

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 628 940**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.01.2007 PCT/US2007/060841**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.08.2007 WO07087508**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2007 E 07717346 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 1979477**

54 Título: **Variantes de lipasa**

30 Prioridad:

23.01.2006 US 761109 P
27.10.2006 US 854891 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.08.2017

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (50.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK y
NOVOZYMES, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

VIND, JESPER;
KNOTZEL, JURGEN, CARSTEN, FRANZ;
BORCH, KIM;
SVENDSEN, ALLAN;
CALLISEN, THOMAS, HONGER;
YAYER, DEBBIE;
BJORNVAD, MAD, ESKELUND;
HANSEN, PETER, KAMP;
GE, HAIYAN y
LAMSA, MICHAEL

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 628 940 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

Variantes de lipasa

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a variantes de lipasa.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

[0002] Las lipasas son útiles, por ejemplo, como enzimas detergentes para eliminar manchas lipídicas o grasas de ropa y otros tejidos, como aditivos para masa de pan y otros productos horneados. De este modo, una lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo *Humicola lanuginosa*, EP 258 068 y EP 305 216) se vende para usar en detergente con el nombre comercial de Lipolase® (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. WO 9704079, WO 9707202 y WO 0032758 también revelan variantes de la lipasa de *T. Lanuginosus*.

[0003] En algunas aplicaciones, interesa minimizar la formación de ácidos grasos de cadena corta que generan olor. Así, se sabe que los detergentes para ropa con lipasas a veces pueden dejar olores residuales fijados a telas manchadas con leche (EP 430315). WO 02062973 divulga variantes de lipasa en las que la generación de olor se ha reducido por la unión de una extensión en el extremo C-terminal.

25 RESUMEN DE LA INVENCION

[0004] Los inventores han descubierto que, mediante la introducción de mutaciones en ciertas regiones/posiciones de una lipasa, es posible mejorar las propiedades o características de la lipasa.

[0005] En una forma de realización preferida, la presente invención se refiere a lipasas que tienen propiedades mejoradas para usar en detergentes. Por ejemplo, la invención proporciona variantes con una tendencia reducida a la generación de olor obtenidas mediante la introducción de mutaciones en una o más regiones identificadas en la lipasa progenitora. En otra forma de realización preferida, la presente invención proporciona variantes de lipasa que, en comparación con la lipasa progenitora, tienen un potencial reducido para la generación de olor sin la fijación de una extensión en el extremo C-terminal.

[0006] En otro aspecto, la invención se refiere a una secuencia de ADN que codifica la variante de lipasa de la invención, un vector de expresión que alberga dicha secuencia de ADN y una célula huésped transformada que contiene la secuencia de ADN o el vector de expresión.

[0007] En otro aspecto, la invención proporciona un método para producir la variante de lipasa de la presente invención.

45 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

[0008] La Figura 1 muestra el alineamiento de lipasas.

LISTADOS DE SECUENCIAS

50 [0009]
 SEQ ID NO: 1 muestra la secuencia de ADN que codifica la lipasa de *Thermomyces lanuginosus*.
 SEQ ID NO: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Thermomyces lanuginosus*.
 SEQ ID NO: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Absidia reflexa*.
 SEQ ID NO: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Absidia corymbifera*.
 55 SEQ ID NO: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Rhizomucor miehei*.
 SEQ ID NO: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Rhizopus oryzae*.
 SEQ ID NO: 7 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus niger*.
 SEQ ID NO: 8 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus tubingensis*.
 SEQ ID NO: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Fusarium oxysporum*.
 60 SEQ ID NO: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Fusarium heterosporum*.
 SEQ ID NO: 11 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus oryzae*.
 SEQ ID NO: 12 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Penicillium camemberti*.
 SEQ ID NO: 13 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus foetidus*.
 SEQ ID NO: 14 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus niger*.
 65 SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus oryzae*.
 SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Landerina penisapora*.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Lipasas progenitoras

[0010] Se puede utilizar cualquier lipasa progenitora adecuada. En una forma de realización preferida, la lipasa progenitora puede ser una lipasa fúngica. En otra forma de realización preferida, la lipasa progenitora puede ser una lipasa con una secuencia de aminoácidos con al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o incluso 100 % de homología tal y como se define en la sección "Homología y alineamiento" con la secuencia de la lipasa de *T. Lanuginosus* mostrada en la SEQ ID NO: 2.

[0011] La lipasa progenitora puede ser un polipéptido de levadura tal como un polipéptido de *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o de *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*.

[0012] En un aspecto preferido, la lipasa progenitora es un polipéptido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, o *Saccharomyces oviformis* con actividad de lipasa.

[0013] En otro aspecto preferido, la lipasa progenitora es un polipéptido de *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus turbigensis*, *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*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo: *Humicola lanuginose*), *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0014] En otro aspecto preferido, la lipasa progenitora es una lipasa de *Thermomyces*.

[0015] En un aspecto más preferido, la lipasa progenitora es una lipasa de *Thermomyces lanuginosus*. En una forma de realización aún más preferida, la lipasa progenitora es la lipasa de la SEQ ID NO: 2.

Lipasas variantes

[0016] Las variantes de lipasa de la presente invención son al menos 80 % idénticas a la SEQ ID NO: 2 y comprenden, en comparación con la lipasa progenitora, al menos tres sustituciones seleccionadas del grupo consistente en:

- a) al menos dos sustituciones en la región I, y
- b) al menos una sustitución en la región II, y
- c) al menos una sustitución en la región III, y
- d) al menos una sustitución en la región IV,

y donde la variante tiene actividad de lipasa y un muestra rendimiento de lavado y olor mejorados y comprende las sustituciones T231 R +N233R +I255Y.

[0017] En una forma de realización preferida, la lipasa variante es una variante de una lipasa de *Thermomyces*, más preferiblemente, una lipasa de *T. Lanuginosus*, e incluso más preferiblemente la lipasa de *T. Lanuginosus* mostrada en la SEQ ID NO: 2. En una forma de realización preferida, la lipasa variante tiene al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 2. La lipasa variante puede ser una variante de una lipasa progenitora codificada por un gen derivado/obtenido de uno de los siguientes organismos progenitores: *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, o *Trichoderma*. En una forma de realización preferida, la lipasa variante tiene al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una lipasa progenitora codificada por un gen derivado/obtenido de uno de los siguientes organismos progenitores: *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, o *Yarrowia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*,

Talaromyces, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, o *Trichoderma*.

[0018] En un aspecto preferido, la lipasa variante es una *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis* variante. En una forma de realización preferida, la lipasa variante tiene al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una lipasa progenitora codificada por un gen derivado/obtenido de *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.

[0019] La lipasa variante puede ser una variante de una lipasa progenitora codificada por un gen derivado/obtenido de uno de los siguientes organismos progenitores: *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus turbigensis*, *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 sarcochrom*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo: *Humicola lanuginose*), *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*. En una forma de realización preferida, la lipasa variante tiene al menos 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con una lipasa progenitora codificada por un gen derivado/obtenido de uno de los siguientes organismos progenitores: *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus turbigensis*, *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 sarcochrom*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo: *Humicola lanuginose*), *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o *Trichoderma viride*.

[0020] En otro aspecto preferido, la variante es una variante de una lipasa de *Thermomyces*.

[0021] En un aspecto más preferido, la lipasa progenitora es una lipasa de *Thermomyces lanuginosus*. En una forma de realización aún más preferida, la lipasa progenitora es la lipasa de la SEQ ID NO: 2.

Identificación de regiones y sustituciones

[0022] Las posiciones a las que se hace referencia en la Región I hasta la Región IV a continuación son las posiciones de los residuos de aminoácidos en la SEQ ID NO: 2. Para encontrar las posiciones correspondientes (u homólogas) en una lipasa distinta, se usa el procedimiento descrito en "Homología and alineamiento".

Sustituciones en la Región I

[0023] La Región I consiste en residuos de aminoácidos que rodean el residuo de E1 en el extremo N-terminal. En esta región, se prefiere sustituir un aminoácido de la lipasa progenitora con un aminoácido más positivo. La variante de lipasa comprende al menos dos sustituciones en la Región I, tal como tres, cuatro, cinco o seis sustituciones en la Región I e incluye las sustituciones T231R y N233R.

[0024] Los residuos de aminoácidos correspondientes a las siguientes posiciones están comprendidos por la región I: 1, 2 a 11 y 223-239. Las siguientes posiciones son de interés particular: 1, 4, 8, 11, 223, 227, 229, 231, 233, 234, 236.

[0025] En particular se han identificado las siguientes sustituciones adicionales: X1N/* X4V y X227G.

[0026] En una forma de realización preferida, la lipasa variante tiene al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 2

[0027] En una forma de realización más preferida, la lipasa variante es una variante de la lipasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Sustituciones en la Región II

[0028] La Región II consiste en residuos de aminoácidos en contacto con sustrato en un lado de la cadena de acilo y un lado de la parte de alcohol. En esta región se prefiere sustituir un aminoácido de la lipasa progenitora

con un aminoácido más positivo o con un aminoácido menos hidrofóbico.

[0029] La variante de lipasa puede comprender al menos una sustitución en la Región II, tal como dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones en la Región II e incluye la sustitución I255Y.

5 [0030] Los residuos de aminoácidos correspondientes a las siguientes posiciones están comprendidos por la Región II: 202 a 211 y 249 a 269. Las siguientes posiciones son de interés particular: 202, 210, 211, 253, 254, 255, 256.

10 [0031] En particular, se han identificado las siguientes sustituciones: X202G, X210K/W/A, y X256K/R y X259G/M/Q/V.

[0032] En una forma de realización preferida, la lipasa variante tiene al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 2

15 [0033] En una forma de realización más preferida, la lipasa variante es una variante de la lipasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Sustituciones en la Región III

20 [0034] La Región III consiste en residuos de aminoácidos que forman una estructura flexible y, por lo tanto, permiten que el sustrato entre en el sitio activo. En esta región se prefiere sustituir un aminoácido de la lipasa progenitora con un aminoácido más positivo o un aminoácido menos hidrofóbico.

25 [0035] La variante de lipasa puede comprender al menos una sustitución en la Región III, tal como dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones en la Región III.

[0036] Los residuos de aminoácidos correspondientes a las siguientes posiciones están comprendidos por la Región II 82 a 102. Las siguientes posiciones son de interés particular: 83, 86, 87, 90, 91, 95, 96, 99.

30 [0037] En particular, se han identificado las siguientes sustituciones: X83T, X86V y X90A/R.

[0038] En una forma de realización preferida, la lipasa variante tiene al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 2

35 [0039] En una forma de realización más preferida, la lipasa variante es una variante de la lipasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Sustituciones en la Región IV

40 [0040] 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 progenitora con un aminoácido más positivo.

45 [0041] La variante de lipasa puede comprender al menos una sustitución en la Región IV, tal como dos, tres, cuatro, cinco o seis sustituciones en la Región IV.

[0042] Los residuos de aminoácidos correspondientes a las siguientes posiciones están comprendidos por la Región IV: 27 y 54 a 62. Las siguientes posiciones son de interés particular: 27, 56, 57, 58, 60.

50 [0043] En particular, se han identificado las siguientes sustituciones: X27R, X58N/AG/T/P y X60V/S/G/N/R/K/A/L.

[0044] En una forma de realización preferida, la lipasa variante tiene al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la SEQ ID NO: 2

55 [0045] En una forma de realización más preferida, la lipasa variante es una variante de la lipasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Aminoácidos en otras posiciones

60 [0046] La lipasa progenitora opcionalmente puede comprender alteraciones adicionales, por ejemplo sustitución de otros aminoácidos, particularmente menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6, menos de 5 alteraciones en comparación con una lipasa progenitora. Algunos ejemplos son sustituciones correspondientes a una o más de las posiciones 24, 37, 38, 46, 74, 81, 83, 115, 127, 131, 137, 143, 147, 150, 199, 200, 203, 206, 211, 263, 264, 265, 267 y 269 de la lipasa progenitora. En una forma de realización particular, hay una sustitución en al menos una de las posiciones correspondientes a la posición 81, 147, 150, 227 y 249. En una forma de realización preferida, al menos una sustitución se selecciona del grupo consistente

65

en X38R, X81Q/E, X143S/C/N/D/A, X147M/Y, X150G/K, X227G y X249R/I/L.

5 [0047] La variante puede comprender sustituciones fuera de la Región I a IV definida; el número de sustituciones fuera de la región I a IV definida es preferiblemente menos de seis, por ejemplo cinco, cuatro, tres, dos o una sustitución.

[0048] Otras sustituciones, por ejemplo, se pueden hacer 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.

10 Variantes de lipasa progenitora

[0049] Las lipasas variantes incluyen lipasas progenitoras idénticas a la SEQ ID NO: 2 que tienen las sustituciones enumeradas en la siguiente tabla (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).

Región I	Región II	Región III	Región IV	Regiones exteriores
T231 R + N233R	I255Y			

15 Nomenclatura para modificaciones de aminoácidos

[0050] Al describir variantes de lipasa según la invención, se usa la nomenclatura siguiente para facilitar la referencia:

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

20 [0051] Según esta nomenclatura, por ejemplo, la sustitución de ácido glutámico por glicina en la posición 195 se muestra como G195E. Una delección 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.

[0052] Cuando una lipasa específica contiene una "delección" en comparación con otras lipasas y se hace una inserción en esa posición, esto se indica como *36D para la inserción de un ácido aspártico en la posición 36.

30 [0053] Las mutaciones múltiples se separan por el signo más, por ejemplo: R170Y+G195E, que representa mutaciones en las posiciones 170 y 195 que sustituyen tirosina y ácido glutámico por arginina y glicina, respectivamente.

35 [0054] X231 indica el aminoácido en un polipéptido progenitor que corresponde con la posición 231, cuando se aplica el procedimiento de alineamiento descrito. X231 R indica que el aminoácido se sustituye con R. Para la SEQ ID NO: 2, X es T, y X231 R indica de este modo una sustitución de T en la posición 231 con R. Cuando el aminoácido que está en una posición (por ejemplo 231) se puede sustituir por otro aminoácido seleccionado de un grupo de aminoácidos, por ejemplo el grupo consistente en R y P e Y, esto será indicado por X231R/P/Y.

40 [0055] En cualquier caso, se emplea la abreviatura de aminoácidos de una letra o de tres letras aceptada por la IUPAC.

Agrupamiento de los aminoácidos

45 [0056] En esta especificación, los aminoácidos se clasifican como cargados negativamente, cargados positivamente o eléctricamente neutros según su carga eléctrica a pH 10. De este modo, los aminoácidos negativos son E, D, C (cisteína) e Y, particularmente E y D. Los aminoácidos positivos son R, K y H, particularmente R y K. Los aminoácidos neutros son G, A, V, L, I, P, F, W, S, T, M, N, Q y C cuando forman parte de un puente disulfuro. Una sustitución con otro aminoácido del mismo grupo, (negativo, positivo o neutro) se denomina sustitución conservadora.

[0057] Los aminoácidos neutros se pueden dividir en hidrofóbicos o no polares (G, A, V, L, I, P, F, W y C como parte de un puente disulfuro) e hidrofílicos o polares (S, T, M, N, Q).

55 Identidad de los aminoácidos

[0058] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad".

60 [0059] Para los fines de la presente invención, el alineamiento de dos secuencias de aminoácidos se determina usando el programa 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 por apertura de gap es 10, y la penalización por

extensión de gap es 0,5.

[0060] 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 SEQ ID NO: 2) y una secuencia de aminoácidos diferente ("secuencia extraña") se calcula como el número de coincidencias exactas en un alineamiento de las dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de la invención" o la longitud de la "secuencia extraña", la que sea más corta.

El resultado se expresa en identidad porcentual.

[0061] Una correspondencia exacta ocurre cuando la "secuencia de la invención" y la "secuencia extraña" tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones de la superposición. La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos de la secuencia (por ejemplo, la longitud de la SEQ ID NO: 2 es 269).

[0062] El procedimiento anterior se puede utilizar para el cálculo de la identidad, así como de la homología y para el alineamiento. En el contexto de la presente invención, la homología y el alineamiento se han calculado como se describe a continuación.

Homología y alineamiento

[0063] Para los fines de la presente invención, el grado de homología se puede determinar adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica, tales como GAP proporcionado en el paquete de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 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 de polipéptidos: penalización por creación de gap de 3,0 y penalización por extensión de gap de 0,1.

[0064] En la presente invención, las posiciones correspondientes (u homólogas) en las secuencias de 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 por el alineamiento mostrado en la figura 1.

[0065] Par encontrar las posiciones homólogas en 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 presente alineamiento de la figura 1 usando el alineamiento de gaps con la secuencia más homóloga encontrada por el programa GAP. GAP se encuentra en el paquete de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 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) Los siguientes ajustes se usan para la comparación de secuencias de polipéptidos: penalización por creación de gap de 3,0 y penalización por extensión de gap de 0,1.

Hibridación

[0066] La presente invención también se refiere a polipéptidos aislados que tienen actividad de lipasa que son codificados por polinucleótidos que se hibridan bajo condiciones de astringencia muy baja, condiciones de astringencia preferiblemente baja, más preferiblemente condiciones de astringencia media, más preferiblemente condiciones de astringencia media-alta, aún más preferiblemente condiciones de astringencia alta, y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy alta con (i) los nucleótidos 178 a 660 de la SEQ ID NO: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en los nucleótidos 178 a 660 de la SEQ ID NO: 1, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii), o (iv) una cadena complementaria de (i); (ii), o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor, Nueva York). Una subsecuencia de la SEQ ID NO: 1 contiene al menos 100 nucleótidos contiguos o, preferiblemente, al menos 200 nucleótidos contiguos. Además, la subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido que tiene actividad de lipasa.

[0067] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, las condiciones de astringencia muy baja a muy alta se definen como prehibridación e hibridación a 42°C en SSPE 5X, SDS al 0,3 %, 200 ug/ml de ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado, y o bien formamida al 25 % para astringencias muy baja y baja, o bien formamida al 35 % para astringencias media y media-alta, o bien formamida al 50 % para astringencias alta y muy alta, siguiendo procedimientos Southern blot estándar durante 12 a 24 horas óptimamente.

[0068] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos de longitud, el material portador finalmente se lava tres veces, cada una durante 15 minutos, utilizando SSC 2X, SDS al 0,2 % preferiblemente a al menos 45°C (astringencia muy baja), más preferiblemente a al menos 50°C (astringencia baja), más preferiblemente a al menos 55°C (astringencia media), más preferiblemente a al menos 60°C (astringencia media-alta), aún más preferiblemente a al menos 65°C (astringencia alta), y de la forma más preferible a al menos 70°C (astringencia muy alta).

Secuencia de ADN, vector de expresión, célula huésped, producción de lipasa

5 [0069] La invención proporciona una secuencia de ADN que codifica la lipasa de la invención, un vector de expresión que alberga la secuencia de ADN y una célula huésped transformada que contiene la secuencia de ADN o el vector de expresión. Estos se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica.

10 [0070] La invención también proporciona un método para producir la lipasa mediante el cultivo de la célula huésped transformada bajo condiciones propicias para la producción de la lipasa y la recuperación de la lipasa del caldo resultante. El método se puede practicar según principios conocidos en la técnica.

Actividad de lipasa

15 Actividad de lipasa en tributirina a pH neutro (LU)

[0071] Se prepara un sustrato para lipasa emulsionando tributirina (tributirato de glicerina) utilizando goma arábica como emulsionante. La hidrólisis de tributirina a 30 °C a pH 7 o 9 se observa en un análisis volumétrico pH-stat. Una unidad de actividad de lipasa (1 LU) es igual a la cantidad de enzima capaz de liberar 1 micromol de ácido butírico/min a pH 7.

20 Riesgo Beneficio

[0072] El factor de ries-beneficio que describe el rendimiento en comparación con el riesgo reducido de olor se define como: $BR = RP_{\text{medio}} / R$, como se describe a continuación.

25 Usos

[0073] Las enzimas de la presente invención pueden tener un uso industrial, por ejemplo incluirse en composiciones detergentes para eliminar materia grasa.

30 **EJEMPLOS**

[0074] Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos grado reactivo.

35 Medios y soluciones

[0075]

Producto	Nombre comercial
LAS:	Surfac PS
Zeolite A	Wessalith P

40 Otros ingredientes usados son reactivos estándar de laboratorio.

Materiales

45 [0076]

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

Ejemplo 1

Producción de enzima

50 [0077] Un plásmido que contiene el gen que codifica la lipasa se construye y se transforma en una célula huésped adecuada usando métodos estándar de la técnica.

55 [0078] La fermentación se realiza como una fermentación por lote alimentado utilizando una temperatura de medio constante de 34°C y un volumen inicial de 1,2 litros. El pH inicial del medio se fija a 6.5. Una vez el pH ha aumentado hasta 7.0, este valor se mantiene a través de la adición de H3PO4 al 10 %. El nivel de oxígeno disuelto en el medio se controla variando el índice de agitación y utilizando un índice de aireación fijo de 1,0 litro de aire por litro de medio por minuto. El ritmo de adición de la alimentación se mantiene a un nivel constante durante toda la fase de lote alimentado. El medio de lote contiene jarabe de maltosa como fuente de carbono, urea y extracto de levadura como fuentes de nitrógeno y una mezcla de sales y trazas metálicas. La alimentación añadida continuamente durante la fase de lote alimentado contiene jarabe de maltosa como fuente de carbono,

mientras que se añade extracto de levadura y urea para asegurar un suministro suficiente de nitrógeno.

[0079] La purificación de la lipasa puede realizarse usando métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo mediante filtración del sobrenadante de fermentación y, posteriormente, cromatografía hidrofóbica y cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo como se describe en EP 0 851 913 EP, ejemplo 3.

Ejemplo 2

AMSA - ensayo de esfuerzo mecánico automatizado - para el cálculo del rendimiento relativo (RP)

[0080] Las variantes de enzimas de la presente aplicación se evalúan utilizando el ensayo de esfuerzo mecánico automatizado (AMSA). Con la prueba AMSA se puede examinar el rendimiento de lavado de una gran cantidad de soluciones de detergente enzimático de pequeño volumen. La placa del AMSA tiene varias ranuras para soluciones de prueba y una tapa que comprime firmemente la muestra de textil que se ha de lavar contra todas las aberturas de las ranuras. Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de prueba, el textil y la tapa se agitan enérgicamente para poner la solución de prueba en contacto con el textil y aplicar tensión mecánica. Para una mayor descripción, véase WO02/42740, especialmente el párrafo "Special method embodiments" en la página 23-24. Los contenedores, que contienen la solución detergente de prueba, consisten en agujeros cilíndricos (6 mmv de diámetro, 10 mm de profundidad) en una placa metálica. El tejido manchado (material de prueba) descansa sobre la placa metálica y se usa como tapa y sello en los contenedores. Otra placa metálica descansa sobre el tejido manchado para evitar cualquier vertido de cada contenedor. Las dos placas metálicas con el tejido manchado se someten a vibración vertical a una frecuencia de 30 Hz con una amplitud de 2 mm.

[0081] El ensayo se llevó a cabo bajo las condiciones experimentales específicas a continuación:

Tabla 3

Solución de prueba	0,5 g/l de LAS 0,52 g/l de Na ₂ CO ₃ 1,07 g/l de Zeolite A 0,52 g/l Citrato de Na ₃
Volumen de la solución de prueba	160 micro l
pH	Sin alterar (≈9.9)
Tiempo de lavado	20 minutos
Temperatura	30 °C
Dureza del agua	15°dH Proporción de Ca ²⁺ /Mg ²⁺ /NaHCO ₃ : 4:1:7,5
Concentración enzimática en la solución de prueba	0,125, 0,25, 0,50, 1,0 mg ep / l
Secado	Rendimiento: Después del lavado, la pieza de textil se enjuaga inmediatamente en agua del grifo y se seca al aire a 85C en 5 min Olor: después del lavado, la pieza de textil se enjuaga inmediatamente en agua de grifo y se seca a temperatura ambiente (20°C) durante 2 horas
Material de prueba	Muestra de cúrcuma-nata como se describe a continuación (EMPA221 usado como textil de algodón)

[0082] Se prepararon muestras de cúrcuma-nata mezclando 5 g de cúrcuma (Santa Maria, Dinamarca) con 100 g de nata (38 % de grasa, Arla, 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. La mezcla se enfrió hasta 20°C. Se sumergieron muestras de tejido de algodón, EMPA221, en la mezcla de nata-cúrcuma y después se dejaron secar a temperatura ambiente durante la noche y se congelaron hasta su uso. La preparación de las muestras de nata-cúrcuma se describe en la solicitud de patente WO 2006/125437.

[0083] El rendimiento de la variante de la enzima se mide como el brillo del color de las muestras de textil lavadas con esa variante de enzima específica. El brillo también se puede expresar como la intensidad de la luz reflejada desde la muestra cuando se la ilumina con luz blanca. Cuando el textil está manchado, la intensidad de la luz reflejada es menor que en un textil limpio. Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada puede utilizarse para medir el rendimiento de lavado de una variante de una enzima.

[0084] Las mediciones de color se hacen con un escáner profesional de superficie plana (PFU DL2400pro), que se usa para capturar una imagen de las muestras de textil lavadas. La toma de imágenes se realiza con una resolución de 200 dpi y con una intensidad del color resultante de 24 bits. Para obtener resultados precisos, a menudo el escáner se calibra con una carta IT8 reflectante de Kodak.

[0085] Para extraer un valor para la intensidad de luz de las imágenes escaneadas, se usa una aplicación de software especialmente diseñada (Novozymes Color Vector Analyzer). El programa recupera los valores de 24 bits por píxel 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 entre sí como vectores y luego tomando la longitud del vector resultante:

5

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

[0086] El rendimiento de lavado (P) de las variantes se calcula de acuerdo con la fórmula siguiente:

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

10 donde

Int(v) es el valor de la intensidad de la luz de la superficie del textil lavada con enzimas, y

Int(r) es el valor de la intensidad de la luz de la superficie del textil lavada sin enzimas.

Una puntuación de rendimiento relativo se da como el resultado del lavado AMSA conforme a la definición:

15 Las puntuaciones de rendimiento relativo (RP) recogen los rendimientos (P) de las variantes de enzima de prueba respecto a la enzima de referencia:

$$RP = P(\text{enzima de prueba}) / P(\text{enzima de referencia})$$

20 RPmedio indica el rendimiento relativo medio en comparación con la enzima de referencia en las cuatro concentraciones enzimáticas (0,125; 0,25; 0,5; 1,0 mg de ep/l)

$$RP_{\text{medio}} = \text{medio}(RP(0,125), RP(0,25), RP(0,5), RP(1,0))$$

25 Se considera que una variante muestra un rendimiento del lavado mejorado si tiene un rendimiento mejor que la referencia.

En el contexto de la presente invención, la enzima de referencia es la lipasa de la SEQ ID NO: 2 con las sustituciones T231 R + N233R.

30 Ejemplo 3

GC - Cromatógrafo de gases - para el cálculo del factor de riesgo

35 [0087] La liberación de ácido butírico de las muestras lavadas con lipasa se midió por microextracción en fase sólida - cromatografía de gases (SPME-GC) utilizando el método siguiente. Cuatro piezas de textil (5 mm de diámetro), lavadas en la solución especificada en la Tabla 3 que contiene 1 mg/l de lipasa, se transfirieron a un vial de un cromatógrafo de gases (GC). Las muestras se analizaron en un Varian 3800 GC equipado con un Stabilwax- DA con columna Integra-Guard (30 m, 0,32 mm de ID y 0,25 micro-m de df) y una fibra Carboxen MEFS PDMS (75 micro-m). Cada muestra se preincubó durante 10 min a 40°C seguidos de 20 min de muestreo con la fibra MEFS en el espacio por encima de las piezas de textil. La muestra se inyectó posteriormente sobre la columna (temperatura de inyector = 250°C). Flujo de columna = 2 ml de helio/min. Gradiente de temperatura de horno de columna: 0 min = 40°C, 2 min = 40°C, 22 min = 240°C, 32 min = 240°C. El ácido butírico se detectó con un detector de ionización de llama (FID) y la cantidad de ácido butírico se calculó en función de una curva estándar de ácido butírico.

45 [0088] El riesgo de rendimiento de olor, R, de una variante de lipasa es la proporción entre la cantidad de ácido butírico liberado desde la muestra lavada de variante de lipasa y la cantidad de ácido butírico liberado desde una muestra lavada con la lipasa de la SEQ ID NO: 2 con las sustituciones T231 R + N233R (enzima de referencia), después de que ambos valores hayan sido corregidos para la cantidad de ácido butírico liberado desde una muestra lavada sin lipasa. El riesgo (R) de las variantes se calcula según la fórmula siguiente:

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

$$55 \quad \begin{aligned} \text{Alfa}_{\text{enzima de prueba}} &= \text{Olor}_{\text{enzima de prueba}} - \text{Blanco} \\ \text{Alfa}_{\text{enzima de referencia}} &= \text{Olor}_{\text{enzima de referencia}} - \text{Blanco} \\ R &= \text{Alfa}_{\text{enzima de prueba}} / \text{Alfa}_{\text{enzima de referencia}} \end{aligned}$$

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

Ejemplo 4

Actividad (LU) con respecto a la absorbancia a 280 nm

5 [0089] La actividad de una lipasa respecto a la absorbancia a 280 nm se determina mediante el ensayo siguiente:

LU/A280:

10 [0090] La actividad de la lipasa se determina como se ha descrito anteriormente en la sección Actividad de lipasa.

15 Se mide la absorbancia de la lipasa a 280 nm (A280) y se calcula la proporción LU/A280. La relación LU/A280 se calcula como la LU/A280 de la variante dividida por la LU/A280 de una enzima de referencia. En el contexto de la presente invención, la enzima de referencia es la lipasa de la SEQ ID NO: 2 con las sustituciones T231 R + N233R.

Ejemplo 5

BR - Riesgo Beneficio

20 [0091] El factor de Riesgo-Beneficio que describe el rendimiento en comparación con el riesgo reducido de olor se define como:

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

25 Se considera que una variante muestra un rendimiento de lavado mejorado y un olor reducido si el factor BR es superior a 1.

[0092] Al aplicar los métodos anteriores, se obtuvieron los siguientes resultados:

30

Tabla 4

35

Variante	Mutaciones en la SEQ ID NO: 2	RP medio (RP _{medio})	BR	LU/A280
1	I202G + T231R + N233R	0,84	1,41	no determinado
2	I86V + L227G + T231R + N233R + P256K	1,08	1,52	1700
3	Q4V + S58N + V60S + T231R + N233R	0,87	1,73	1950
4	S58N + V60S + I90R + T231R + N233R	1,06	1,27	2250
5	I255Y + T231R + N233R	1,19	1,17	3600
6	I90A + T231R + N233R + I255V	1,13	1,14	2700
Referencia	T231R + N233R	1,00	1,00	3650
7	G91A + E99K + T231R+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

[0093] La lipasa de referencia y las variantes 7 y 8 de la Tabla 4 se describen en WO 2000/060063.

Ejemplo 6

40

BR - Riesgo Beneficio

[0094] Se midió el Riesgo-Beneficio para las variantes enumeradas en la Tabla 5. El factor de Riesgo-Beneficio se midió de la misma manera que se describe en el Ejemplo 5 y estuvo por encima de 1 para todas las variantes enumeradas.

45

Tabla 5

ES 2 628 940 T3

Variante	Mutaciones en la SEQ ID NO: 2
Referencia	T231R + N233R
9	L97V+ T231R+N233R
10	A150G+T231R+N233R
11	I90R+T231R+N233R
12	I202V+T231R+N233R
13	L227G+ T231R+ N233R+ P256K
14	I90A+ T231R+ N233R
15	T231R+N233R+ I255P
16	I90V+I255V+T231R+N233R
17	F211L+ L227G+ T231R+ N233R+ I255L+ P256K
18	S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L
19	S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249I
20	A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
21	K46L+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
22	Q4L+ E43T+ K46I+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
23	Q4L+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
24	K46I+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254L
25	K46L+ S58N+ V60S+ K223I+ T231R+ N233R+ D254I
26	E43T+ K46I+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
27	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
28	K24R+ K46R+ K74R+ I86V+ K98R+ K127R+ D137K+ A150G+ K223R+ T231R+ N233R
29	S58A+V60A+ I86V+T231R+N233R
30	K24R+ K46R+ S58N+ V60S+ K74R+ I86V+ K98R+ K127R+ D137K+ K223R+ T231R+ N233R
31	S58A+ V60A+ I86V+ A150G+ T231R+ N233R
32	S58N+ V60V+ D62G+ T231R+ N233R
33	Q4V+ S58N+ V60S+ I86V+ T231R+ N233R+ Q249L
34	Q4V+ S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ T231R+ N233R+ I255V
35	Q4V+ S58N+ V60S+ I90A+ A150G+ T231R+ N233R+ I255V
36	Y53A+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ P256L
37	I202L+ T231R+ N233R+ I255A
38	S58A+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
39	D27R+ S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
40	V60K+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
41	Q4V+ S58A+ V60S+ S83T+ I86V+ A150G+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
42	Q4V+ V60K+ S83T+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K

ES 2 628 940 T3

43	D27R+ V60K+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
44	Q4N+ L6S+ S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
45	E1N+ V60K+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
46	V60K+ I86V+ A150G+ K223N+ G225S+ T231R+ N233R+ P256K
47	E210V+ T231R+ N233R+ Q249R
48	S58N+ V60S+ E210V+ T231R+ N233R+ Q249R
49	Q4V+ V60K+ I90R+ T231R+ N233R+ I255V
50	Q4V+ V60K+ A150G+ T231R+ N233R
51	V60K+ S83T+ T231R+ N233R
52	V60K+ A150G+ T231R+ N233R+ I255V
53	T231R+ N233G+ D234G
54	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+ Q249R+ P256K
55	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+ I255A+ P256K
56	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ G156R+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+ I255A+ P256K
57	S58T+ V60K+ I86V+ N94K+ A150G+ E210V+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
58	S58T+ V60K+ I86V+ D102A+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
59	S58T+ V60K+ I86V+ D102A+ A150G+ E210V+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
60	S58T+ V60K+ S83T+ I86V+ N94K+ A150G+ E210V+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
61	S58A+ V60S+ I86V+ T143S+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
62	G91S+ D96V+ D254R
63	V60L+ G91M+ T231W+ Q249L
64	T37A+ D96A+ T231R+ N233R+ Q249G
65	E56G+E87D+T231R+N233R+D254A
66	E210K+T231R+N233R
67	D27H+E87Q+D96N+T231R+N233R+D254V
68	F181L+E210V+T231R+N233R
69	D27N+ D96G+ T231R+ N233R
70	D96N+ T231R+ N233R
71	T231R+ N233I+ D234G
72	S58K+ V60L+ E210V+ Q249R
73	S58H+ V60L+ E210V+ Q249R
74	Q4V+ F55V+ I86V+ T231R+ N233R+ I255V
75	Q4V+ S58T+ V60K+ T199L+ N200A+ E210K+ T231R+ N233R+ I255A+ P256K
76	Q4V+ D27N+ V60K+ T231R+ N233R
77	I90F+ I202P+ T231R+ N233R+ I255L
78	S58N+ V60S+ D158N+ T231R+ N233R
79	S58N+ V60S+ S115K+ T231R+ N233R

ES 2 628 940 T3

80	S58N+ V60S+ L147M+ A150G+ F211L+ T231R+ N233R
81	V60K+ A150G+ T231R+ N233R
82	I90V+L227G+T231R+N233R+ P256K
83	T231R+N233R+ I255S
84	I86G+ T231R+ N233R
85	V60K+ I202V+ E210K+ T231R+ N233R+ I255A+ P256K
86	I90G+ I202L+ T231R+ N233R+ I255S
87	S58G+ V60G+ T231R+ N233R

[0095] La lipasa de referencia se describe en WO 2000/060063.

5

LISTADO DE SECUENCIAS

[0096]

10

<110> Novozymes A/S
 Novozymes North America, Inc.
 Vind, Jesper
 Knotzel, Jurgen Carsten Franz
 Borch, Kim
 15 Svendsen, Allan
 Callisen, Thomas Honger
 Yaver, Debbie
 Bjornvad, Mads Eskelund
 Hansen, Peter Kamp
 20 Ge, Haiyan
 Lamsa, Michael

<120> Variantes de lipasa

25

<130> 10928.204-WO

<160> 18

<170> PatentIn version 3.4

30

<210> 1
 <211> 807
 <212> DNA
 <213> Thermomyces lanuginosus

35

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(807)

40

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (1)..()

45

<400> 1

gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc aat ctc ttt gca cag tat
 Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr

48

ES 2 628 940 T3

	1		5		10		15										
5	tct Ser	gca Ala	gcc Ala	gca Ala	tac Tyr	tgc Cys	gga Gly	aaa Lys	aac Asn	aat Asn	gat Asp	gcc Ala	cca Pro	gct Ala	ggt Gly	aca Thr	96
			20				25					30					
10	aac Asn	att Ile	acg Thr	tgc Cys	acg Thr	gga Gly	aat Asn	gcc Ala	tgc Cys	ccc Pro	gag Glu	gta Val	gag Glu	aag Lys	gcg Ala	gat Asp	144
			35				40					45					
15	gca Ala	acg Thr	ttt Phe	ctc Leu	tac Tyr	tcg Ser	ttt Phe	gaa Glu	gac Asp	tct Ser	gga Gly	gtg Val	ggc Gly	gat Asp	gtc Val	acc Thr	192
			50				55					60					
20	ggc Gly	ttc Phe	ctt Leu	gct Ala	ctc Leu	gac Asp	aac Asn	acg Thr	aac Asn	aaa Lys	ttg Leu	atc Ile	gtc Val	ctc Leu	tct Ser	ttc Phe	240
						70					75					80	
25	cgt Arg	ggc Gly	tct Ser	cgt Arg	tcc Ser	ata Ile	gag Glu	aac Asn	tgg Trp	atc Ile	ggg Gly	aat Asn	ctt Leu	aac Asn	ttc Phe	gac Asp	288
					85					90					95		
30	ttg Leu	aaa Lys	gaa Glu	ata Ile	aat Asn	gac Asp	att Ile	tgc Cys	tcc Ser	ggc Gly	tgc Cys	agg Arg	gga Gly	cat His	gac Asp	ggc Gly	336
				100				105					110				
35	ttc Phe	act Thr	tcg Ser	tcc Ser	tgg Trp	agg Arg	tct Ser	gta Val	gcc Ala	gat Asp	acg Thr	tta Leu	agg Arg	cag Gln	aag Lys	gtg Val	384
			115					120					125				
40	gag Glu	gat Asp	gct Ala	gtg Val	agg Arg	gag Glu	cat His	ccc Pro	gac Asp	tat Tyr	cgc Arg	gtg Val	gtg Val	ttt Phe	acc Thr	gga Gly	432
			130				135					140					
45	cat His	agc Ser	ttg Leu	ggt Gly	ggt Gly	gca Ala	ttg Leu	gca Ala	act Thr	gtt Val	gcc Ala	gga Gly	gca Ala	gac Asp	ctg Leu	cgt Arg	480
						150					155					160	
50	gga Gly	aat Asn	ggg Gly	tat Tyr	gat Asp	atc Ile	gac Asp	gtg Val	ttt Phe	tca Ser	tat Tyr	ggc Gly	gcc Ala	ccc Pro	cga Arg	gtc Val	528
				165					170						175		
55	gga Gly	aac Asn	agg Arg	gct Ala	ttt Phe	gca Ala	gaa Glu	ttc Phe	ctg Leu	acc Thr	gta Val	cag Gln	acc Thr	ggc Gly	gga Gly	aca Thr	576
				180					185					190			
60	ctc Leu	tac Tyr	cgc Arg	att Ile	acc Thr	cac His	acc Thr	aat Asn	gat Asp	att Ile	gtc Val	cct Pro	aga Arg	ctc Leu	ccg Pro	ccg Pro	624
				195				200					205				
65	cgc Arg	gaa Glu	ttc Phe	ggt Gly	tac Tyr	agc Ser	cat His	tct Ser	agc Ser	cca Pro	gag Glu	tac Tyr	tgg Trp	atc Ile	aaa Lys	tct Ser	672
			210					215				220					
70	gga Gly	acc Thr	ctt Leu	gtc Val	ccc Pro	gtc Val	acc Thr	cga Arg	aac Asn	gat Asp	atc Ile	gtg Val	aag Lys	ata Ile	gaa Glu	ggc Gly	720
						225					230					240	
75	atc Ile	gat Asp	gcc Ala	acc Thr	ggc Gly	ggc Gly	aat Asn	aac Asn	cag Gln	cct Pro	aac Asn	att Ile	ccg Pro	gat Asp	atc Ile	cct Pro	768

ES 2 628 940 T3

	245	250	255	
5	gcg cac cta tgg tac ttc ggg tta att ggg aca tgt ctt Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu			807
	260	265		
10	<210> 2 <211> 269 <212> PRT <213> Thermomyces lanuginosus <400> 2			
15	Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr 1 5 10 15			
20	Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr 20 30			
25	Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp 35 40 45			
30	Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr 50 55 60			
35	Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe 65 70 75 80			
40	Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp 85 90 95			
45	Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly 100 105 110			
50	Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val 115 120 125			
55	Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly 130 135 140			
60	His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg 145 150 155 160			
65	Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val 165 170 175			
70	Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr 180 185 190			

ES 2 628 940 T3

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

10 Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
 210 215 220

15 Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
 225 230 235 240

20 Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
 260 265

25 <210> 3
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Absidia reflexa
 <400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Phe Leu Asp Ser Tyr Asn Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val
 115 120 125

ES 2 628 940 T3

Lys Ala Gln Leu Asp Arg His Pro Gly Tyr Lys Ile Val Val Thr Gly
 130 135 140
 5
 His Ser Leu Gly Gly Ala Thr Ala Val Leu Ser Ala Leu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160
 10
 His His Gly His Ala Asn Ile Glu Ile Tyr Thr Gln Gly Gln Pro Arg
 165 170 175
 15
 Ile Gly Thr Pro Ala Phe Ala Asn Tyr Val Ile Gly Thr Lys Ile Pro
 180 185 190
 20
 Tyr Gln Arg Leu Val His Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu Pro Pro
 195 200 205
 25
 Gly Ala Phe Gly Phe Leu His Ala Gly Glu Glu Phe Trp Ile Met Lys
 210 215 220
 30
 Asp Ser Ser Leu Arg Val Cys Pro Asn Gly Ile Glu Thr Asp Asn Cys
 225 230 235 240
 35
 Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr
 245 250 255
 40
 Leu Asp Met Asn Thr Gly Leu Cys Leu
 260 265
 <210> 4
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> Absidia corymbifera
 <400> 4
 45
 Ser Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile Lys
 1 5 10 15
 50
 Ala His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg Thr
 20 25 30
 55
 Val Ile Pro Gly Gly Gln Trp Ser Cys Pro His Cys Asp Val Ala Pro
 35 40 45
 60
 Asn Leu Asn Ile Thr Lys Thr Phe Thr Thr Leu Ile Thr Asp Thr Asn
 50 55 60

ES 2 628 940 T3

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

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

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

15 Leu Asp Ser Tyr Asn Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val Lys
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

60 Asp Met Asn Thr Gly Leu Cys Leu
 260

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

<400> 5

60 Ser Ile Asp Gly Gly Ile Arg Ala Ala Thr Ser Gln Glu Ile Asn Glu

ES 2 628 940 T3

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

ES 2 628 940 T3

				245					250					255				
5	His	Leu	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ile	Asn	Thr	Gly	Leu	Cys	Thr					
				260					265									
	<210>	6																
10	<211>	271																
	<212>	PRT																
	<213>	Rhizopus	oryzae															
	<400>	6																
15	Ser	Ala	Ser	Asp	Gly	Gly	Lys	Val	Val	Ala	Ala	Thr	Thr	Ala	Gln	Ile		
	1				5					10					15			
20	Gln	Glu	Phe	Thr	Lys	Tyr	Ala	Gly	Ile	Ala	Ala	Thr	Ala	Tyr	Cys	Arg		
				20					25					30				
25	Ser	Val	Val	Pro	Gly	Asn	Lys	Trp	Asp	Cys	Val	Gln	Cys	Gln	Lys	Trp		
			35					40					45					
30	Val	Pro	Asp	Gly	Lys	Ile	Ile	Thr	Thr	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Ser	Asp		
	50						55					60						
35	Thr	Asn	Gly	Tyr	Val	Leu	Arg	Ser	Asp	Lys	Gln	Lys	Thr	Ile	Tyr	Leu		
	65					70					75					80		
40	Val	Phe	Arg	Gly	Thr	Asn	Ser	Phe	Arg	Ser	Ala	Ile	Thr	Asp	Ile	Val		
					85					90					95			
45	Phe	Asn	Phe	Ser	Asp	Tyr	Lys	Pro	Val	Lys	Gly	Ala	Lys	Val	His	Ala		
			100						105					110				
50	Gly	Phe	Leu	Ser	Ser	Tyr	Glu	Gln	Val	Val	Asn	Asp	Tyr	Phe	Pro	Val		
			115					120					125					
55	Val	Gln	Glu	Gln	Leu	Thr	Ala	His	Pro	Thr	Tyr	Lys	Val	Ile	Val	Thr		
	130						135					140						
60	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Gln	Ala	Leu	Leu	Ala	Gly	Met	Asp	Leu		
	145					150					155					160		
65	Tyr	Gln	Arg	Glu	Pro	Arg	Leu	Ser	Pro	Lys	Asn	Leu	Ser	Ile	Phe	Thr		
					165					170					175			
70	Val	Gly	Gly	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Pro	Thr	Phe	Ala	Tyr	Tyr	Val	Glu		
			180						185					190				

ES 2 628 940 T3

5 Ser Thr Gly Ile Pro Phe Gln Arg Thr Val His Lys Arg Asp Ile Val
195 200 205

10 Pro His Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu
210 215 220

15 Ser Trp Ile Lys Ser Gly Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr Ser Glu
225 230 235 240

20 Ile Glu Thr Lys Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Ile
245 250 255

25 Leu Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu
260 265 270

<210> 7
<211> 267
<212> PRT
<213> *Aspergillus niger*

<400> 7

30 Thr Ala Gly His Ala Leu Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ile Ser Glu Asp
1 5 10 15

35 Leu Tyr Ser Arg Leu Val Glu Met Ala Thr Ile Ser Gln Ala Ala Tyr
20 25 30

40 Ala Asp Leu Cys Asn Ile Pro Ser Thr Ile Ile Lys Gly Glu Lys Ile
35 40 45

45 Tyr Asn Ser Gln Thr Asp Ile Asn Gly Trp Ile Leu Arg Asp Asp Ser
50 55 60

50 Ser Lys Glu Ile Ile Thr Val Phe Arg Gly Thr Gly Ser Asp Thr Asn
65 70 75 80

55 Leu Gln Leu Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Pro Phe Asp Thr Leu Pro
85 90 95

60 Gln Cys Asn Gly Cys Glu Val His Gly Gly Tyr Tyr Ile Gly Trp Val
100 105 110

Ser Val Gln Asp Gln Val Glu Ser Leu Val Lys Gln Gln Val Ser Gln
115 120 125

ES 2 628 940 T3

Tyr Pro Asp Tyr Ala Leu Thr Val Thr Gly His Ser Leu Gly Ala Ser
 130 135 140
 5
 Leu Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gln Leu Ser Ala Thr Tyr Asp Asn Ile
 145 150 155 160
 10
 Arg Leu Tyr Thr Phe Gly Glu Pro Arg Ser Gly Asn Gln Ala Phe Ala
 165 170 175
 15
 Ser Tyr Met Asn Asp Ala Phe Gln Ala Ser Ser Pro Asp Thr Thr Gln
 180 185 190
 20
 Tyr Phe Arg Val Thr His Ala Asn Asp Gly Ile Pro Asn Leu Pro Pro
 195 200 205
 25
 Val Glu Gln Gly Tyr Ala His Gly Gly Val Glu Tyr Trp Ser Val Asp
 210 215 220
 30
 Pro Tyr Ser Ala Gln Asn Thr Phe Val Cys Thr Gly Asp Glu Val Gln
 225 230 235 240
 35
 Cys Cys Glu Ala Gln Gly Gly Gln Gly Val Asn Asn Ala His Thr Thr
 245 250 255
 40
 Tyr Phe Gly Met Thr Ser Gly Ala Cys Thr Trp
 260 265
 <210> 8
 <211> 266
 <212> PRT
 <213> Aspergillus tubingensis
 <400> 8
 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
 55
 Ala Asp Leu Cys Asn Ile Pro Ser Thr Ile Ile Lys Gly Glu Lys Ile
 35 40 45
 60
 Tyr Asn Ser Gln Thr Asp Ile Asn Gly Trp Ile Leu Arg Asp Asp Ser
 50 55 60

ES 2 628 940 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	Ser	Cys	Glu	Val	His	Gly	Gly	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Trp	Ile
				100					105					110		
15	Ser	Val	Gln	Asp	Gln	Val	Glu	Ser	Leu	Val	Gln	Gln	Gln	Val	Ser	Gln
			115					120					125			
20	Phe	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	Asn	Gln	Ala	Phe	Ala	Ser
					165					170						175
35	Tyr	Met	Asn	Asp	Ala	Phe	Gln	Ala	Ser	Ser	Pro	Asp	Thr	Thr	Gln	Tyr
				180					185					190		
40	Phe	Arg	Val	Thr	His	Ala	Asn	Asp	Gly	Ile	Pro	Asn	Leu	Pro	Pro	Ala
			195					200					205			
45	Asp	Glu	Gly	Tyr	Ala	His	Gly	Val	Val	Glu	Tyr	Trp	Ser	Val	Asp	Pro
	210						215					220				
50	Tyr	Ser	Ala	Gln	Asn	Thr	Phe	Val	Cys	Thr	Gly	Asp	Glu	Val	Gln	Cys
	225					230					235					240
55	Cys	Glu	Ala	Gln	Gly	Gly	Gln	Gly	Val	Asn	Asn	Ala	His	Thr	Thr	Tyr
				245						250					255	
60	Phe	Gly	Met	Thr	Ser	Gly	His	Cys	Thr	Trp						
			260						265							
	<210>		9													
	<211>		276													
	<212>		PRT													
	<213>		Fusarium oxysporum													
	<400>		9													
60	Ala	Val	Gly	Val	Thr	Thr	Thr	Asp	Phe	Ser	Asn	Phe	Lys	Phe	Tyr	Ile

ES 2 628 940 T3

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

ES 2 628 940 T3

				245					250					255			
5	His	Leu	His	Tyr	Phe	Gln	Ala	Thr	Asp	Ala	Cys	Asn	Ala	Gly	Gly	Phe	
				260					265					270			
10	Ser	Trp	Arg	Arg													
				275													
15	<210>	10															
	<211>	273															
	<212>	PRT															
	<213>	Fusarium heterosporum															
	<400>	10															
20	Thr	Val	Thr	Thr	Gln	Asp	Leu	Ser	Asn	Phe	Arg	Phe	Tyr	Leu	Gln	His	
	1				5					10					15		
25	Ala	Asp	Ala	Ala	Tyr	Cys	Asn	Phe	Asn	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Pro	Val	
				20					25					30			
30	His	Cys	Ser	Ala	Gly	Asn	Cys	Pro	Asp	Ile	Glu	Lys	Asp	Ala	Ala	Ile	
			35					40					45				
35	Val	Val	Gly	Ser	Val	Val	Gly	Thr	Lys	Thr	Gly	Ile	Gly	Ala	Tyr	Val	
		50					55					60					
40	Ala	Thr	Asp	Asn	Ala	Arg	Lys	Glu	Ile	Val	Val	Ser	Val	Arg	Gly	Ser	
	65					70					75					80	
45	Ile	Asn	Val	Arg	Asn	Trp	Ile	Thr	Asn	Phe	Asn	Phe	Gly	Gln	Lys	Thr	
				85						90					95		
50	Cys	Asp	Leu	Val	Ala	Gly	Cys	Gly	Val	His	Thr	Gly	Phe	Leu	Asp	Ala	
				100					105					110			
55	Trp	Glu	Glu	Val	Ala	Ala	Asn	Val	Lys	Ala	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Lys	
			115					120					125				
60	Thr	Ala	Asn	Pro	Thr	Phe	Lys	Phe	Val	Val	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly	
				130			135					140					
65	Gly	Ala	Val	Ala	Thr	Ile	Ala	Ala	Ala	Tyr	Leu	Arg	Lys	Asp	Gly	Phe	
	145					150					155					160	
70	Pro	Phe	Asp	Leu	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Ser	Pro	Arg	Val	Gly	Asn	Asp	Phe	
				165						170					175		

ES 2 628 940 T3

5 Phe Ala Asn Phe Val Thr Gln Gln Thr Gly Ala Glu Tyr Arg Val Thr
180 185 190

10 His Gly Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Ile Val Phe Gly Tyr
195 200 205

15 Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Asn Gly Gly Pro Leu Asp Lys
210 215 220

20 Asp Tyr Thr Val Thr Glu Ile Lys Val Cys Glu Gly Ile Ala Asn Val
225 230 235 240

25 Met Cys Asn Gly Gly Thr Ile Gly Leu Asp Ile Leu Ala His Ile Thr
245 250 255

30 Tyr Phe Gln Ser Met Ala Thr Cys Ala Pro Ile Ala Ile Pro Trp Lys
260 265 270

35 Arg

<210> 11
<211> 278
<212> PRT
<213> Aspergillus oryzae

40 Asp Ile Pro Thr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Lys Phe Trp Val Gln Tyr
1 5 10 15

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

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

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

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

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

ES 2 628 940 T3

Gln Thr Asp Pro Gly Leu Cys Asp Gly Cys Lys Ala Glu Leu Gly Phe
 100 105 110
 5
 Trp Thr Ala Trp Lys Val Val Arg Asp Arg Ile Ile Lys Thr Leu Asp
 115 120 125
 10
 Glu Leu Lys Pro Glu His Ser Asp Tyr Lys Ile Val Val Val Gly His
 130 135 140
 15
 Ser Leu Gly Ala Ala Ile Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asp Leu Arg Thr
 145 150 155 160
 20
 Lys Asn Tyr Asp Ala Ile Leu Tyr Ala Tyr Ala Ala Pro Arg Val Ala
 165 170 175
 25
 Asn Lys Pro Leu Ala Glu Phe Ile Thr Asn Gln Gly Asn Asn Tyr Arg
 180 185 190
 30
 Phe Thr His Asn Asp Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Leu Leu Thr Met
 195 200 205
 35
 Gly Tyr Val His Ile Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Thr Ala Pro Asp Asn
 210 215 220
 40
 Thr Thr Val Thr Asp Asn Gln Val Thr Val Leu Asp Gly Tyr Val Asn
 225 230 235 240
 45
 Phe Lys Gly Asn Thr Gly Thr Ser Gly Gly Leu Pro Asp Leu Leu Ala
 245 250 255
 50
 Phe His Ser His Val Trp Tyr Phe Ile His Ala Asp Ala Cys Lys Gly
 260 265 270
 55
 Pro Gly Leu Pro Leu Arg
 275
 <210> 12
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> Penicillium camemberti
 <400> 12
 Asp Val Ser Thr Ser Glu Leu Asp Gln Phe Glu Phe Trp Val Gln Tyr
 1 5 10 15
 60

ES 2 628 940 T3

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

ES 2 628 940 T3

Glu Ala His Ile Trp Tyr Phe Val Gln Val Asp Ala Gly Lys Gly Pro
 260 265 270

5 Gly Leu Pro Phe Lys Arg
 275

<210> 13
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus foetidus*

<400> 13

15 Ser Val Ser Thr Ser Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp
 1 5 10 15

20 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn
 20 25 30

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

30 Thr Met Leu Leu Glu Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala
 50 55 60

35 Gly Phe Leu Ala Ala Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe
 65 70 75 80

40 Arg Gly Ser Ser Thr Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile
 85 90 95

45 Leu Glu Asp Asn Asp Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly
 100 105 110

50 Phe Trp Lys Ala Trp Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile
 115 120 125

55 Lys Ser Ala Met Ser Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly
 130 135 140

60 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg
 145 150 155 160

65 Asn Asp Gly Tyr Ser Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile
 165 170 175

70 Gly Asn Tyr Ala Leu Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala

ES 2 628 940 T3

			180					185					190			
5	Asn	Phe	Arg	Val	Thr	His	Leu	Asn	Asp	Ile	Val	Pro	Arg	Val	Pro	Pro
			195					200					205			
10	Met	Asp	Phe	Gly	Phe	Ser	Gln	Pro	Ser	Pro	Glu	Tyr	Trp	Ile	Thr	Ser
		210					215					220				
15	Gly	Asn	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Ala	Ser	Asp	Ile	Glu	Val	Ile	Glu	Gly
	225					230					235					240
20	Ile	Asn	Ser	Thr	Ala	Gly	Asn	Ala	Gly	Glu	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Leu
					245					250					255	
25	Ala	His	Leu	Trp	Tyr	Phe	Phe	Ala	Ile	Ser	Glu	Cys	Leu	Leu		
			260						265					270		
	<210>	14														
	<211>	270														
	<212>	PRT														
	<213>	Aspergillus niger														
30	<400>	14														
	Ser	Val	Ser	Thr	Ser	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Gln	Leu	Phe	Ser	Gln	Trp
	1				5					10					15	
35	Ser	Ala	Ala	Ala	Tyr	Cys	Ser	Asn	Asn	Ile	Asp	Ser	Asp	Asp	Ser	Asn
			20						25					30		
40	Val	Thr	Cys	Thr	Ala	Asp	Ala	Cys	Pro	Ser	Val	Glu	Glu	Ala	Ser	Thr
			35					40					45			
45	Lys	Met	Leu	Leu	Glu	Phe	Asp	Leu	Thr	Asn	Asn	Phe	Gly	Gly	Thr	Ala
	50						55					60				
50	Gly	Phe	Leu	Ala	Ala	Asp	Asn	Thr	Asn	Lys	Arg	Leu	Val	Val	Ala	Phe
	65					70					75					80
55	Arg	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Lys	Asn	Trp	Ile	Ala	Asp	Leu	Asp	Phe	Ile
					85					90					95	
60	Leu	Gln	Asp	Asn	Asp	Asp	Leu	Cys	Thr	Gly	Cys	Lys	Val	His	Thr	Gly
				100					105					110		
	Phe	Trp	Lys	Ala	Trp	Glu	Ala	Ala	Ala	Asp	Asn	Leu	Thr	Ser	Lys	Ile
			115						120					125		

ES 2 628 940 T3

5 Lys Ser Ala Met Ser Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly
 130 135 140

10 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg
 145 150 155 160

15 Asn Asp Gly Tyr Ser Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Val
 165 170 175

20 Gly Asn Tyr Ala Leu Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala
 180 185 190

25 Asn Phe Pro Val Thr His Leu Asn Asp Ile Val Pro Arg Val Pro Pro
 195 200 205

30 Met Asp Phe Gly Phe Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser
 210 215 220

35 Gly Thr Gly Ala Ser Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Leu Ile Glu Gly
 225 230 235 240

40 Ile Asn Ser Thr Ala Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Asp Val Leu
 245 250 255

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

50 <210> 15
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Aspergillus oryzae

55 <400> 15

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

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

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

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

ES 2 628 940 T3

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

5

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

10

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

15

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

20

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

25

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

30

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

35

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

40

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

45

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

50

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

55

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

60

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

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

<400> 16

ES 2 628 940 T3

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

ES 2 628 940 T3

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

5 <210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Sequence used for alignment

<400> 17

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

20 <210> 18
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sequence used for alignment

25 <400> 18

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante de una lipasa progenitora, donde la lipasa variante es al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 y comprende al menos tres sustituciones seleccionadas del grupo consistente en (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración):
- a) al menos dos sustituciones en la Región I, y
 - b) al menos una sustitución en la Región II, y
 - c) al menos una sustitución en la Región III, y
 - d) al menos una sustitución en la Región IV;
- 10 y donde la variante tiene actividad de lipasa y muestra un rendimiento de lavado y olor mejorados y comprende las sustituciones T231 R +N233R +I255Y.
- 15 2. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde la lipasa variante es al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.
3. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde la lipasa progenitora es la lipasa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.
- 20 4. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde la lipasa comprende otra sustitución en la posición que corresponde a la posición 4 y/o a la posición 227 de la SEQ ID NO: 2.
5. Variante de lipasa según la reivindicación 4, donde la lipasa tiene una sustitución que corresponde con X4V y X227G (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 25 6. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde al menos una sustitución en la Región II de la lipasa progenitora comprende sustituciones seleccionadas del grupo consistente en sustituciones en posiciones que corresponden con las posiciones 202, 210, 211, y 256 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 30 7. Variante de lipasa según la reivindicación 6, donde al menos una sustitución en la lipasa progenitora se selecciona del grupo consistente en X202G, X210K, X211 L, y X256K (usando SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 35 8. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde al menos una sustitución en la Región III de la lipasa progenitora comprende sustituciones seleccionadas del grupo consistente en sustituciones en posiciones que corresponden con las posiciones 83, 86 y 90 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 40 9. Variante de lipasa según la reivindicación 8, donde al menos una sustitución en la lipasa progenitora se selecciona del grupo consistente en X83T, X86V y X90A/R (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
10. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde al menos una sustitución en la Región IV de la lipasa progenitora comprende sustituciones seleccionadas del grupo consistente en sustituciones en posiciones que corresponden con las posiciones 27, 58 y 60 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 45 11. Variante de lipasa según la reivindicación 10, donde al menos una sustitución en la Región IV de la lipasa progenitora comprende sustituciones seleccionadas del grupo consistente en X27R, X58N/A/G/P/T y X60S/V/G/N/R/K/A/L (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 50 12. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde la variante de lipasa comprende además al menos una sustitución en la lipasa progenitora seleccionada del grupo consistente en sustituciones en posiciones que corresponden con la posición 81, 147, 150, 227 y 249 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 55 13. Variante de lipasa según la reivindicación 12, donde la variante de lipasa comprende además al menos una sustitución seleccionada del grupo consistente en X81Q/E, X147M/Y, X150G y X249R/I/L (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
14. Secuencia de ADN que codifica la variante de lipasa de las reivindicaciones 1-13.
- 60 15. Vector de expresión que alberga la secuencia de ADN según la reivindicación 14.
16. Célula huésped transformada que contiene la secuencia de ADN según la reivindicación 14.
- 65 17. Método para producir una variante de lipasa, método el cual comprende cultivar la célula huésped transformada de la reivindicación 16 bajo condiciones propicias para la producción de la variante de lipasa y recuperar la variante de lipasa del caldo resultante.

ES 2 628 940 T3

```

ID NO 1: SSSSTQDYRIASEAEIKAHTFYTALSANA
ID NO 2: SSSSTQDYRIASEAEIKAHTFYTALSANA
ID NO 3: SIDGGIRAATSQEINELTYTTLANS
ID NO 4: SASDGGKVVAATTAQIQEFTKYAGIAATA
ID NO 5: TAGHALAASTQ GISEDLYSRL VEMATISQAA
ID NO 6: TAGHALAASTQ GISEDLYSRL VEMATISQAA
ID NO 7: AVGVTTTDFSNFKFYIQHGAAA
ID NO 8: TVTTQDLSNFRFYLQHADAA
ID NO 9: DIPTTQLEDFKFWVQYAAAT
ID NO 10: DVSTSELQDFEFWVQYAAAS
ID NO 11: SVSTSTLDELQLFAQWSAAA
ID NO 12: SVSTSTLDELQLFQWSAAA
ID NO 13: DVSSLLNLDLFAQYSAAA
ID NO 14: EVSQDLFNQFNLFAQYSAAA
ID NO 15: PQDAYTASHADLVKYATYAGLA

ID NO 1: YCRTVIPG GRWSCPFCGVAS NLQITKTFST LITDTNVLVAV
ID NO 2: YCRTVIPG GQWSCPFCDVAP NLNITKTFST 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 GKPVHCSAGNCPDIEKDAAIVVGSV VGTKTGIGAYVAT
ID NO 9: YCPNNYVAKD GEKLNCSVGNCPDVEAAGSTVKLSFS DDTITDTAGFVAV
ID NO 10: YYEADYTAQV GDKLSCSKGNCPVEEATGATVSYDFS DSTITDTAGYIAV
ID NO 11: YCSNNID SK DSNLTCTANACPSVEEASTMELLEFDLTNDFGGTAGFLAA
ID NO 12: YCSNNID SD DSNVTCTADACPSVEEASTKMLLEFDLTNDFGGTAGFLAA
ID NO 13: YCDENLN ST GTKLTCSVGNCPDVEAASTQSLDEFNESSSYGNPAGYLAA
ID NO 14: YCGKNNDAPE GTNITCTGNACPEVEKADATFLYSFE DSGVGDVTGFLAL
ID NO 15: YQTTDAWPAS RTVPKD'TLISSFD HTLKGSSGYIAF

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

ID NO 1: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHSY GGATAVLSALDLYHHGHA
ID NO 2: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHSY GGATAVLSALDLYHHGHD
ID NO 3: GEVQNELVAT VLDQFKQYPS YKVAVTGHSY GGATALLCALDLYQREEGLS
ID NO 4: EQVVNDYFPV VQEQLTAHPT YKIVVTGHSY GGAQALLAGMDLYQREPRLS
ID NO 5: VSVQDQVESL VKQVVSQYPD YALTVTGHSY GASLAALTAQQL SATYD
ID NO 6: ISVQDQVESL VQQVVSQFPD YALTVTGHSY GASLAALTAQQL SATYD
ID NO 7: NEISSQATAA VASARKANPS FNVISTGHSY GGAVAVLAAANLRVGGT
ID NO 8: EEVAANVKAA VSAAKTANPT FKVVVTGHSY GGAVATIAAAYLRKDFG
ID NO 9: KVVDRRIKT LDELKPEHSD YKIVVVGHSY GAAIASLAAADLRKTY
ID NO 10: KLVRDDIIE LKEVVAQNPN YELVVVGHSL GAAVATLAATDLRGKGY
ID NO 11: ESAADELTSK IKSAMSTYSY YTYLFTGHSY GGALATLGATVLRNDGY
ID NO 12: EAAADNLTSK IKSAMSTYSY YTYLFTGHSY GGALATLGATVLRNDGY
ID NO 13: SEIADTITSK VESALSDHSD YSLVLTGHSY GAALAAALATALRNSGH

```

Figura 1 (cont.)

ID NO 14: RSVADTLRQK VEDAVREHPD YRVVFTGHSL GGALATVAGADLRNGY
 ID NO 15: LVSMQOVQEA VDSLAKCPD 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 YVEST GIPFQRTVHKRDIVPHV
 ID NO 5: NIRLYTFG EPRSGNQAFSA SYMNDAFQASSPDTTQYFRVTHANDGIPNL
 ID NO 6: NIRLYTFG EPRS NQAFSA SYMNDAFQASSPDTTQYFRVTHANDGIPNL
 ID NO 7: PVDIYTYG SPRVGNQALS AFVSNQ AGGEYRVTHADDPVPRL
 ID NO 8: PFDLYTYG SPRVGNDFFA NFVTQQ TGAEYRVTHGDDPVPRL
 ID NO 9: DAILYAYA APRVANKPLA EFITNQ GNNYRFTHNDPVPKL
 ID NO 10: SAKLYAYA SPRVGNAAALA KYITAQ GNNFRFTHTNDPVPKL
 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 EFLTVO TGGTLYRITHTNDIVPRL
 ID NO 15: KMQMFTYG QPRTGNQAFSA EYVENL GHPVFRVVYRHDIVPRM

ID NO 1: PPGAFGLHA GEEFWIMK DSSLRVCNGIETDNCNSIV
 ID NO 2: PPGAFGLHA GEEFWIMK DSSLRVCNGIETDNCNSIV
 ID NO 3: PPAAFGLHA GEEYWITD NSPETVQVCTSDLETSDCNSIV
 ID NO 4: PPQSFGLHP GVESWIKS GTSNVQICTSEIETKDCNSIV
 ID NO 5: PPVEQGYAHG GVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCE AQGGQG
 ID NO 6: PPADEGYAHG VVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCE AQGGQG
 ID NO 7: PPLIFGYRHT TPEFWLSGGGGDKVDYITISDVKVCCEGANLG CNGGTL
 ID NO 8: PPIVFGYRHT SPEYWLNG GPLDKDYTVTEIKVCEGIANVM CNGGTI
 ID NO 9: PLLTMGYVHI SPEYYITA PDNTTVDNQVTVLDGYVNFK GNTGTG
 ID NO 10: PLLSMGYVHV SPEYWITS PNNATVSTSDIKVIDGDVSFD GNTGTG
 ID NO 11: PPMDFGFSQP SPEYWITS GNGASVTASDIEVIEGINSTA GNAGEA
 ID NO 12: PPMDFGFSQP SPEYWITS GTGASVTASDIEVIEGINSTA GNAGEA
 ID NO 13: PPTLLGYHHF SPEYIIS ADEATVTTDDVTEVTGIDATG GNDGTD
 ID NO 14: PPREFGYSHS SPEYWIKS GTLVPVTRNDIVKIEGIDATG GNNQPN
 ID NO 15: PPMDLGFQHH GQEVWYEG DENIKFCKGEGENLTCELGVP

ID NO 1: PFT SVIDHLSYLDNMNTGL CL
 ID NO 2: PFT SVIDHLSYLDNMNTGL 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: GGLPDLFAPHSHVWYFIHADACKGGLPLR
 ID NO 10: LPLLLTDFEAHIWYF VQVDA GKGPGLPFR 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 DIPHLWYF GLIGT CL
 ID NO 15: FSEL NAKDHSEYP GMH

ID NO:	Microorganismo	SEQ ID NO.:
1.	<i>Absidia reflexa</i>	3
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>Penicillium camembertii</i>	12

Figura 1 (cont.)

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.

Figura 1 (cont.)