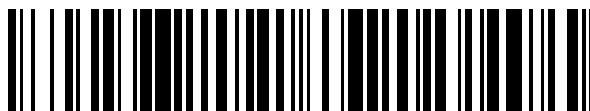


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 332**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/20** (2006.01)

**C12N 9/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.01.2007 E 10180288 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2371948**

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:

**08.08.2017**

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (50.0%)**

**Krogshøjvej 36**

**2880 Bagsvaerd, DK y**

**NOVOZYMES INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**VIND, JESPER;**

**KNÖTZEL, JÜRGEN CARSTEN FRANZ;**

**BORCH, KIM;**

**SVENDSEN, ALLAN;**

**CALLISEN, THOMAS HONGER;**

**YAYER, DEBBIE;**

**BJOERNVAD, MADSKESKELUND;**

**HANSEN, PETER KAMP;**

**GE, HAIYAN y**

**LAMSA, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 629 332 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 (US6939702B1) 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 un aspecto, la presente invención se refiere a una variante de una lipasa progenitora, en la que la variante tiene actividad de lipasa, es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 y comprende las sustituciones S58N+V60S+I86V+A150G+L227G+T231R+N233R+P256K (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).

[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.

## 40 BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

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

## 45 LISTADOS DE SECUENCIAS

[0009]

50 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*.  
 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*.  
 55 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*.  
 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*.  
 60 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*.  
 SEQ ID NO: 15 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus oryzae*.  
 65 SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Landerina penisapora*.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

## Lipasas progenitoras

5 [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.

10 [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*.

15 [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.

20 [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 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*.

25 [0014] En otro aspecto preferido, la lipasa progenitora es una lipasa de *Thermomyces*.

30 [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

35 [0016] Las variantes de lipasa de la presente invención divulgación comprenden, en comparación con la lipasa progenitora, al menos tres sustituciones seleccionadas del grupo consistente en:

- 40 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  
 45 d) al menos una sustitución en la región IV,

y donde la variante tiene actividad de lipasa.

50 [0017] En consecuencia, la invención proporciona una variante de una lipasa progenitora, en la que la variante tiene actividad de lipasa, es al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 2 y comprende las sustituciones S58N+V60S+I86V+A150G+L227G+T231 R+N233R+P256K (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).

55 [0018] 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.

60 [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: *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, Tolypocladium, o Trichoderma.*

5 [0020] 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*.

15 [0021] 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 además 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*.

35 [0022] En otra forma de realización preferida, la variante es una variante de una lipasa de *Thermomyces*.

[0023] En una forma de realización más preferida, 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.

40 Identificación de regiones y sustituciones

45 [0024] 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

50 [0025] 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 puede comprender al menos dos sustituciones en la Región I, tal como tres, cuatro, cinco o seis sustituciones en la Región I e incluir L227G T231R y N233R.

55 [0026] 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.

[0027] En particular se han identificado las siguientes sustituciones adicionales: X1N/\* X4V.

60 [0028] 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

[0029] 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.

65 Sustituciones en la Región II

[0030] 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.

5

[0031] 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 incluir P256K.

10

[0032] 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.

15

[0033] En particular, se han identificado las siguientes sustituciones adicionales: X202G, X210K/W/A, y X255Y/V/A y X259G/M/Q/V.

20

[0034] 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.

[0035] 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

25

[0036] 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.

30

[0037] 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 e incluir I86V.

35

[0038] 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.

[0039] En particular, se han identificado las siguientes sustituciones adicionales: X83T y X90A/R.

40

[0040] 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.

[0041] 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

45

[0042] 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.

[0043] 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 e incluir S58N y V60S.

50

[0044] 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.

[0045] En particular, se han identificado las siguientes sustituciones adicionales: X27R.

55

[0046] 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.

[0047] 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.

60

#### Aminoácidos en otras posiciones

65

[0048] 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 en X38R, X81Q/E, X143S/C/N/D/A, X147M/Y, X150G/K, X227G y X249R/I/L.

5 [0049] 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.

10 [0050] 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.

Variantes de lipasa

15 [0051] 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
L227G + T231 R + N233R	P256K	I86V	S58N + V60S	A150G
L227G + T231R + N233R	P256K	I86V	S58N + V60S	A150G

Nomenclatura para modificaciones de aminoácidos

20 [0052] 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)

25 [0053] 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.

30 [0054] 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.

35 [0055] 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.

40 [0056] X231 indica el aminoácido en un polipéptido progenitor que corresponde con la posición 231, cuando se aplica el procedimiento de alineamiento descrito. X231R 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.

45 [0057] En cualquier caso, se emplea la abreviatura de aminoácidos de una letra o de tres letras aceptada por la IUPAC.

Agrupamiento de los aminoácidos

50 [0058] 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.

[0059] 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).

Identidad de los aminoácidos

[0060] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad".

[0061] 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.

[0062] 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.

[0063] 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).

[0064] 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

[0065] 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.

[0066] 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 tubigenensis*, *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.

[0067] 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

[0068] 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.

5 [0069] 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.

10 [0070] 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).

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

20 [0071] 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.

25 [0072] 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

Actividad de lipasa en tributirina a pH neutro (LU)

30 [0073] Se prepara un sustrato para lipasa emulsionando tributirina (tributirato de glicerina) utilizando goma arábiga 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.

35 Riesgo Beneficio

[0074] El factor de ries-beneficio que describe el rendimiento en comparación con el riesgo reducido de olor se define como:  $BR = RP_{medio} / R$ , como se describe a continuación.

40 Usos

[0075] Las enzimas de la presente invención pueden tener un uso industrial, por ejemplo incluirse en composiciones detergentes para eliminar materia grasa.

45 [0076] Elementos descritos en la solicitud.

50 Elemento 1. Una variante de una lipasa progenitora, donde la variante 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;

55 y donde la variante tiene actividad de lipasa.

60 Elemento 2. Una variante de lipasa según el elemento 1, donde al menos dos sustituciones en la Región I de la lipasa progenitora comprenden sustituciones de los aminoácidos en las posiciones que corresponden con las posiciones 231 y 233 (usando la SEQ ID NO:2 para la numeración).

65 Elemento 3. Una variante de lipasa según el elemento 2, donde al menos dos sustituciones en la Región I de la lipasa progenitora comprende sustituciones de un R de los aminoácidos en las posiciones que corresponden con las posiciones 231 y 233 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).

Elemento 4. Una variante de lipasa según el elemento 1, donde la lipasa variante es al menos 80 %, 85 %, 90



## ES 2 629 332 T3

%, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.

5 Elemento 5. Una variante de lipasa según el elemento 1, donde la lipasa progenitora es la lipasa con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

Elemento 6. Una variante de lipasa según el elemento 2, donde la lipasa comprende otra sustitución en la posición que corresponde con la posición 4 y/o posición 227 de la SEQ ID NO: 2.

10 Elemento 7. Una variante de lipasa según el elemento 6, donde la lipasa tiene una sustitución que corresponde con X4V y X227G (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).

15 Elemento 8. Una variante de lipasa según el elemento 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, 255 y 256 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).

20 Elemento 9. Una variante de lipasa según el elemento 8, donde al menos una sustitución en la lipasa progenitora se selecciona del grupo consistente en X202G, X210K, X211 L, X255Y/V y X256K (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).

Elemento 10. Una variante de lipasa según el elemento 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).

25 Elemento 11. Una variante de lipasa según el elemento 10, 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).

30 Elemento 12. Una variante de lipasa según el elemento 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).

35 Elemento 13. Una variante de lipasa según el elemento 1, 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).

40 Elemento 14. Una variante de lipasa según el elemento 1, donde la variante de lipasa comprende además al menos una sustitución en la lipasa progenitora que se selecciona 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).

45 Elemento 15. Una variante de lipasa según el elemento 1, donde la variante de lipasa comprende además al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en X81Q/E, X147M/Y, X150G y X249R/I/L (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).

Elemento 16. Una variante de lipasa del elemento 1, donde la lipasa comprende una sustitución seleccionada del grupo siguiente de sustituciones:

- 50 a) T231R + N233R + I255Y  
b) I202G + T231R + N233R  
c) I86V + L227G + T231R + N233R + P256K  
d) Q4V + S58N + V60S + T231R + N233R  
e) S58N + V60S + I90R + T231R + N233R  
f) I90A + T231R + N233R + I255V  
55 g) S58N + V60S + I86V + A150G + L227G + T231R + N233R + P256K  
h) S58N + V60S + L147M + F211 L + T231 R + N233R  
i) Q4V + S58A + V60S + S83T + I86V + A150G + E210K + L227G + T231R + N233R + P256K  
j) S58N + V60S + I86V + A150G + L227G + T231R + N233R + P256K

60 Elemento 17. Una secuencia de ADN que codifica la variante de lipasa de los elementos 1-16.

Elemento 18. Un vector de expresión que alberga la secuencia de ADN del elemento 17.

Elemento 19. Una célula huésped transformada con la secuencia de ADN del elemento 17.

65 Elemento 20. Un método para producir una variante de lipasa, método que comprende el cultivo de la célula

huésped transformada del elemento 19 bajo condiciones propicias para la producción de la variante de lipasa y la recuperación de la variante de lipasa del caldo resultante.

5 Elemento 21. Una variante de SEQ ID NO: 2 que comprende al menos una de las mutaciones Q4V, S58N/A/G/P/T, I90R o Q249I/L.

**EJEMPLOS**

10 [0077] Los productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos grado reactivo.

Medios y soluciones

15 [0078]

Producto	Nombre comercial
LAS:	Surfac PS
Zeolite A	Wessalith P

Otros ingredientes usados son reactivos estándar de laboratorio.

20 Materiales

Proveedor del producto

25 [0079] EMPA221 EMPA St. Gallen, Lerchfeldstrasse 5, CH-9014 St. Gallen, Switzerland

**Ejemplo 1**

Producción de la enzima

30 [0080] 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.

35 [0081] 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.

40 [0082] 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.

45 [0083] 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**

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

55 [0084] 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 lleva a cabo bajo las condiciones experimentales especificadas a continuación:

5

**Tabla 3**

Solución de prueba	0,5 g/l de LAS 0,52 g/l de Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 1,07 g/l de Zeolite A 0,52 g/l Citrato de Na <sub>3</sub>
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 <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 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 (EM-PA221 usado como textil de algodón)

10

[0086] Se prepararon muestras de cúrcuma-nata mezclando 5 g de cúrcuma (Santa Maria, Dinamarca) con 100 g de nata (38 % de 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. 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.

15

[0087] 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.

20

[0088] 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.

25

[0089] 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:

30

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

[0090] El rendimiento de lavado (P) de las variantes se calcula de acuerdo con la fórmula siguiente:

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

35

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.

40

Una puntuación de rendimiento relativo se da como el resultado del lavado AMSA conforme a la definición:  
Las puntuaciones de rendimiento relativo (RP) recogen los rendimientos (P) de las variantes de enzima de prueba respecto a la enzima de referencia:

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

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)

5 RPmedio = medio(RP(0,125), RP(0,25) RP(0,5), RP(1,0))

[0091] Se considera que una variante muestra un rendimiento del lavado mejorado si tiene un rendimiento mejor que la referencia.

10 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 3

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

[0092] 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.

[0093] 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 T231R + 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:

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

$$R = \frac{\text{Alfa}_{\text{enzima de prueba}} = \text{Olor}_{\text{enzima de prueba}} - \text{Blanco}}{\text{Alfa}_{\text{enzima de referencia}} = \text{Olor}_{\text{enzima de referencia}} - \text{Blanco}} / \frac{\text{Alfa}_{\text{enzima de prueba}}}{\text{Alfa}_{\text{enzima de referencia}}}$$

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

### Ejemplo 4

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

[0094] La actividad de una lipasa respecto a la absorbancia a 280 nm se determina mediante el ensayo siguiente:

50 LU/A280:

[0095] La actividad de la lipasa se determina como se ha descrito anteriormente en la sección Actividad de lipasa.

55 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

60 BR - Riesgo Beneficio

[0096] El factor de Riesgo-Beneficio que describe el rendimiento en comparación con el riesgo reducido de olor se define como:

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

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

5

[0097] Al aplicar los métodos anteriores, se obtuvieron los siguientes resultados:

**Tabla 4**

Variante	Mutaciones en la SEQ ID NO: 2	RP medio (RP <sub>medio</sub> )	BR	LU/A280
1	I202G + T231 R + N233R	0,84	1,41	no determinado
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
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 + 249R + 270H + 271T + 272P + 273S + 274S + 275G + 276R + 277G + 278G	0,13	no determinado	500

10

[0098] La lipasa de referencia y las variantes 7 y 8 de la Tabla 4 se describen en WO 2000/060063.

**Ejemplo 6**

15

BR - Riesgo Beneficio

[0099] 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.

20

**Tabla 5**

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

ES 2 629 332 T3

22	Q4L+ E43T+ K46I+ S58N+ V60S+ T231 R+ N233R+ Q249L+ D254I
23	Q4L+ S58N+ V60S+ T231 R+ N233R+ Q249L+ D254I
24	K46I+ S58N+ V60S+ T231 R+ 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+ T231 R+ N233R
32	S58N+ V60V+ D62G+ T231 R+ N233R
33	Q4V+ S58N+ V60S+ I86V+ T231 R+ 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+ T231 R+ N233R+ P256K
39	D27R+ S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231 R+ 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
43	D27R+ V60K+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
44	Q4N+ L6S+ S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231 R+ N233R+ P256K
45	E1N+ V60K+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
46	V60K+ I86V+ A150G+ K223N+ G225S+ T231 R+ 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+ T231 R+ N233R+ I255V
53	T231 R+ 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

ES 2 629 332 T3

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	T231 R+ 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+ T231 R+ N233R+ I255A+ P256K
76	Q4V+ D27N+ V60K+ T231 R+ N233R
77	I90F+ I202P+ T231R+ N233R+ I255L
78	S58N+ V60S+ D158N+ T231R+ N233R
79	S58N+ V60S+ S115K+ T231R+ N233R
80	S58N+ V60S+ L147M+ A150G+ F211L+ T231 R+ 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

[0100] La lipasa de referencia se describe en WO 2000/060063.

LISTADO DE SECUENCIAS

5

[0101]

10

<110> Novozymes A/S  
 Novozymes North America, Inc.  
 Vind, Jesper  
 Knotzel, Jurgen Carsten Franz  
 Borch, Kim

ES 2 629 332 T3

Svendsen, Allan  
 Callisen, Thomas Honger  
 Yaver, Debbie  
 Bjornvad, Mads Eskelund  
 Hansen, Peter Kamp  
 Ge, Haiyan  
 Lamsa, Michael

5  
 10  
 15  
 20  
 25  
 30  
 35  
 40  
 45  
 50  
 55  
 60  
 65

<120> Variantes de lipasa  
 <130> 10928-EP-ETD  
 <160> 18  
 <170> PatentIn version 3.3  
 <210> 1  
 <211> 807  
 <212> DNA  
 <213> Thermomyces lanuginosus  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(807)  
 <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  
 1 5 10 15  
 tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat gat gcc cca gct ggt aca  
 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr  
 20 25 30  
 aac att acg tgc acg gga aat gcc tgc ccc gag gta gag aag gcg gat  
 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp  
 35 40 45  
 gca acg ttt ctc tac tcg ttt gaa gac tct gga gtg ggc gat gtc acc  
 Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr  
 50 55 60  
 ggc ttc ctt gct ctc gac aac acg aac aaa ttg atc gtc ctc tct ttc  
 Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe  
 65 70 75 80  
 cgt ggc tct cgt tcc ata gag aac tgg atc ggg aat ctt aac ttc gac  
 Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp  
 85 90 95  
 ttg aaa gaa ata aat gac att tgc tcc ggc tgc agg gga cat gac ggc  
 Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly  
 100 105 110  
 ttc act tcg tcc tgg agg tct gta gcc gat acg tta agg cag aag gtg  
 Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val  
 115 120 125



ES 2 629 332 T3

432 gag gat gct gtg agg gag cat ccc gac tat cgc gtg gtg ttt acc gga  
 Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly  
 130 135 140  
 5  
 480 cat agc ttg ggt ggt gca ttg gca act gtt gcc gga gca gac ctg cgt  
 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg  
 145 150 155 160  
 10  
 528 gga aat ggg tat gat atc gac gtg ttt tca tat ggc gcc ccc cga gtc  
 Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val  
 165 170 175  
 15  
 576 gga aac agg gct ttt gca gaa ttc ctg acc gta cag acc ggc gga aca  
 Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr  
 180 185 190  
 20  
 624 ctc tac cgc att acc cac acc aat gat att gtc cct aga ctc ccg ccg  
 Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro  
 195 200 205  
 25  
 672 cgc gaa ttc ggt tac agc cat tct agc cca gag tac tgg atc aaa tct  
 Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser  
 210 215 220  
 30  
 720 gga acc ctt gtc ccc gtc acc cga aac gat atc gtg aag ata gaa ggc  
 Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly  
 225 230 235 240  
 35  
 768 atc gat gcc acc ggc ggc aat aac cag cct aac att ccg gat atc cct  
 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro  
 245 250 255  
 40  
 807 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  
 260 265  
 45  
 <210> 2  
 <211> 269  
 <212> PRT  
 50 <213> Thermomyces lanuginosus  
 <400> 2  
 55 Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr  
 1 5 10 15  
 60 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr  
 20 25 30  
 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp  
 35 40 45  
 65 Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr  
 50 55 60

ES 2 629 332 T3

Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe  
 65 70 75 80  
 5  
 Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp  
 85 90 95  
 10  
 Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly  
 100 105 110  
 15  
 Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val  
 115 120 125  
 20  
 Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly  
 130 135 140  
 25  
 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg  
 145 150 155 160  
 30  
 Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr  
 180 185 190  
 35  
 Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro  
 195 200 205  
 40  
 Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser  
 210 215 220  
 45  
 Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly  
 225 230 235 240  
 50  
 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro  
 245 250 255  
 55  
 Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu  
 260 265  
 <210> 3  
 <211> 265  
 <212> PRT  
 <213> Absidia reflexa  
 <400> 3  
 60  
 Ser Ser Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile  
 1 5 10 15  
 65  
 Lys Ala His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg  
 20 25 30

ES 2 629 332 T3

Thr Val Ile Pro Gly Gly Arg Trp Ser Cys Pro His Cys Gly Val Ala  
 35 40 45  
 5 Ser Asn Leu Gln Ile Thr Lys Thr Phe Ser Thr Leu Ile Thr Asp Thr  
 50 55 60  
 10 Asn Val Leu Val Ala Val Gly Glu Lys Glu Lys Thr Ile Tyr Val Val  
 65 70 75 80  
 15 Phe Arg Gly Thr Ser Ser Ile Arg Asn Ala Ile Ala Asp Ile Val Phe  
 85 90 95  
 20 Val Pro Val Asn Tyr Pro Pro Val Asn Gly Ala Lys Val His Lys Gly  
 100 105 110  
 25 Phe Leu Asp Ser Tyr Asn Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val  
 115 120 125  
 30 Lys Ala Gln Leu Asp Arg His Pro Gly Tyr Lys Ile Val Val Thr Gly  
 130 135 140  
 35 His Ser Leu Gly Gly Ala Thr Ala Val Leu Ser Ala Leu Asp Leu Tyr  
 145 150 155 160  
 40 His His Gly His Ala Asn Ile Glu Ile Tyr Thr Gln Gly Gln Pro Arg  
 165 170 175  
 45 Ile Gly Thr Pro Ala Phe Ala Asn Tyr Val Ile Gly Thr Lys Ile Pro  
 180 185 190  
 50 Tyr Gln Arg Leu Val His Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu Pro Pro  
 195 200 205  
 55 Gly Ala Phe Gly Phe Leu His Ala Gly Glu Glu Phe Trp Ile Met Lys  
 210 215 220  
 60 Asp Ser Ser Leu Arg Val Cys Pro Asn Gly Ile Glu Thr Asp Asn Cys  
 225 230 235 240  
 65 Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr  
 245 250 255  
 Leu Asp Met Asn Thr Gly Leu Cys Leu  
 260 265  
 <210> 4  
 <211> 264  
 <212> PRT  
 <213> Absidia corymbifera  
 <400> 4  
 Ser Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile Lys

ES 2 629 332 T3

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

<210> 5

ES 2 629 332 T3

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

5 <400> 5  
 Ser Ile Asp Gly Gly Ile Arg Ala Ala Thr Ser Gln Glu Ile Asn Glu  
 1 5 10 15  
 10 Leu Thr Tyr Tyr Thr Thr Leu Ser Ala Asn Ser Tyr Cys Arg Thr Val  
 20 25 30  
 15 Ile Pro Gly Ala Thr Trp Asp Cys Ile His Cys Asp Ala Thr Glu Asp  
 35 40 45  
 20 Leu Lys Ile Ile Lys Thr Trp Ser Thr Leu Ile Tyr Asp Thr Asn Ala  
 50 55 60  
 25 Met Val Ala Arg Gly Asp Ser Glu Lys Thr Ile Tyr Ile Val Phe Arg  
 65 70 75 80  
 30 Gly Ser Ser Ser Ile Arg Asn Trp Ile Ala Asp Leu Thr Phe Val Pro  
 85 90 95  
 35 Val Ser Tyr Pro Pro Val Ser Gly Thr Lys Val His Lys Gly Phe Leu  
 100 105 110  
 40 Asp Ser Tyr Gly Glu Val Gln Asn Glu Leu Val Ala Thr Val Leu Asp  
 115 120 125  
 45 Gln Phe Lys Gln Tyr Pro Ser Tyr Lys Val Ala Val Thr Gly His Ser  
 130 135 140  
 50 Leu Gly Gly Ala Thr Ala Leu Leu Cys Ala Leu Asp Leu Tyr Gln Arg  
 145 150 155 160  
 55 Glu Glu Gly Leu Ser Ser Ser Asn Leu Phe Leu Tyr Thr Gln Gly Gln  
 165 170 175  
 60 Pro Arg Val Gly Asp Pro Ala Phe Ala Asn Tyr Val Val Ser Thr Gly  
 180 185 190  
 65 Ile Pro Tyr Arg Arg Thr Val Asn Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu  
 195 200 205  
 70 Pro Pro Ala Ala Phe Gly Phe Leu His Ala Gly Glu Glu Tyr Trp Ile  
 210 215 220  
 75 Thr Asp Asn Ser Pro Glu Thr Val Gln Val Cys Thr Ser Asp Leu Glu  
 225 230 235 240  
 80 Thr Ser Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Leu Asp  
 245 250 255



ES 2 629 332 T3

Ser Trp Ile Lys Ser Gly Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr Ser Glu  
 225 230 235 240  
 5  
 Ile Glu Thr Lys Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Ile  
 245 250 255  
 10  
 Leu Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu  
 260 265 270  
 15  
 <210> 7  
 <211> 267  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus niger  
 20  
 <400> 7  
 Thr Ala Gly His Ala Leu Ala Ala Ser Thr Gln Gly Ile Ser Glu Asp  
 1 5 10 15  
 25  
 Leu Tyr Ser Arg Leu Val Glu Met Ala Thr Ile Ser Gln Ala Ala Tyr  
 20 25 30  
 30  
 Ala Asp Leu Cys Asn Ile Pro Ser Thr Ile Ile Lys Gly Glu Lys Ile  
 35 40 45  
 Tyr Asn Ser Gln Thr Asp Ile Asn Gly Trp Ile Leu Arg Asp Asp Ser  
 50 55 60  
 35  
 Ser Lys Glu Ile Ile Thr Val Phe Arg Gly Thr Gly Ser Asp Thr Asn  
 65 70 75 80  
 40  
 Leu Gln Leu Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Pro Phe Asp Thr Leu Pro  
 85 90 95  
 45  
 Gln Cys Asn Gly Cys Glu Val His Gly Gly Tyr Tyr Ile Gly Trp Val  
 100 105 110  
 50  
 Ser Val Gln Asp Gln Val Glu Ser Leu Val Lys Gln Gln Val Ser Gln  
 115 120 125  
 55  
 Tyr Pro Asp Tyr Ala Leu Thr Val Thr Gly His Ser Leu Gly Ala Ser  
 130 135 140  
 60  
 Leu Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gln Leu Ser Ala Thr Tyr Asp Asn Ile  
 145 150 155 160  
 65  
 Arg Leu Tyr Thr Phe Gly Glu Pro Arg Ser Gly Asn Gln Ala Phe Ala  
 165 170 175  
 70  
 Ser Tyr Met Asn Asp Ala Phe Gln Ala Ser Ser Pro Asp Thr Thr Gln  
 180 185 190

ES 2 629 332 T3

Tyr Phe Arg Val Thr His Ala Asn Asp Gly Ile Pro Asn Leu Pro Pro  
 195 200 205  
 5 Val Glu Gln Gly Tyr Ala His Gly Gly Val Glu Tyr Trp Ser Val Asp  
 210 215 220  
 10 Pro Tyr Ser Ala Gln Asn Thr Phe Val Cys Thr Gly Asp Glu Val Gln  
 225 230 235 240  
 15 Cys Cys Glu Ala Gln Gly Gly Gln Gly Val Asn Asn Ala His Thr Thr  
 245 250 255  
 20 Tyr Phe Gly Met Thr Ser Gly Ala Cys Thr Trp  
 260 265  
 25 <210> 8  
 <211> 266  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus tubingensis  
 <400> 8  
 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 Ser Cys Glu Val His Gly Gly Tyr Tyr Ile Gly Trp Ile  
 100 105 110  
 65 Ser Val Gln Asp Gln Val Glu Ser Leu Val Gln Gln Gln Val Ser Gln  
 115 120 125  
 70 Phe Pro Asp Tyr Ala Leu Thr Val Thr Gly His Ser Leu Gly Ala Ser  
 130 135 140  
 75 Leu Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gln Leu Ser Ala Thr Tyr Asp Asn Ile  
 145 150 155 160  
 80 Arg Leu Tyr Thr Phe Gly Glu Pro Arg Ser Asn Gln Ala Phe Ala Ser



ES 2 629 332 T3

				165					170					175			
5	Tyr	Met	Asn	Asp 180	Ala	Phe	Gln	Ala	Ser 185	Ser	Pro	Asp	Thr	Thr 190	Gln	Tyr	
10	Phe	Arg	Val 195	Thr	His	Ala	Asn	Asp 200	Gly	Ile	Pro	Asn	Leu 205	Pro	Pro	Ala	
15	Asp	Glu 210	Gly	Tyr	Ala	His	Gly 215	Val	Val	Glu	Tyr	Trp 220	Ser	Val	Asp	Pro	
20	Tyr 225	Ser	Ala	Gln	Asn	Thr 230	Phe	Val	Cys	Thr	Gly 235	Asp	Glu	Val	Gln	Cys 240	
25	Cys	Glu	Ala	Gln	Gly 245	Gly	Gln	Gly	Val	Asn 250	Asn	Ala	His	Thr	Thr 255	Tyr	
30	Phe	Gly	Met	Thr 260	Ser	Gly	His	Cys	Thr 265	Trp							
	<210>	9															
	<211>	276															
	<212>	PRT															
	<213>	Fusarium oxysporum															
	<400>	9															
35	Ala 1	Val	Gly	Val	Thr 5	Thr	Thr	Asp	Phe	Ser 10	Asn	Phe	Lys	Phe	Tyr 15	Ile	
40	Gln	His	Gly	Ala 20	Ala	Ala	Tyr	Cys	Asn 25	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala 30	Gly	Ser	
45	Lys	Ile	Thr 35	Cys	Ser	Asn	Asn	Gly 40	Cys	Pro	Thr	Val	Gln 45	Gly	Asn	Gly	
50	Ala	Thr 50	Ile	Val	Thr	Ser	Phe 55	Val	Gly	Ser	Lys	Thr 60	Gly	Ile	Gly	Gly	
55	Tyr 65	Val	Ala	Thr	Asp	Ser 70	Ala	Arg	Lys	Glu	Ile 75	Val	Val	Ser	Phe	Arg 80	
60	Gly	Ser	Ile	Asn	Ile 85	Arg	Asn	Trp	Leu	Thr 90	Asn	Leu	Asp	Phe	Gly 95	Gln	
65	Glu	Asp	Cys	Ser 100	Leu	Val	Ser	Gly	Cys 105	Gly	Val	His	Ser	Gly 110	Phe	Gln	
	Arg	Ala	Trp 115	Asn	Glu	Ile	Ser	Ser 120	Gln	Ala	Thr	Ala	Ala 125	Val	Ala	Ser	
	Ala	Arg 130	Lys	Ala	Asn	Pro	Ser	Phe 135	Asn	Val	Ile	Ser	Thr 140	Gly	His	Ser	

ES 2 629 332 T3

5 Leu Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly  
145 150 155 160

10 Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn  
165 170 175

15 Ala Gln Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Tyr Arg  
180 185 190

20 Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe  
195 200 205

25 Gly Tyr Arg His Thr Thr Pro Glu Phe Trp Leu Ser Gly Gly Gly Gly  
210 215 220

30 Asp Lys Val Asp Tyr Thr Ile Ser Asp Val Lys Val Cys Glu Gly Ala  
225 230 235 240

35 Ala Asn Leu Gly Cys Asn Gly Gly Thr Leu Gly Leu Asp Ile Ala Ala  
245 250 255

40 His Leu His Tyr Phe Gln Ala Thr Asp Ala Cys Asn Ala Gly Gly Phe  
260 265 270

45 Ser Trp Arg Arg  
275

50 <210> 10  
<211> 273  
<212> PRT  
<213> Fusarium heterosporum

55 <400> 10

60 Thr Val Thr Thr Gln Asp Leu Ser Asn Phe Arg Phe Tyr Leu Gln His  
1 5 10 15

65 Ala Asp Ala Ala Tyr Cys Asn Phe Asn Thr Ala Val Gly Lys Pro Val  
20 25 30

70 His Cys Ser Ala Gly Asn Cys Pro Asp Ile Glu Lys Asp Ala Ala Ile  
35 40 45

75 Val Val Gly Ser Val Val Gly Thr Lys Thr Gly Ile Gly Ala Tyr Val  
50 55 60

80 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 2 629 332 T3

Cys Asp Leu Val Ala Gly Cys Gly Val His Thr Gly Phe Leu Asp Ala  
 100 105 110  
 5  
 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  
 30  
 His Gly Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Ile Val Phe Gly Tyr  
 195 200 205  
 35  
 Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Asn Gly Gly Pro Leu Asp Lys  
 210 215 220  
 40  
 Asp Tyr Thr Val Thr Glu Ile Lys Val Cys Glu Gly Ile Ala Asn Val  
 225 230 235 240  
 45  
 Met Cys Asn Gly Gly Thr Ile Gly Leu Asp Ile Leu Ala His Ile Thr  
 245 250 255  
 50  
 Tyr Phe Gln Ser Met Ala Thr Cys Ala Pro Ile Ala Ile Pro Trp Lys  
 260 265 270  
 55  
 Arg  
 <210> 11  
 <211> 278  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus oryzae  
 <400> 11  
 Asp Ile Pro Thr Thr Gln Leu Glu Asp Phe Lys Phe Trp Val Gln Tyr  
 1 5 10 15  
 60  
 Ala Ala Ala Thr Tyr Cys Pro Asn Asn Tyr Val Ala Lys Asp Gly Glu  
 20 25 30  
 65  
 Lys Leu Asn Cys Ser Val Gly Asn Cys Pro Asp Val Glu Ala Ala Gly  
 35 40 45

ES 2 629 332 T3

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

ES 2 629 332 T3

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

ES 2 629 332 T3

275

5 <210> 13  
 <211> 270  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus foetidus

10 <400> 13

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



ES 2 629 332 T3

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

5  
 Gly Thr Gly Ala Ser Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Leu Ile Glu Gly  
 225 230 235 240

10  
 Ile Asn Ser Thr Ala Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Asp Val Leu  
 245 250 255

15  
 Ala His Leu Trp Tyr Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu  
 260 265 270

20  
 <210> 15  
 <211> 269  
 <212> PRT  
 <213> Aspergillus oryzae  
 <400> 15

25  
 Asp Val Ser Ser Ser Leu Leu Asn Asn Leu Asp Leu Phe Ala Gln Tyr  
 1 5 10 15

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

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

40  
 Gln Ser Leu Asp Glu Phe Asn Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Pro Ala  
 50 55 60

45  
 Gly Tyr Leu Ala Ala Asp Glu Thr Asn Lys Leu Leu Val Leu Ser Phe  
 65 70 75 80

50  
 Arg Gly Ser Ala Asp Leu Ala Asn Trp Val Ala Asn Leu Asn Phe Gly  
 85 90 95

55  
 Leu Glu Asp Ala Ser Asp Leu Cys Ser Gly Cys Glu Val His Ser Gly  
 100 105 110

60  
 Phe Trp Lys Ala Trp Ser Glu Ile Ala Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val  
 115 120 125

65  
 Glu Ser Ala Leu Ser Asp His Ser Asp Tyr Ser Leu Val Leu Thr Gly  
 130 135 140

70  
 His Ser Tyr Gly Ala Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Ala Leu Arg  
 145 150 155 160

75  
 Asn Ser Gly His Ser Val Glu Leu Tyr Asn Tyr Gly Gln Pro Arg Leu  
 165 170 175



ES 2 629 332 T3

Gly Asn Glu Ala Leu Ala Thr Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Lys Gly Gly  
 180 185 190  
 5 Asn Tyr Arg Val Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Lys Leu Pro Pro  
 195 200 205  
 10 Thr Leu Leu Gly Tyr His His Phe Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Ser Ser  
 210 215 220  
 15 Ala Asp Glu Ala Thr Val Thr Thr Thr Asp Val Thr Glu Val Thr Gly  
 225 230 235 240  
 20 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asp Gly Thr Asp Gly Thr Ser Ile Asp  
 245 250 255  
 25 Ala His Arg Trp Tyr Phe Ile Tyr Ile Ser Glu Cys Ser  
 260 265  
 <210> 16  
 <211> 251  
 <212> PRT  
 <213> Landerina penisapora  
 30 <400> 16  
 35 Pro Gln Asp Ala Tyr Thr Ala Ser His Ala Asp Leu Val Lys Tyr Ala  
 1 5 10 15  
 40 Thr Tyr Ala Gly Leu Ala Tyr Gln Thr Thr Asp Ala Trp Pro Ala Ser  
 20 25 30  
 45 Arg Thr Val Pro Lys Asp Thr Thr Leu Ile Ser Ser Phe Asp His Thr  
 35 40 45  
 50 Leu Lys Gly Ser Ser Gly Tyr Ile Ala Phe Asn Glu Pro Cys Lys Glu  
 50 55 60  
 55 Ile Ile Val Ala Tyr Arg Gly Thr Asp Ser Leu Ile Asp Trp Leu Thr  
 65 70 75 80  
 60 Asn Leu Asn Phe Asp Lys Thr Ala Trp Pro Ala Asn Ile Ser Asn Ser  
 85 90 95  
 65 Leu Val His Glu Gly Phe Leu Asn Ala Tyr Leu Val Ser Met Gln Gln  
 100 105 110  
 70 Val Gln Glu Ala Val Asp Ser Leu Leu Ala Lys Cys Pro Asp Ala Thr  
 115 120 125  
 75 Ile Ser Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Cys Ile Ser  
 130 135 140  
 80 Met Val Asp Thr Ala Gln Arg His Arg Gly Ile Lys Met Gln Met Phe

ES 2 629 332 T3

	145					150					155					160
5	Thr	Tyr	Gly	Gln	Pro	Arg	Thr	Gly	Asn	Gln	Ala	Phe	Ala	Glu	Tyr	Val
					165					170					175	
10	Glu	Asn	Leu	Gly	His	Pro	Val	Phe	Arg	Val	Val	Tyr	Arg	His	Asp	Ile
			180						185					190		
15	Val	Pro	Arg	Met	Pro	Pro	Met	Asp	Leu	Gly	Phe	Gln	His	His	Gly	Gln
			195					200					205			
20	Glu	Val	Trp	Tyr	Glu	Gly	Asp	Glu	Asn	Ile	Lys	Phe	Cys	Lys	Gly	Glu
	210						215					220				
25	Gly	Glu	Asn	Leu	Thr	Cys	Glu	Leu	Gly	Val	Pro	Phe	Ser	Glu	Leu	Asn
	225					230					235					240
30	Ala	Lys	Asp	His	Ser	Glu	Tyr	Pro	Gly	Met	His					
					245					250						
	<210>	17														
	<211>	12														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial sequence														
	<220>															
35	<223>	Sequence used in the alignment example														
	<400>	17														
40	Ala	Cys	Met	Ser	His	Thr	Trp	Gly	Glu	Arg	Asn	Leu				
	1				5					10						
45	<210>	18														
	<211>	14														
	<212>	PRT														
	<213>	Artificial sequence														
	<220>															
	<223>	Sequence used in the alignment example														
50	<400>	18														
55	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 variante tiene actividad de lipasa, es al menos 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, y comprende las sustituciones S58N +V60S +I86V +A150G +L227G +T231 R +N233R +P256K (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
2. 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.
- 10 3. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde la lipasa comprende otra sustitución en la posición que corresponde a la posición 4 de la SEQ ID NO: 2.
4. Variante de lipasa de la reivindicación 3, donde la sustitución es X4V.
- 15 5. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde la variante de lipasa comprende además sustituciones seleccionadas del grupo consistente en sustituciones en posiciones que corresponden con las posiciones 202, 210, 211, y 225 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 20 6. Variante de lipasa de la reivindicación 5, donde las sustituciones son X202G, X210K, X211 L, y X255Y/V.
7. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde la variante de lipasa comprende además una sustitución en una posición que corresponde con la posición 90 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 25 8. Variante de lipasa de la reivindicación 7, donde la sustitución es X90A/R.
9. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde la variante de lipasa comprende además una sustitución en una posición que corresponde con la posición 27 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 30 10. Variante de lipasa de la reivindicación 9, donde la sustitución es X27R.
11. 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, y 249 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 35 12. Variante de lipasa de la reivindicación 11, donde las mutaciones son X81Q/E, X147M/Y, y X249R/I/L.
13. Variante de lipasa de la reivindicación 1-2, donde la lipasa tiene las siguientes sustituciones:
- 40 (a) D27R +S58N +V60S +I86V +A150G +L227G +T231R +N233R +P256K;  
(b) Q4N +L6S +S58N +V60S +I86V +A150G +L227G +T231R +N233R +P256K;  
(c) S58N +V60S +I86V +A150G +E210K +L227G +T231R +N233R +Q249R +P256K;  
(d) S58N +V60S +I86V +A150G +E210K +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K; o  
(e) S58N +V60S +I86V +A150G +G156R +E210K +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K
- 45 14. Secuencia de ADN que codifica la variante de lipasa de las reivindicaciones 1-13.
15. Vector de expresión que alberga la secuencia de ADN de la reivindicación 14.
- 50 16. Célula huésped transformada que contiene la secuencia de ADN de la reivindicación 14.
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 2 629 332 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: TVTTQDLSNFRFYLQHADAA  
 ID NO 9: DIPTTQLEDFKFWVQYAAAT  
 ID NO 10: DVSTSELDQFEFWVQYAAAS  
 ID NO 11: SVSTSTLDELQLFAQWSAAA  
 ID NO 12: SVSTSTLDELQLFSQWSAAA  
 ID NO 13: DVSSLLNLDLFAQYSAAA  
 ID NO 14: EVSQDLFNQFNLFAQYSAAA  
 ID NO 15: PQDAYTASHADLVKYATYAGLA

ID NO 1: YCRTVIPG GRWSCPFCGVAS NLQITKTFST LITDTNVLVAV  
 ID NO 2: YCRTVIPG GQWSCPFCDVAP 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 GKPVHCSAGNCPDIEKDAIIVGVS VGTKTGIGAYVAT  
 ID NO 9: YCPNNYVAKD GEKLNCSVGNCPDVEAAGSTVKLSFS DDTITDTAGFVAV  
 ID NO 10: YYEADYTAQV GDKLSCSKGNCPVEEATGATVSYDFS DSTITDTAGYIAV  
 ID NO 11: YCSNNID SK DSNLTCTANACPSVEEASTMMLLEFDLTNDFGGTAGFLAA  
 ID NO 12: YCSNNID SD DSNVTCTADACPSVEEASTKMLLEFDLTNNFGGTAGFLAA  
 ID NO 13: YCDENLN ST GTKLTCVSGNCPLEAASTQSLDEFNESSSYGNPAGYLAA  
 ID NO 14: YCGKNNDAPA GTNITCTGNACPEVEKADATFLYSFE DSGVDVTGFLAL  
 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 FRGSSIRNW IADLTFVPVS YPPV SGT KVHKGFLDSY  
 ID NO 4: SDKQKTIYLV FRGTNSFRSA ITDIVFNFS YKPV KGA KVHAGFLSSY  
 ID NO 5: DDSSKEIITV FRGTGSDTNL QLDNTNYTLTP FDTLPQCNGC EVHGGYYIGW  
 ID NO 6: DDSSKEIITV FRGTGSDTNL QLDNTNYTLTP FDTLPQCNSC EVHGGYYIGW  
 ID NO 7: DSARKEIVVS FRGSINIRNW LTNLDFG QE DCSL VSGC GVHSGFQRAW  
 ID NO 8: DNARKEIVVS VRGSINVRNW ITNFNFG QK TCDL VAGC GVHTGFPLDAW  
 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 YRGTDSLIDW LTNLNFDKTA WPAN ISNS LVHEGFLNAY

ID NO 1: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHS L GGATAVLSALDLYHHGHA  
 ID NO 2: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHS L GGATAVLSALDLYHHGHD  
 ID NO 3: GEVQNELVAT VLDQFKQYPS YKVAVTGHSL GGATALLCALDLYQREEGLS  
 ID NO 4: EQVVNDYFPV VQEQLTAHPT YKVIVTGHSL GGAQALLAGMDLYQREPRLS  
 ID NO 5: VSVQDQVESL VKQQVSQYPD YALTVTGHSL GASLAALTAAL SATYD

ES 2 629 332 T3

ID NO 6: ISVQDQVESL VQQQVSQFPD YALTVTGHSL GASLAALTAAQL SATYD  
 ID NO 7: NEISSQATAA VASARKANPS FNVISTGHSL GGAVAVLAAANLRVGGT  
 ID NO 8: EEVAANVKAA VSAAKTANPT FKFVVTGHSL GGAVATIAAAAYLRKDGf  
 ID NO 9: KVVDRRIKT LDELKPEHSD YKIVVVGHSL GAAIASLAAADLRTKNY  
 ID NO 10: KLVRDDIIE LKEVVAQNPN YELVVVGHSL GAAVATLAATDLRGKGYF  
 ID NO 11: ESAADELTSK IKSAMSTYSG YTLYFTGHSL GGALATLGATVLRNDGY  
 ID NO 12: EAAADNLTSK IKSAMSTYSG YTLYFTGHSL GGALATLGATVLRNDGY  
 ID NO 13: SEIADTITSK VESALSDHSD YSLVLTGHSY GAALAALAATALRNSGH  
 ID NO 14: RSVADTLRQK VEDAVREHPD YRVVFTGHSL GGALATVAGADLRNGY  
 ID NO 15: LVSMQOVQEA 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 AGGEYRVTHADDPVPRL  
 ID NO 8: PFDLYTYG SPRVGNDFFA NFVTQQ TGAEYRVTHGDDVPVPRL  
 ID NO 9: DAILYAYA APRVANKPLA EFITNQ GNNYRFTHTNDPVPKL  
 ID NO 10: SAKLYAYA SPRVGNAALA KYITAQ GNNFRFTHTNDPVPKL  
 ID NO 11: SVELYTYG CPRIGNYALA EHITSQ GSGANFRVTHLNDIVPRV  
 ID NO 12: SVELYTYG CPRVGNYALA EHITSQ GSGANFPVTHLNDIVPRV  
 ID NO 13: SVELYNYG QPRLGNEALA TYITDQ NKGGNRVRTHTNDIVPKL  
 ID NO 14: DIDVFSYG APRVGNRAFA EFLTVQ TGGTLYRITHHTNDIVPRL  
 ID NO 15: KMQMFTYG QPRTGNQAFSA EYVENL GHPVFRVVYRHDIVPRM

ID NO 1: PPGAFGFLHA GEEFWIMK DSSLRVCPNGIETDNCSNSIV  
 ID NO 2: PPGAFGFLHA GEEFWIMK DSSLRVCPNGIETDNCSNSIV  
 ID NO 3: PPAAFGFLHA GEEYWITD NSPETVQVCTSDLETSDCSNSIV  
 ID NO 4: PPQSFQFLHP GVESWIKS GTSNVQICTSEIETKDCSNSIV  
 ID NO 5: PPVEQGYAHG GVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCCE AQGGQG  
 ID NO 6: PPADEGYAHG VVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCCE AQGGQG  
 ID NO 7: PPLIFGYRHT TPEFWLSGGGGDKVDYTI SDVKVCEGANLG CNGGTL  
 ID NO 8: PPIVFGYRHT SPEYWLNG GPLDKDYTVTEIKVCEGIANVM CNGGTI  
 ID NO 9: PLLTMGYVHI SPEYYITA PDNTTVTDNQVTVLDGYVNFK GNTGTS  
 ID NO 10: PLLSMGYVHV SPEYWITS PNNATVSTSDIKVIDGDVSFD GNTGTG  
 ID NO 11: PPMDFGFSQP SPEYWITS GNGASVTASDIEVIEGINSTA GNAGEA  
 ID NO 12: PPMDFGFSQP SPEYWITS GTGASVTASDIEELIEGINSTA 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: LPLLLTDFEAHIWYF 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 DIPAHLWYF 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
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.