leu Val Glu Met Ala Thr Ile Ser Gln Ala Ala Tyr  
 20 25 30  
 Ala Asp Leu Cys Asn Ile Pro Ser Thr Ile Ile Lys Gly Glu Lys Ile  
 35 40 45  
 55 Tyr Asn Ser Gln Thr Asp Ile Asn Gly Trp Ile Leu Arg Asp Asp Ser  
 50 55 60

ES 2 601 327 T3

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

<210> 8  
 55 <211> 266  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus tubingensis  
 <400> 8

ES 2 601 327 T3

Thr Ala Gly His Ala Leu Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ile Ser Glu Asp  
 1 5 10 15  
 5  
 Leu Tyr Ser Arg Leu Val Glu Met Ala Thr Ile Ser Gln Ala Ala Tyr  
 20 25 30  
 10  
 Ala Asp Leu Cys Asn Ile Pro Ser Thr Ile Ile Lys Gly Glu Lys Ile  
 35 40 45  
 15  
 Tyr Asn Ser Gln Thr Asp Ile Asn Gly Trp Ile Leu Arg Asp Asp Ser  
 50 55 60  
 20  
 Ser Lys Glu Ile Ile Thr Val Phe Arg Gly Thr Gly Ser Asp Thr Asn  
 65 70 75 80  
 25  
 Leu Gln Leu Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Pro Phe Asp Thr Leu Pro  
 85 90 95  
 30  
 Gln Cys Asn Ser Cys Glu Val His Gly Gly Tyr Tyr Ile Gly Trp Ile  
 100 105 110  
 35  
 Ser Val Gln Asp Gln Val Glu Ser Leu Val Gln Gln Gln Val Ser Gln  
 115 120 125  
 40  
 Phe Pro Asp Tyr Ala Leu Thr Val Thr Gly His Ser Leu Gly Ala Ser  
 130 135 140  
 45  
 Leu Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gln Leu Ser Ala Thr Tyr Asp Asn Ile  
 145 150 155 160  
 50  
 Arg Leu Tyr Thr Phe Gly Glu Pro Arg Ser Asn Gln Ala Phe Ala Ser  
 165 170 175  
 55  
 Tyr Met Asn Asp Ala Phe Gln Ala Ser Ser Pro Asp Thr Thr Gln Tyr  
 180 185 190  
 60  
 Phe Arg Val Thr His Ala Asn Asp Gly Ile Pro Asn Leu Pro Pro Ala  
 195 200 205  
 65  
 Asp Glu Gly Tyr Ala His Gly Val Val Glu Tyr Trp Ser Val Asp Pro  
 210 215 220  
 70  
 Tyr Ser Ala Gln Asn Thr Phe Val Cys Thr Gly Asp Glu Val Gln Cys  
 225 230 235 240

ES 2 601 327 T3

Cys Glu Ala Gln Gly Gly Gln Gly Val Asn Asn Ala His Thr Thr Tyr  
 245 250 255  
 5  
 Phe Gly Met Thr Ser Gly His Cys Thr Trp  
 260 265  
 10  
 <210> 9  
 <211> 276  
 <212> PRT  
 <213> Fusarium oxysporum  
 15  
 <400> 9  
 Ala Val Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe Lys Phe Tyr Ile  
 1 5 10 15  
 20  
 Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala Ala Gly Ser  
 20 25 30  
 25  
 Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val Gln Gly Asn Gly  
 35 40 45  
 30  
 Ala Thr Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly  
 50 55 60  
 35  
 Tyr Val Ala Thr Asp Ser Ala Arg Lys Glu Ile Val Val Ser Phe Arg  
 65 70 75 80  
 40  
 Gly Ser Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln  
 85 90 95  
 45  
 Glu Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln  
 100 105 110  
 50  
 Arg Ala Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Ser  
 115 120 125  
 55  
 Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser Thr Gly His Ser  
 130 135 140  
 60  
 Leu Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly  
 145 150 155 160  
 65  
 Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn  
 165 170 175

ES 2 601 327 T3

Ala Gln Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Tyr Arg  
 180 185 190  
 5  
 Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe  
 195 200 205  
 10  
 Gly Tyr Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser Gly Gly Gly Gly  
 210 215 220  
 15  
 Asp Lys Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala  
 225 230 235 240  
 20  
 Ala Asn Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala  
 245 250 255  
 25  
 His Leu His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe  
 260 265 270  
 30  
 Ser Trp Arg Arg  
 275  
 35  
 <210> 10  
 <211> 273  
 <212> PRT  
 <213> Fusarium heterosporum  
 40  
 Thr Val Thr Thr Gln Asp Leu Ser Asn Phe Arg Phe Tyr Leu Gln His  
 1 5 10 15  
 45  
 Ala Asp Ala Ala Tyr Cys Asn Phe Asn Thr Ala Val Gly Lys Pro Val  
 20 25 30  
 50  
 His Cys Ser Ala Gly Asn Cys Pro Asp Ile Glu Lys Asp Ala Ala Ile  
 35 40 45  
 55  
 Val Val Gly Ser Val Val Gly Thr Lys Thr Gly Ile Gly Ala Tyr Val  
 50 55 60  
 65  
 Ala Thr Asp Asn Ala Arg Lys Glu Ile Val Val Ser Val Arg Gly Ser  
 65 70 75 80  
 85  
 Ile Asn Val Arg Asn Trp Ile Thr Asn Phe Asn Phe Gly Gln Lys Thr  
 85 90 95

ES 2 601 327 T3

5 Cys Asp Leu Val Ala Gly Cys Gly Val His Thr Gly Phe Leu Asp Ala  
 100 105 110  
 Trp Glu Glu Val Ala Ala Asn Val Lys Ala Ala Val Ser Ala Ala Lys  
 115 120 125  
 10 Thr Ala Asn Pro Thr Phe Lys Phe Val Val Thr Gly His Ser Leu Gly  
 130 135 140  
 15 Gly Ala Val Ala Thr Ile Ala Ala Ala Tyr Leu Arg Lys Asp Gly Phe  
 145 150 155 160  
 20 Pro Phe Asp Leu Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Asp Phe  
 165 170 175  
 25 Phe Ala Asn Phe Val Thr Gln Gln Thr Gly Ala Glu Tyr Arg Val Thr  
 180 185 190  
 His Gly Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Ile Val Phe Gly Tyr  
 195 200 205  
 30 Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Asn Gly Gly Pro Leu Asp Lys  
 210 215 220  
 35 Asp Tyr Thr Val Thr Glu Ile Lys Val Cys Glu Gly Ile Ala Asn Val  
 225 230 235 240  
 40 Met Cys Asn Gly Gly Thr Ile Gly Leu Asp Ile Leu Ala His Ile Thr  
 245 250 255  
 45 Tyr Phe Gln Ser Met Ala Thr Cys Ala Pro Ile Ala Ile Pro Trp Lys  
 260 265 270  
 Arg  
 50 <210> 11  
 <211> 278  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus oryzae  
 55 <400> 11  
 Asp Ile Pro Thr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Lys Phe Trp Val Gln Tyr  
 1 5 10 15

ES 2 601 327 T3

Ala Ala Ala Thr Tyr Cys Pro Asn Asn Tyr Val Ala Lys Asp Gly Glu  
 20 25 30  
 5

Lys Leu Asn Cys Ser Val Gly Asn Cys Pro Asp Val Glu Ala Ala Gly  
 35 40 45  
 10

Ser Thr Val Lys Leu Ser Phe Ser Asp Asp Thr Ile Thr Asp Thr Ala  
 50 55 60  
 15

Gly Phe Val Ala Val Asp Asn Thr Asn Lys Ala Ile Val Val Ala Phe  
 65 70 75 80  
 20

Arg Gly Ser Tyr Ser Ile Arg Asn Trp Val Thr Asp Ala Thr Phe Pro  
 85 90 95  
 25

Gln Thr Asp Pro Gly Leu Cys Asp Gly Cys Lys Ala Glu Leu Gly Phe  
 100 105 110  
 30

Trp Thr Ala Trp Lys Val Val Arg Asp Arg Ile Ile Lys Thr Leu Asp  
 115 120 125  
 35

Glu Leu Lys Pro Glu His Ser Asp Tyr Lys Ile Val Val Val Gly His  
 130 135 140  
 40

Ser Leu Gly Ala Ala Ile Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asp Leu Arg Thr  
 145 150 155 160  
 45

Lys Asn Tyr Asp Ala Ile Leu Tyr Ala Tyr Ala Ala Pro Arg Val Ala  
 165 170 175  
 50

Asn Lys Pro Leu Ala Glu Phe Ile Thr Asn Gln Gly Asn Asn Tyr Arg  
 180 185 190  
 55

Phe Thr His Asn Asp Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Leu Leu Thr Met  
 195 200 205  
 60

Gly Tyr Val His Ile Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Thr Ala Pro Asp Asn  
 210 215 220  
 65

Thr Thr Val Thr Asp Asn Gln Val Thr Val Leu Asp Gly Tyr Val Asn  
 225 230 235 240  
 70

Phe Lys Gly Asn Thr Gly Thr Ser Gly Gly Leu Pro Asp Leu Leu Ala

ES 2 601 327 T3

				245						250							255
5	Phe	His	Ser	His	Val	Trp	Tyr	Phe	Ile	His	Ala	Asp	Ala	Cys	Lys	Gly	
				260					265					270			
10	Pro	Gly	Leu	Pro	Leu	Arg											
			275														
	<210>	12															
	<211>	278															
	<212>	PRT															
15	<213>	Penicillium	camemberti														
	<400>	12															
20	Asp	Val	Ser	Thr	Ser	Glu	Leu	Asp	Gln	Phe	Glu	Phe	Trp	Val	Gln	Tyr	
	1				5					10					15		
25	Ala	Ala	Ala	Ser	Tyr	Tyr	Glu	Ala	Asp	Tyr	Thr	Ala	Gln	Val	Gly	Asp	
				20					25					30			
30	Lys	Leu	Ser	Cys	Ser	Lys	Gly	Asn	Cys	Pro	Glu	Val	Glu	Ala	Thr	Gly	
			35					40					45				
35	Ala	Thr	Val	Ser	Tyr	Asp	Phe	Ser	Asp	Ser	Thr	Ile	Thr	Asp	Thr	Ala	
		50					55					60					
40	Gly	Tyr	Ile	Ala	Val	Asp	His	Thr	Asn	Ser	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Phe	
	65					70					75					80	
45	Arg	Gly	Ser	Tyr	Ser	Val	Arg	Asn	Trp	Val	Ala	Asp	Ala	Thr	Phe	Val	
					85					90					95		
50	His	Thr	Asn	Pro	Gly	Leu	Cys	Asp	Gly	Cys	Leu	Ala	Glu	Leu	Gly	Phe	
				100					105					110			
55	Trp	Ser	Ser	Trp	Lys	Leu	Val	Arg	Asp	Asp	Ile	Ile	Lys	Glu	Leu	Lys	
			115					120					125				
60	Glu	Val	Val	Ala	Gln	Asn	Pro	Asn	Tyr	Glu	Leu	Val	Val	Val	Gly	His	
		130					135					140					
65	Ser	Leu	Gly	Ala	Ala	Val	Ala	Thr	Leu	Ala	Ala	Thr	Asp	Leu	Arg	Gly	
	145					150					155					160	
70	Lys	Gly	Tyr	Pro	Ser	Ala	Lys	Leu	Tyr	Ala	Tyr	Ala	Ser	Pro	Arg	Val	

ES 2 601 327 T3

5 Gly Asn Ala Ala Leu Ala Lys Tyr Ile Thr Ala Gln Gly Asn Asn Phe  
 180 185 190  
 Arg Phe Thr His Thr Asn Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Leu Leu Ser  
 10 195 200 205  
 Met Gly Tyr Val His Val Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Pro Asn  
 15 210 215 220  
 Asn Ala Thr Val Ser Thr Ser Asp Ile Lys Val Ile Asp Gly Asp Val  
 20 225 230 235 240  
 Ser Phe Asp Gly Asn Thr Gly Thr Gly Leu Pro Leu Leu Thr Asp Phe  
 25 245 250 255  
 Glu Ala His Ile Trp Tyr Phe Val Gln Val Asp Ala Gly Lys Gly Pro  
 30 260 265 270  
 Gly Leu Pro Phe Lys Arg  
 30 275  
 <210> 13  
 <211> 270  
 <212> PRT  
 35 <213> Aspergillus foetidus  
 <400> 13  
 Ser Val Ser Thr Ser Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp  
 40 1 5 10 15  
 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn  
 45 20 25 30  
 Leu Thr Cys Thr Ala Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr  
 50 35 40 45  
 Thr Met Leu Leu Glu Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala  
 55 50 55 60  
 Gly Phe Leu Ala Ala Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Ser Ser Thr Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile

ES 2 601 327 T3

				85					90					95		
5	Leu	Glu	Asp	Asn 100	Asp	Asp	Leu	Cys	Thr 105	Gly	Cys	Lys	Val	His 110	Thr	Gly
10	Phe	Trp	Lys 115	Ala	Trp	Glu	Ser	Ala 120	Ala	Asp	Glu	Leu	Thr 125	Ser	Lys	Ile
15	Lys	Ser	Ala	Met	Ser	Thr	Tyr 135	Ser	Gly	Tyr	Thr	Leu 140	Tyr	Phe	Thr	Gly
20	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala 150	Leu	Ala	Thr	Leu	Gly 155	Ala	Thr	Val	Leu	Arg 160
25	Asn	Asp	Gly	Tyr	Ser 165	Val	Glu	Leu	Tyr	Thr 170	Tyr	Gly	Cys	Pro	Arg 175	Ile
30	Gly	Asn	Tyr	Ala 180	Leu	Ala	Glu	His	Ile 185	Thr	Ser	Gln	Gly	Ser 190	Gly	Ala
35	Asn	Phe	Arg 195	Val	Thr	His	Leu	Asn 200	Asp	Ile	Val	Pro	Arg 205	Val	Pro	Pro
40	Met	Asp	Phe	Gly	Phe	Ser	Gln 215	Pro	Ser	Pro	Glu	Tyr 220	Trp	Ile	Thr	Ser
45	Gly	Asn	Gly	Ala	Ser	Val 230	Thr	Ala	Ser	Asp	Ile 235	Glu	Val	Ile	Glu	Gly 240
50	Ile	Asn	Ser	Thr	Ala	Gly	Asn	Ala	Gly	Glu	Ala	Thr	Val	Ser	Val 255	Leu
55	Ala	His	Leu	Trp	Tyr	Phe	Phe	Ala	Ile 265	Ser	Glu	Cys	Leu	Leu		
	<210>		14													
	<211>		270													
	<212>		PRT													
	<213>		Aspergillus niger													
	<400>		14													
55	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Gln	Leu	Phe	Ser	Gln	Trp
	1				5					10					15	
	Ser	Ala	Ala	Ala	Tyr	Cys	Ser	Asn	Asn	Ile	Asp	Ser	Asp	Asp	Ser	Asn

ES 2 601 327 T3

			20					25								30
5	Val	Thr	Cys	Thr	Ala	Asp	Ala	Cys	Pro	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Ser	Thr
			35					40					45			
10	Lys	Met	Leu	Leu	Glu	Phe	Asp	Leu	Thr	Asn	Asn	Phe	Gly	Gly	Thr	Ala
		50					55					60				
15	Gly	Phe	Leu	Ala	Ala	Asp	Asn	Thr	Asn	Lys	Arg	Leu	Val	Val	Ala	Phe
	65				70						75					80
20	Arg	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Lys	Asn	Trp	Ile	Ala	Asp	Leu	Asp	Phe	Ile
				85						90					95	
25	Leu	Gln	Asp	Asn	Asp	Asp	Leu	Cys	Thr	Gly	Cys	Lys	Val	His	Thr	Gly
				100					105					110		
30	Phe	Trp	Lys	Ala	Trp	Glu	Ala	Ala	Ala	Asp	Asn	Leu	Thr	Ser	Lys	Ile
			115					120					125			
35	Lys	Ser	Ala	Met	Ser	Thr	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Phe	Thr	Gly
		130					135					140				
40	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Arg
	145				150						155					160
45	Asn	Asp	Gly	Tyr	Ser	Val	Glu	Leu	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Cys	Pro	Arg	Val
				165						170					175	
50	Gly	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Glu	His	Ile	Thr	Ser	Gln	Gly	Ser	Gly	Ala
				180					185						190	
55	Asn	Phe	Pro	Val	Thr	His	Leu	Asn	Asp	Ile	Val	Pro	Arg	Val	Pro	Pro
			195					200					205			
60	Met	Asp	Phe	Gly	Phe	Ser	Gln	Pro	Ser	Pro	Glu	Tyr	Trp	Ile	Thr	Ser
	210						215					220				
65	Gly	Thr	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Ala	Ser	Asp	Ile	Glu	Leu	Ile	Glu	Gly
	225				230						235					240
70	Ile	Asn	Ser	Thr	Ala	Gly	Asn	Ala	Gly	Glu	Ala	Thr	Val	Asp	Val	Leu
				245						250					255	

ES 2 601 327 T3

Ala His Leu Trp Tyr Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu  
 260 265 270

5 <210> 15  
 <211> 269  
 <212> PRT  
 <213> *Aspergillus oryzae*

10 <400> 15

Asp Val Ser Ser Ser Leu Leu Asn Asn Leu Asp Leu Phe Ala Gln Tyr  
 1 5 10 15

15 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Asp Glu Asn Leu Asn Ser Thr Gly Thr Lys  
 20 25 30

20 Leu Thr Cys Ser Val Gly Asn Cys Pro Leu Val Glu Ala Ala Ser Thr  
 35 40 45

25 Gln Ser Leu Asp Glu Phe Asn Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Pro Ala  
 50 55 60

30 Gly Tyr Leu Ala Ala Asp Glu Thr Asn Lys Leu Leu Val Leu Ser Phe  
 65 70 75 80

Arg Gly Ser Ala Asp Leu Ala Asn Trp Val Ala Asn Leu Asn Phe Gly  
 85 90 95

35 Leu Glu Asp Ala Ser Asp Leu Cys Ser Gly Cys Glu Val His Ser Gly  
 100 105 110

40 Phe Trp Lys Ala Trp Ser Glu Ile Ala Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val  
 115 120 125

45 Glu Ser Ala Leu Ser Asp His Ser Asp Tyr Ser Leu Val Leu Thr Gly  
 130 135 140

50 His Ser Tyr Gly Ala Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Ala Leu Arg  
 145 150 155 160

Asn Ser Gly His Ser Val Glu Leu Tyr Asn Tyr Gly Gln Pro Arg Leu  
 165 170 175

55 Gly Asn Glu Ala Leu Ala Thr Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Lys Gly Gly  
 180 185 190

ES 2 601 327 T3

Asn Tyr Arg Val Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Lys Leu Pro Pro  
 195 200 205

5 Thr Leu Leu Gly Tyr His His Phe Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Ser Ser  
 210 215 220

10 Ala Asp Glu Ala Thr Val Thr Thr Thr Asp Val Thr Glu Val Thr Gly  
 225 230 235 240

15 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asp Gly Thr Asp Gly Thr Ser Ile Asp  
 245 250 255

20 Ala His Arg Trp Tyr Phe Ile Tyr Ile Ser Glu Cys Ser  
 260 265

<210> 16  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> Landerina penisapora

25 <400> 16

30 Pro Gln Asp Ala Tyr Thr Ala Ser His Ala Asp Leu Val Lys Tyr Ala  
 1 5 10 15

Thr Tyr Ala Gly Leu Ala Tyr Gln Thr Thr Asp Ala Trp Pro Ala Ser  
 20 25 30

35 Arg Thr Val Pro Lys Asp Thr Thr Leu Ile Ser Ser Phe Asp His Thr  
 35 40 45

40 Leu Lys Gly Ser Ser Gly Tyr Ile Ala Phe Asn Glu Pro Cys Lys Glu  
 50 55 60

45 Ile Ile Val Ala Tyr Arg Gly Thr Asp Ser Leu Ile Asp Trp Leu Thr  
 65 70 75 80

50 Asn Leu Asn Phe Asp Lys Thr Ala Trp Pro Ala Asn Ile Ser Asn Ser  
 85 90 95

Leu Val His Glu Gly Phe Leu Asn Ala Tyr Leu Val Ser Met Gln Gln  
 100 105 110

55 Val Gln Glu Ala Val Asp Ser Leu Leu Ala Lys Cys Pro Asp Ala Thr  
 115 120 125

ES 2 601 327 T3

Ile Ser Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Cys Ile Ser  
 130 135 140

5 Met Val Asp Thr Ala Gln Arg His Arg Gly Ile Lys Met Gln Met Phe  
 145 150 155 160

10 Thr Tyr Gly Gln Pro Arg Thr Gly Asn Gln Ala Phe Ala Glu Tyr Val  
 165 170 175

15 Glu Asn Leu Gly His Pro Val Phe Arg Val Val Tyr Arg His Asp Ile  
 180 185 190

20 Val Pro Arg Met Pro Pro Met Asp Leu Gly Phe Gln His His Gly Gln  
 195 200 205

25 Glu Val Trp Tyr Glu Gly Asp Glu Asn Ile Lys Phe Cys Lys Gly Glu  
 210 215 220

30 Gly Glu Asn Leu Thr Cys Glu Leu Gly Val Pro Phe Ser Glu Leu Asn  
 225 230 235 240

35 Ala Lys Asp His Ser Glu Tyr Pro Gly Met His  
 245 250

<210> 17  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia usada para ejemplo de alineación

40 <400> 17

45 Ala Cys Met Ser His Thr Trp Gly Glu Arg Asn Leu  
 1 5 10

50 <210> 18  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Secuencia usada para ejemplo de alineación

55 <400> 18

His Gly Trp Gly Glu Asp Ala Asn Leu Ala Met Asn Pro Ser  
 1 5 10

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Polipéptido con actividad de lipasa que comprende mutaciones en la parte madura de la SEC ID N° 2 seleccionadas de:
- (a) I202G+T231R+N233R;
  - (b) I86V+L227G+T231R+N233R+P256K;
  - (c) Q4V+S58N+V60S+T231R+N233R;
  - (d) S58N+V60S+190R+T231R+N233R;
  - 10 (e) I255Y+T231R+N233R; o
  - (f) I90A+ T231R+N233R+I255V.
- 15 2. Polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido según la reivindicación 1.
3. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido según la reivindicación 2 operativamente enlazado a una o varias secuencias de control que dirigen la producción del polipéptido en un huésped de expresión.
- 20 4. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 3.
5. Célula huésped recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos según la reivindicación 3.
- 25 6. Método para producir el polipéptido según la reivindicación 1 que comprende:
- (a) cultivar una célula, que sea capaz de producir el polipéptido, bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
  - (b) recuperar el polipéptido.
- 30 7. Método para producir el polipéptido según la reivindicación 1 que comprende:
- (a) cultivar una célula huésped que comprende un constructo de ácidos nucleicos que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido bajo condiciones propicias para la producción del polipéptido; y
  - (b) recuperar el polipéptido.

ES 2 601 327 T3

ID Nº 1: SSSSTQDYRIASEAEIKAHTFYTALSANA  
 ID Nº 2: SSSTQDYRIASEAEIKAHTFYTALSANA  
 ID Nº 3: SIDGGIRAATSQEINELTYTTLSANS  
 ID Nº 4: SASDGGKVVAATTAQIQEFTKYAGIAATA  
 ID Nº 5: TAGHALAASTQ GISEDLYSRL VEMATISQAA  
 ID Nº 6: TAGHALAASTQ GISEDLYSRL VEMATISQAA  
 ID Nº 7: AVGVTTTDFSNFKFYIQHGAAA  
 ID Nº 8: TVTTQDLSNFRFYLOHADAA  
 ID Nº 9: DIPTTQLEDKFWVQYAAAT  
 ID Nº 10: DVSTSELDQFEFVWQYAAAS  
 ID Nº 11: SVSTSTLDELQLFAQWSAAA  
 ID Nº 12: SVSTSTLDELQLFSQWSAAA  
 ID Nº 13: DVSSLLNNLDFLFAQYSAAA  
 ID Nº 14: EVSQDLFNQFNLFQYSAAA  
 ID Nº 15: PQDAYTASHADLVKYATYAGLA

ID Nº 1: YCRTVIPG GRWSCPCHGVAS NLQITKTFST LITDTNVLVAV  
 ID Nº 2: YCRTVIPG GQWSCPCHDVAP NLNITKTFTT LITDTNVLVAV  
 ID Nº 3: YCRTVIPG ATWDCIHCDATE DLKIIKTWST LIYDTNAMVAR  
 ID Nº 4: YCRSVVPG NKWDCVQCQKWVP DGKIIITFTS LLSDTNGYVLR  
 ID Nº 5: YADLCNIPST IIKGEKIYNSQTDINGWILR  
 ID Nº 6: YADLCNIPST IIKGEKIYNSQTDINGWILR  
 ID Nº 7: YC NSEAAA GSKITCSNNGCPTVQNGATIVTSF VGSKTGIGGYVAT  
 ID Nº 8: YC NFNTAV GKPVHCSAGNCPDIEKDAAIIVGVS VGTKTGIGAYVAT  
 ID Nº 9: YCPNNYVAKD GEKLNCVGNCPDVEAAGSTVKLSFS DDTITDTAGFVAV  
 ID Nº 10: YYEADYTAQV GDKLSCSKGNCPVEEATGATVSYDFS DSTITDTAGYIAV  
 ID Nº 11: YCSNNID SK DSNLTCTANACPSVEEASTTMLLEFDLTNDFGGTAGFLAA  
 ID Nº 12: YCSNNID SD DSNVTCTADACPSVEEASTKMLLEFDLTNNFGGTAGFLAA  
 ID Nº 13: YCDENLN ST GTKLTCSVGNCPLEAASTQSLDEFNESSSYGNPAGYLA  
 ID Nº 14: YCGKNNDAPA GTNITCTGNACPEVEKADATFLYSFE DSGVGDVTGFLAL  
 ID Nº 15: YQTTDAWPAS RTVPKDTTLISSFD HTLKGSSGYIAF

ID Nº 1: GEKEKTIYVV FRGTSSIRNA IADIVFVPVN YPPV NGA KVHKGFLDSY  
 ID Nº 2: GENEKTIYVV FRGTSSIRNA IADIVFVPVN YPPV NGA KVHKGFLDSY  
 ID Nº 3: GDSEKTIYIV FRGSSSIRNW IADLTFVPVS YPPV SGT KVHKGFLDSY  
 ID Nº 4: SDKQKTIYLV FRGTNSFRSA ITDIVFNFSY YKPV KGA KVHAGFLSSY  
 ID Nº 5: DDSSKEIITV FRGTGSDTNL QLDNTYTLTP FDTLPQCNGC EVHGGYYIGW  
 ID Nº 6: DDSSKEIITV FRGTGSDTNL QLDNTYTLTP FDTLPQCNSC EVHGGYYIGW  
 ID Nº 7: DSARKEIVVS FRGSINIRNW LTNLDFG QE DCSL VSGC GVHSGFQRAW  
 ID Nº 8: DNARKEIVVS VRGSINVRNW ITNFNFG QK TCDL VAGC GVHTGFLDAW  
 ID Nº 9: DNTNKAIVVA FRGSYSIRNW VTDATFP QT DPGL CDGC KAEFGFWTAW  
 ID Nº 10: DHTNSAVVLA FRGSYSVRNW VADATFV HT NPGL CDGC LAELGFWSSW  
 ID Nº 11: DNTNKRLVVA FRGSSTIENW IANLDFILED NDDL CTGC KVHTGFWKAW  
 ID Nº 12: DNTNKRLVVA FRGSSTIKNW IADLDFILOD NDDL CTGC KVHTGFWKAW  
 ID Nº 13: DETNKLLVLS FRGSADLANW VANLNFLED ASDL CSGC EVHSGFWKAW  
 ID Nº 14: DNTNKLIVLS FRGSRSIENW IGNLNFDLKE INDI CSGC RGHGFTSSW  
 ID Nº 15: NEPCKEIIVA YRGTDSLIDW LTNLNFDKTA WPAN ISNS LVHEGFLNAY

ID Nº 1: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHSL GGATAVLSALDLYHHGHA  
 ID Nº 2: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHSL GGATAVLSALDLYHHGHD  
 ID Nº 3: GEVQNELVAT VLDQFKQYPS YKVAVTGHSL GGATALLCALDLYQREEGLS  
 ID Nº 4: EQVVDYFPV VQEQLTAHPT YKIVVTGHSL GGAQALLAGMDLYQREPRLS  
 ID Nº 5: VSVQDQVESL VKQQVSQYPD YALTVTGHSL GASLAALTAQAQ SATYD  
 ID Nº 6: ISVQDQVESL VQQQVSQFPD YALTVTGHSL GASLAALTAQAQ SATYD

Figura 1 (cont.)

ES 2 601 327 T3

ID Nº 7: NEISSQATAA VASARKANPS FNVISTGHSL GGAVAVLAAANLRVGGT  
 ID Nº 8: EEVAANVKAA VSAAKTANPT FKFVVTGHSL GGAVATIAAAYLRKDDGF  
 ID Nº 9: KVVDRDIKT LDELKPEHSD YKIVVVGHSL GAAIASLAAADLRTKNY  
 ID Nº 10: KLVRDDIKE LKEVVAQNPN YELVVVGHSL GAAVATLAATDLRGKGY  
 ID Nº 11: ESAADELTSK IKSAMSTYSG YTLYFTGHSL GGALATLGATVLRNDGY  
 ID Nº 12: EAAADNLTSK IKSAMSTYSG YTLYFTGHSL GGALATLGATVLRNDGY  
 ID Nº 13: SEIADTITSK VESALSDHSD YSLVLTGHSL GAALAALAATALRNSGH  
 ID Nº 14: RSVADTLRQK VEDAVREHPD YRVVFTGHSL GGALATVAGADLRNGY  
 ID Nº 15: LVSMQQVQEA VDSLLAKCPD ATISFTGHSL GGALACISMVDTAQRHRGI

ID Nº 1: NIEIYTQG QPRIGTPAFA NYVIGT KIPYQRLVHERDIVPHL  
 ID Nº 2: NIEIYTQG QPRIGTPEFA NYVIGT KIPYQRLVNERDIVPHL  
 ID Nº 3: SSNLFlyTQG QPRVGDPAFA NYVVST GIPYRRTVNERDIVPHL  
 ID Nº 4: PKNLSIFTVG GPRVGNPTFA YYVEST GIPFQRTVHKRDIVPHV  
 ID Nº 5: NIRLYTFG EPRSGNQAFA SYMNDAFQASSPDTTQYFRVTHANDGIPNL  
 ID Nº 6: NIRLYTFG EPRS NQAFSA SYMNDAFQASSPDTTQYFRVTHANDGIPNL  
 ID Nº 7: PVDIYTYG SPRVGNAQLS AFVSNQ AGGEYRVTHADDPVPR  
 ID Nº 8: PFDLYTYG SPRVGNDFFA NFVTQO TGAEYRVTHGDDVPVPR  
 ID Nº 9: DAILYAYA APRVANKPLA EFITNQ GNNYRFTHNDDPVPKL  
 ID Nº 10: SAKLYAYA SPRVGNAALA KYITAO GNNFRFTHTNDPVPK  
 ID Nº 11: SVELYTYG CPRIGNYALA EHITSQ GSGANFRVTHLNDIVPRV  
 ID Nº 12: SVELYTYG CPRVGNYALA EHITSQ GSGANFPVTHLNDIVPRV  
 ID Nº 13: SVELYNYG QPRLGNEALA TYITDQ NKGGNYRVTHTNDIVPKL  
 ID Nº 14: DIDVFSYG APRVGNRAFA EFLTVQ TGGTLYRITHTNDIVPR  
 ID Nº 15: KMQMFTYG QPRTGNQAFSA EYVENL GHPVFRVVYRHDIVPRM

ID Nº 1: PPGAFGFLHA GEEFWIMK DSSLRVCPNGIETDNCNSIV  
 ID Nº 2: PPGAFGFLHA GEEFWIMK DSSLRVCPNGIETDNCNSIV  
 ID Nº 3: PPAAFGFLHA GEEYWITD NSPETVQVCTSDLETSDCNSIV  
 ID Nº 4: PPQSFGLFHP GVESWIKS GTSNVQICTSEIETKDCNSIV  
 ID Nº 5: PPVEQGYAHG GVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCCCE AQGGQG  
 ID Nº 6: PPADEGYAHG VVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCCCE AQGGQG  
 ID Nº 7: PPLIFGYRHT TPEFWLSGGGGDKVDYTTISDVKVCEGAANLG CNGGTL  
 ID Nº 8: PPIVFGYRHT SPEYWLNG GPLDKDYTVTEIKVCEGIANVM CNGGTI  
 ID Nº 9: PLLTMGYVHI SPEYYITA PDNTTVTDNQVTVLDGYVNFK GNTGTS  
 ID Nº 10: PLLSMGYVHV SPEYWITS PNNATVSTSDIKVIDGDVVSFD GNTGTG  
 ID Nº 11: PPMDFGFSQP SPEYWITS GNGASVTASDIEVIEGINSTA GNAGEA  
 ID Nº 12: PPMDFGFSQP SPEYWITS GTGASVTASDIEVIEGINSTA GNAGEA  
 ID Nº 13: PPTLLGYHHF SPEYYISS ADEATVTTTDVTEVTGIDATG GNDGTD  
 ID Nº 14: PPREFGYSHS SPEYWIKS GTLVPVTRNDIVKIEGIDATG GNNQPN  
 ID Nº 15: PPMDLGFQHH GQEVWYEG DENIKFCKGEGENLTCELGVP

ID Nº 1: PFT SVIDHLSYLDMNTGL CL  
 ID Nº 2: PFT SVIDHLSYLDMNTGL CL  
 ID Nº 3: PFT SVLDHLSYFGINTGL CT  
 ID Nº 4: PFT SILDHLSYFDINEGS CL  
 ID Nº 5: VN NAHTTYF GMTSGACTW  
 ID Nº 6: VN NAHTTYF GMTSGHCTW  
 ID Nº 7: GL DIAAHLHYF QATDA CNAGGFSWR R  
 ID Nº 8: GL DILAHITYF QSMAT CAPIAIPWK R  
 ID Nº 9: GGLPDLALAFHSHVWYFIHADACKGPGPLPLR  
 ID Nº 10: LPLLTDFEAHIWYF VQVDA GKGPGLPFK R  
 ID Nº 11: TV SVLAHLWYF FAISE CLL  
 ID Nº 12: TV DVLHLWYF FAISE CLL  
 ID Nº 13: GT SIDAHRWYF IYISE CS  
 ID Nº 14: IP DIPAHWYF GLIGT CL  
 ID Nº 15: FSEL NAKDHSEYP GMH

ID Nº:	Microorganismo	SEC ID Nº.:
1.	<i>Absidia reflexa</i>	3

Figura 1 (cont.)

2.	<i>Absidia corymbifera</i>	4
3.	<i>Rhizomucor miehei</i>	5
4.	<i>Rhizopus delemar (oryzea)</i>	6
5.	<i>Aspergillus niger</i>	7
6.	<i>Aspergillus tubingensis</i>	8
7.	<i>Fusarium oxysporum</i>	9
8.	<i>Fusarium heterosporum</i>	10
9.	<i>Aspergillus oryzae</i>	11
10.	<i>Penicilium camembertii</i>	12
11.	<i>Aspergillus foetidus</i>	13
12.	<i>Aspergillus niger</i>	14
13.	<i>Aspergillus oryzae</i>	15
14.	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	2
15.	<i>Landerina penisapora</i>	16

Figura 1. Alineamiento de secuencias de lipasa.