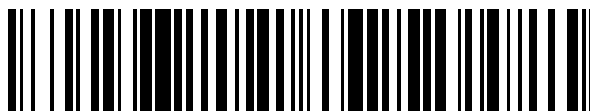


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 334**

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 10180310 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2371949**

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 2 629 334 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 Q4V+S58A+V60S+S83T+I86V+A150G+E210K+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*.
 55 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*.
 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*.
 SEQ ID NO: 16 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Landerina penisapora*.

5 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Lipasas progenitoras

10 [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.

15 [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*.

20 [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.

25 [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*,
 30 *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 [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.

40 Lipasas variantes

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

- 45 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,

50 y donde la variante tiene actividad de lipasa.

[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 Q4V+S58A+V60S+S83T+I86V+A150G+E210K+L227G+T231R+N233R+P256K (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).

[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.

[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*, *Tolyposcladium*, 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*.

[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*.

[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 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*. 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 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*.

[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.

Identificación de regiones y sustituciones

[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

[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 Q4V, L227G, T231R y N233R.

[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/*.

5 [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.

10 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.

15 [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 E210K y P256K.

[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.

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

25 [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.

30 Sustituciones en la Región III

[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.

35 [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 S83T y I86V.

[0038] Los residuos de aminoácidos correspondientes a las siguientes posiciones están comprendidos por la Región III: 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.

45 [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.

50 Sustituciones en la Región IV

[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.

55 [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 S58A y V60S.

[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.

60 [0045] En particular, se han identificado las siguientes sustituciones: X27R.

[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

5 [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.

Aminoácidos en otras posiciones

10 [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.

20 [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.

[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.

25 Variantes de lipasa

[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).
30 (Q4V, L227G, T231 R y N233R) (E210K y P256K) (S83T y I86V) (S58A y V60S).

Región I	Región II	Región III	Región IV	Regiones exteriores
Q4V+L227G + T231 R + N233R	E210K+P256K	S83T+I86V	S58A + V60S	A150G

Nomenclatura para modificaciones de aminoácidos

35 [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)

40 [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.

[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.

45 [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.

50 [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 X231R 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.

55 [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

- 5 [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.
- 10 [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

- 15 [0060] La relación entre dos secuencias de aminoácidos o entre dos secuencias de nucleótidos se describe por el parámetro "identidad".
- 20 [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.
- 25 [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.
- 30 [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).
- 35 [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

- 40 [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.
- 45 [0066] En la presente invención, las posiciones correspondientes (u homólogas) en las secuencias de lipasa de *Absidia reflexa*, *Absidia corymbifera*, *Rhizmucor 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.
- 50 [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.
- 55
- 60

Hibridación

5 [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.

15 [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.

20 [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).

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

30 [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.

35 [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)

40 [0073] 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.

45 Riesgo Beneficio

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

50 Usos

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

55 [0076] Elementos descritos en la solicitud.

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):

- 60 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.

- 5
- 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).
- 10
- 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).
- 15
- Elemento 4. Una variante de lipasa según el elemento 1, donde la lipasa variante es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 2.
- 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.
- 20
- 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.
- 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).
- 25
- 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).
- 30
- 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).
- 35
- 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).
- 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).
- 40
- 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).
- 45
- 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).
- 50
- 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).
- 55
- 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).
- 60
- Elemento 16. Una variante de lipasa del elemento 1, donde la lipasa comprende una sustitución seleccionada del grupo siguiente de sustituciones:

- a) T231 R + N233R + I255Y
 b) I202G + T231R + N233R
 c) I86V + L227G + T231 R + N233R + P256K
 d) Q4V + S58N + V60S + T231 R + N233R
 e) S58N + V60S + I90R + T231 R + N233R
 f) I90A + T231 R + N233R + I255V
 g) S58N + V60S + I86V + A150G + L227G + T231R + N233R + P256K
 h) S58N + V60S + L147M + F211L + T231R + N233R
 i) Q4V + S58A + V60S + S83T + I86V + A150G + E210K + L227G + T231R + N233R + P256K
 j) S58N + V60S + I86V + A150G + L227G + T231R + N233R + P256K

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

Elemento18. 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.

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.

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

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

Medios y soluciones

Producto	Nombre comercial
LAS:	Surfac PS
Zeolite A	Wessalith P

Otros ingredientes usados son reactivos estándar de laboratorio.

Materiales

Proveedor del producto

[0078] EMPA221 EMPA St. Gallen, Lerchfeldstrasse 5, CH-9014 St. Gallen, Switzerland

Ejemplo 1

Producción de la enzima

[0079] 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.

[0080] 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.

[0081] 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

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

[0082] 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 energicamente 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.

20 [0083] El ensayo se lleva a cabo bajo las condiciones experimentales especificadas 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 (EM-PA221 usado como textil de algodón)

25 [0084] 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.

30 [0085] 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.

35 [0086] 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.

[0087] 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:

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

[0088] 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.

15 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:

$$20 \quad RP = P(\text{enzima de prueba}) / P(\text{enzima de referencia})$$

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)

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

[0089] Se considera que una variante muestra un rendimiento del lavado mejorado si tiene un rendimiento mejor que la referencia.

30 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

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

[0090] 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.

[0091] 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:

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

$$55 \quad \text{Alfa}_{\text{enzima de prueba}} = \text{Olor}_{\text{enzima de prueba}} - \text{Blanco}$$

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

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

[0092] La actividad de una lipasa respecto a la absorbancia a 280 nm se determina mediante el ensayo siguiente:

LU/A280:

[0093] La actividad de la lipasa se determina como se ha descrito anteriormente en la sección Actividad de lipasa. 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

[0094] El factor de Riesgo-Beneficio que describe el rendimiento en comparación con el riesgo reducido de olor se define como:

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

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

[0095] Al aplicar los métodos anteriores, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 4

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

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

Ejemplo 6

BR - Riesgo Beneficio

[0096] 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

ES 2 629 334 T3

enumeradas.

Tabla 5

Variante	Mutaciones en la SEQ ID NO: 2
Referencia	T231R + N233R
9	L97V+ T231R+N233R
10	A150G+T231R+N233R
11	190R+T231R+N233R
12	I202V+T231R+N233R
13	L227G+ T231R+ N233R+ P256K
14	I90A+ T231 R+ N233R
15	T231R+N233R+ I255P
16	I90V+I255V+T231R+N233R
17	F211L+ L227G+ T231R+ N233R+ I255L+ P256K
18	S58N+ V60S+ T231 R+ N233R+ Q249L
19	S58N+ V60S+ T231 R+ N233R+ Q249I
20	A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
21	K46L+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
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+ T231 R+ N233R+ D254I
26	E43T+ K46I+ S58N+ V60S+ T231 R+ N233R+ Q249L+ D254I
27	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
28	K24R+ K46R+ K74R+ I86V+ K98R+ K127R+ D137K+ A150G+ K223R+ T231 R+ 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+ T231 R+ N233R+ P256L
37	I202L+ T231R+ N233R+ I255A

ES 2 629 334 T3

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+ T231 R+ 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+ T231R+ 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+ T231R+ 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+ T231 R+ N233R+ I255A+ P256K
57	S58T+ V60K+ I86V+ N94K+ A150G+ E210V L227G+ T231 R+ 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+ T231 R+ N233R
70	D96N+ T231 R+ N233R
71	T231 R+ N233I+ D234G

ES 2 629 334 T3

72	S58K+ V60L+ E210V+ Q249R
73	S58H+ V60L+ E210V+ Q249R
74	Q4V+ F55V+ I86V+ T231 R+ 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

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

LISTADO DE SECUENCIAS

5

[0097]

<110> Novozymes A/S
 Novozymes North America, Inc.
 10 Vind, Jesper
 Knotzel, Jurgen Carsten Franz
 Borch, Kim
 Svendsen, Allan
 Callisen, Thomas Honger
 15 Yaver, Debbie
 Bjornvad, Mads Eskelund
 Hansen, Peter Kamp
 Ge, Haiyan
 Lamsa, Michael
 20
 <120> Variantes de lipasa
 <130> 10928-EP-ETD[2]
 25 <160> 18
 <170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 30 <211> 807
 <212> DNA
 <213> Thermomyces lanuginosus

ES 2 629 334 T3

```

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

5
<400> 1
gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc aat ctc ttt gca cag tat      48
Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
1 5 10 15

10
tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat gat gcc cca gct ggt aca      96
Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
20 25 30

15
aac att acg tgc acg gga aat gcc tgc ccc gag gta gag aag gcg gat      144
Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
35 40 45

20
gca acg ttt ctc tac tcg ttt gaa gac tct gga gtg ggc gat gtc acc      192
Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
50 55 60

25
ggc ttc ctt gct ctc gac aac acg aac aaa ttg atc gtc ctc tct ttc      240
Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
65 70 75 80

30
cgt ggc tct cgt tcc ata gag aac tgg atc ggg aat ctt aac ttc gac      288
Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
85 90 95

35
ttg aaa gaa ata aat gac att tgc tcc ggc tgc agg gga cat gac ggc      336
Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
100 105 110

40
ttc act tcg tcc tgg agg tct gta gcc gat acg tta agg cag aag gtg      384
Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
115 120 125

45
gag gat gct gtg agg gag cat ccc gac tat cgc gtg gtg ttt acc gga      432
Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
130 135 140

50
cat agc ttg ggt ggt gca ttg gca act gtt gcc gga gca gac ctg cgt      480
His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
145 150 155 160

55
gga aat ggg tat gat atc gac gtg ttt tca tat ggc gcc ccc cga gtc      528
Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
165 170 175

60
gga aac agg gct ttt gca gaa ttc ctg acc gta cag acc ggc gga aca      576
Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
180 185 190

65
ctc tac cgc att acc cac acc aat gat att gtc cct aga ctc ccg ccg      624
Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Arg Leu Pro Pro
195 200 205

70
cgc gaa ttc ggt tac agc cat tct agc cca gag tac tgg atc aaa tct      672
Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Lys Ser
210 215 220

75
gga acc ctt gtc ccc gtc acc cga aac gat atc gtg aag ata gaa ggc      720

```

ES 2 629 334 T3

Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp Ile Val Lys Ile Glu Gly
 225 230 235 240
 5 atc gat gcc acc ggc ggc aat aac cag cct aac att ccg gat atc cct 768
 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro
 245 250 255
 10 gcg cac cta tgg tac ttc ggg tta att ggg aca tgt ctt 807
 Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
 260 265
 15 <210> 2
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Thermomyces lanuginosus
 <400> 2
 20 Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe Asn Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10
 25 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn Asp Ala Pro Ala Gly Thr
 20 25 30
 30 Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro Glu Val Glu Lys Ala Asp
 35 40 45
 35 Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser Gly Val Gly Asp Val Thr
 50 55 60
 40 Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys Leu Ile Val Leu Ser Phe
 65 70 75 80
 45 Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile Gly Asn Leu Asn Phe Asp
 85 90 95
 50 Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly Cys Arg Gly His Asp Gly
 100 105 110
 55 Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp Thr Leu Arg Gln Lys Val
 115 120 125
 60 Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr Arg Val Val Phe Thr Gly
 130 135 140
 55 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val Ala Gly Ala Asp Leu Arg
 145 150 155 160
 60 Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser Tyr Gly Ala Pro Arg Val
 165 170 175

ES 2 629 334 T3

Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr Val Gln Thr Gly Gly Thr
 180 185 190
 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 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro Asn Ile Pro Asp Ile Pro
 245 250 255
 25 Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly Thr Cys Leu
 260 265
 <210> 3
 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Absidia reflexa
 30 <400> 3
 35 Ser Ser Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile
 1 5 10 15
 40 Lys Ala His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg
 20 25 30
 45 Thr Val Ile Pro Gly Gly Arg Trp Ser Cys Pro His Cys Gly Val Ala
 35 40 45
 50 Ser Asn Leu Gln Ile Thr Lys Thr Phe Ser Thr Leu Ile Thr Asp Thr
 50 55 60
 55 Asn Val Leu Val Ala Val Gly Glu Lys Glu Lys Thr Ile Tyr Val Val
 65 70 75 80
 60 Phe Arg Gly Thr Ser Ser Ile Arg Asn Ala Ile Ala Asp Ile Val Phe
 85 90 95
 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 2 629 334 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 Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr
 245 250 255
 35 Leu Asp Met Asn Thr Gly Leu Cys Leu
 260 265
 <210> 4
 <211> 264
 <212> PRT
 40 <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
 65 Val Leu Val Ala Val Gly Glu Asn Glu Lys Thr Ile Tyr Val Val Phe
 70 75 80

ES 2 629 334 T3

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

ES 2 629 334 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6
<211> 271
<212> PRT

ES 2 629 334 T3

<213> Rhizopus oryzae

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Gln Glu Gln Leu Thr Ala His Pro Thr Tyr Lys Val Ile Val Thr
130 135 140

40 Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Gln Ala Leu Leu Ala Gly Met Asp Leu
145 150 155 160

45 Tyr Gln Arg Glu Pro Arg Leu Ser Pro Lys Asn Leu Ser Ile Phe Thr
165 170 175

50 Val Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Glu
180 185 190

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

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

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

ES 2 629 334 T3

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

5
Leu Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu
260 265 270

10
<210> 7
<211> 267
<212> PRT
<213> Aspergillus niger

15
<400> 7

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

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

25
Ala Asp Leu Cys Asn Ile Pro Ser Thr Ile Ile Lys Gly Glu Lys Ile
35 40 45

30
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 2 629 334 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
 <210> 8
 <211> 266
 <212> PRT
 25
 <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

ES 2 629 334 T3

Leu Ala Ala Leu Thr Ala Ala Gln Leu Ser Ala Thr Tyr Asp Asn Ile
 145 150 155 160

5

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

10

Tyr Met Asn Asp Ala Phe Gln Ala Ser Ser Pro Asp Thr Thr Gln Tyr
 180 185 190

15

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

20

Asp Glu Gly Tyr Ala His Gly Val Val Glu Tyr Trp Ser Val Asp Pro
 210 215 220

25

Tyr Ser Ala Gln Asn Thr Phe Val Cys Thr Gly Asp Glu Val Gln Cys
 225 230 235 240

30

Cys Glu Ala Gln Gly Gly Gln Gly Val Asn Asn Ala His Thr Thr Tyr
 245 250 255

35

Phe Gly Met Thr Ser Gly His Cys Thr Trp
 260 265

<210> 9
 <211> 276
 <212> PRT
 <213> Fusarium oxysporum

40

<400> 9

Ala Val Gly Val Thr Thr Thr Asp Phe Ser Asn Phe Lys Phe Tyr Ile
 1 5 10 15

45

Gln His Gly Ala Ala Ala Tyr Cys Asn Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ser
 20 25 30

50

Lys Ile Thr Cys Ser Asn Asn Gly Cys Pro Thr Val Gln Gly Asn Gly
 35 40 45

55

Ala Thr Ile Val Thr Ser Phe Val Gly Ser Lys Thr Gly Ile Gly Gly
 50 55 60

60

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

65

Gly Ser Ile Asn Ile Arg Asn Trp Leu Thr Asn Leu Asp Phe Gly Gln
 85 90 95

ES 2 629 334 T3

	Glu	Asp	Cys	Ser 100	Leu	Val	Ser	Gly	Cys 105	Gly	Val	His	Ser	Gly 110	Phe	Gln
5	Arg	Ala	Trp 115	Asn	Glu	Ile	Ser	Ser 120	Gln	Ala	Thr	Ala	Ala 125	Val	Ala	Ser
10	Ala	Arg 130	Lys	Ala	Asn	Pro	Ser 135	Phe	Asn	Val	Ile	Ser 140	Thr	Gly	His	Ser
15	Leu 145	Gly	Gly	Ala	Val	Ala 150	Val	Leu	Ala	Ala	Ala 155	Asn	Leu	Arg	Val	Gly 160
20	Gly	Thr	Pro	Val	Asp 165	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Gly 170	Ser	Pro	Arg	Val	Gly 175	Asn
25	Ala	Gln	Leu	Ser 180	Ala	Phe	Val	Ser	Asn 185	Gln	Ala	Gly	Gly	Glu 190	Tyr	Arg
30	Val	Thr	His 195	Ala	Asp	Asp	Pro	Val 200	Pro	Arg	Leu	Pro	Pro 205	Leu	Ile	Phe
35	Gly	Tyr 210	Arg	His	Thr	Thr	Pro 215	Glu	Phe	Trp	Leu	Ser 220	Gly	Gly	Gly	Gly
40	Asp 225	Lys	Val	Asp	Tyr	Thr 230	Ile	Ser	Asp	Val	Lys 235	Val	Cys	Glu	Gly	Ala 240
45	Ala	Asn	Leu	Gly	Cys 245	Asn	Gly	Gly	Thr	Leu 250	Gly	Leu	Asp	Ile	Ala 255	Ala
50	His	Leu	His	Tyr 260	Phe	Gln	Ala	Thr	Asp 265	Ala	Cys	Asn	Ala	Gly 270	Gly	Phe
55	Ser	Trp	Arg	Arg												
60	<210>	10														
	<211>	273														
	<212>	PRT														
	<213>	Fusarium heterosporum														
65	<400>	10														
70	Thr 1	Val	Thr	Thr	Gln 5	Asp	Leu	Ser	Asn	Phe 10	Arg	Phe	Tyr	Leu	Gln 15	His
75	Ala	Asp	Ala	Ala 20	Tyr	Cys	Asn	Phe	Asn 25	Thr	Ala	Val	Gly	Lys 30	Pro	Val

ES 2 629 334 T3

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

ES 2 629 334 T3

<210> 11
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus oryzae*
 <400> 11

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

15
 Ala Ala Ala Thr Tyr Cys Pro Asn Asn Tyr Val Ala Lys Asp Gly Glu
 20 25 30

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

25
 Ser Thr Val Lys Leu Ser Phe Ser Asp Asp Thr Ile Thr Asp Thr Ala
 50 55 60

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

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

40
 Gln Thr Asp Pro Gly Leu Cys Asp Gly Cys Lys Ala Glu Leu Gly Phe
 100 105 110

45
 Trp Thr Ala Trp Lys Val Val Arg Asp Arg Ile Ile Lys Thr Leu Asp
 115 120 125

50
 Glu Leu Lys Pro Glu His Ser Asp Tyr Lys Ile Val Val Val Gly His
 130 135 140

55
 Ser Leu Gly Ala Ala Ile Ala Ser Leu Ala Ala Ala Asp Leu Arg Thr
 145 150 155 160

60
 Lys Asn Tyr Asp Ala Ile Leu Tyr Ala Tyr Ala Ala Pro Arg Val Ala
 165 170 175

65
 Asn Lys Pro Leu Ala Glu Phe Ile Thr Asn Gln Gly Asn Asn Tyr Arg
 180 185 190

70
 Phe Thr His Asn Asp Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Leu Leu Thr Met
 195 200 205

75
 Gly Tyr Val His Ile Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Thr Ala Pro Asp Asn
 210 215 220

ES 2 629 334 T3

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

10 Phe Lys Gly Asn Thr Gly Thr Ser Gly Gly Leu Pro Asp Leu Leu Ala
245 250 255

15 Phe His Ser His Val Trp Tyr Phe Ile His Ala Asp Ala Cys Lys Gly
260 265 270

20 Pro Gly Leu Pro Leu Arg
275

<210> 12
<211> 278
<212> PRT
<213> Penicillium camemberti

25 <400> 12

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

35 Ala Ala Ala Ser Tyr Tyr Glu Ala Asp Tyr Thr Ala Gln Val Gly Asp
20 25 30

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

45 Ala Thr Val Ser Tyr Asp Phe Ser Asp Ser Thr Ile Thr Asp Thr Ala
50 55 60

50 Gly Tyr Ile Ala Val Asp His Thr Asn Ser Ala Val Val Leu Ala Phe
65 70 75 80

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

60 His Thr Asn Pro Gly Leu Cys Asp Gly Cys Leu Ala Glu Leu Gly Phe
100 105 110

65 Trp Ser Ser Trp Lys Leu Val Arg Asp Asp Ile Ile Lys Glu Leu Lys
115 120 125

70 Glu Val Val Ala Gln Asn Pro Asn Tyr Glu Leu Val Val Val Gly His
130 135 140

75 Ser Leu Gly Ala Ala Val Ala Thr Leu Ala Ala Thr Asp Leu Arg Gly
145 150 155 160

ES 2 629 334 T3

5 Lys Gly Tyr Pro Ser Ala Lys Leu Tyr Ala Tyr Ala Ser Pro Arg Val
 165 170 175
 Gly Asn Ala Ala Leu Ala Lys Tyr Ile Thr Ala Gln Gly Asn Asn Phe
 180 185 190
 10 Arg Phe Thr His Thr Asn Asp Pro Val Pro Lys Leu Pro Leu Leu Ser
 195 200 205
 15 Met Gly Tyr Val His Val Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser Pro Asn
 210 215 220
 20 Asn Ala Thr Val Ser Thr Ser Asp Ile Lys Val Ile Asp Gly Asp Val
 225 230 235 240
 25 Ser Phe Asp Gly Asn Thr Gly Thr Gly Leu Pro Leu Leu Thr Asp Phe
 245 250 255
 30 Glu Ala His Ile Trp Tyr Phe Val Gln Val Asp Ala Gly Lys Gly Pro
 260 265 270
 35 Gly Leu Pro Phe Lys Arg
 275
 <210> 13
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Aspergillus foetidus
 40 <400> 13
 Ser Val Ser Thr Ser Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ala Gln Trp
 1 5 10 15
 45 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Lys Asp Ser Asn
 20 25 30
 50 Leu Thr Cys Thr Ala Asn Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr
 35 40 45
 55 Thr Met Leu Leu Glu Phe Asp Leu Thr Asn Asp Phe Gly Gly Thr Ala
 50 55 60
 60 Gly Phe Leu Ala Ala Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe
 65 70 75 80
 Arg Gly Ser Ser Thr Ile Glu Asn Trp Ile Ala Asn Leu Asp Phe Ile
 85 90 95

ES 2 629 334 T3

5 Leu Glu Asp Asn Asp Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly
 100 105 110
 Phe Trp Lys Ala Trp Glu Ser Ala Ala Asp Glu Leu Thr Ser Lys Ile
 115 120 125
 10 Lys Ser Ala Met Ser Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly
 130 135 140
 15 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg
 145 150 155 160
 20 Asn Asp Gly Tyr Ser Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Ile
 165 170 175
 25 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
 30 Met Asp Phe Gly Phe Ser Gln Pro Ser Pro Glu Tyr Trp Ile Thr Ser
 210 215 220
 35 Gly Asn Gly Ala Ser Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Val Ile Glu Gly
 225 230 235 240
 40 Ile Asn Ser Thr Ala Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Ser Val Leu
 245 250 255
 45 Ala His Leu Trp Tyr Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu
 260 265 270
 <210> 14
 <211> 270
 <212> PRT
 50 <213> Aspergillus niger
 <400> 14
 55 Ser Val Ser Thr Ser Thr Leu Asp Glu Leu Gln Leu Phe Ser Gln Trp
 1 5 10 15
 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Ser Asn Asn Ile Asp Ser Asp Asp Ser Asn
 20 25 30
 60 Val Thr Cys Thr Ala Asp Ala Cys Pro Ser Val Glu Glu Ala Ser Thr
 35 40 45

ES 2 629 334 T3

5 Lys Met Leu Leu Glu Phe Asp Leu Thr Asn Asn Phe Gly Gly Thr Ala
 50 55 60
 Gly Phe Leu Ala Ala Asp Asn Thr Asn Lys Arg Leu Val Val Ala Phe
 65 70 75 80
 10 Arg Gly Ser Ser Thr Ile Lys Asn Trp Ile Ala Asp Leu Asp Phe Ile
 85 90 95
 15 Leu Gln Asp Asn Asp Asp Leu Cys Thr Gly Cys Lys Val His Thr Gly
 100 105
 20 Phe Trp Lys Ala Trp Glu Ala Ala Ala Asp Asn Leu Thr Ser Lys Ile
 115 120 125
 25 Lys Ser Ala Met Ser Thr Tyr Ser Gly Tyr Thr Leu Tyr Phe Thr Gly
 130 135 140
 30 His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Leu Gly Ala Thr Val Leu Arg
 145 150 155 160
 35 Asn Asp Gly Tyr Ser Val Glu Leu Tyr Thr Tyr Gly Cys Pro Arg Val
 165 170 175
 40 Gly Asn Tyr Ala Leu Ala Glu His Ile Thr Ser Gln Gly Ser Gly Ala
 180 185 190
 45 Asn Phe Pro 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
 50 Gly Thr Gly Ala Ser Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Leu Ile Glu Gly
 225 230 235 240
 Ile Asn Ser Thr Ala Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Asp Val Leu
 245 250 255
 55 Ala His Leu Trp Tyr Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu
 260 265 270
 60 <210> 15
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Aspergillus oryzae

ES 2 629 334 T3

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

80 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asp Gly Thr Asp Gly Thr Ser Ile Asp

ES 2 629 334 T3

				245						250						255
5	Ala	His	Arg	Trp	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Ile	Ser	Glu	Cys	Ser			
				260					265							
10	<210>	16														
	<211>	251														
	<212>	PRT														
	<213>	Landerina	penisapora													
	<400>	16														
15	Pro	Gln	Asp	Ala	Tyr	Thr	Ala	Ser	His	Ala	Asp	Leu	Val	Lys	Tyr	Ala
	1				5					10					15	
20	Thr	Tyr	Ala	Gly	Leu	Ala	Tyr	Gln	Thr	Thr	Asp	Ala	Trp	Pro	Ala	Ser
				20					25					30		
25	Arg	Thr	Val	Pro	Lys	Asp	Thr	Thr	Leu	Ile	Ser	Ser	Phe	Asp	His	Thr
			35					40					45			
30	Leu	Lys	Gly	Ser	Ser	Gly	Tyr	Ile	Ala	Phe	Asn	Glu	Pro	Cys	Lys	Glu
		50					55					60				
35	Ile	Ile	Val	Ala	Tyr	Arg	Gly	Thr	Asp	Ser	Leu	Ile	Asp	Trp	Leu	Thr
	65					70					75					80
40	Asn	Leu	Asn	Phe	Asp	Lys	Thr	Ala	Trp	Pro	Ala	Asn	Ile	Ser	Asn	Ser
				85						90					95	
45	Leu	Val	His	Glu	Gly	Phe	Leu	Asn	Ala	Tyr	Leu	Val	Ser	Met	Gln	Gln
				100					105					110		
50	Val	Gln	Glu	Ala	Val	Asp	Ser	Leu	Leu	Ala	Lys	Cys	Pro	Asp	Ala	Thr
			115					120					125			
55	Ile	Ser	Phe	Thr	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Cys	Ile	Ser
		130					135					140				
60	Met	Val	Asp	Thr	Ala	Gln	Arg	His	Arg	Gly	Ile	Lys	Met	Gln	Met	Phe
	145					150					155					160
65	Thr	Tyr	Gly	Gln	Pro	Arg	Thr	Gly	Asn	Gln	Ala	Phe	Ala	Glu	Tyr	Val
				165						170					175	
70	Glu	Asn	Leu	Gly	His	Pro	Val	Phe	Arg	Val	Val	Tyr	Arg	His	Asp	Ile
			180						185					190		
75	Val	Pro	Arg	Met	Pro	Pro	Met	Asp	Leu	Gly	Phe	Gln	His	His	Gly	Gln

ES 2 629 334 T3

	195	200	205
5	Glu Val Trp Tyr Glu Gly Asp 210	Glu Asn Ile Lys Phe Cys Lys Gly Glu 215	
10	Gly Glu Asn Leu Thr Cys Glu Leu Gly Val Pro Phe Ser Glu Leu Asn 225	230	235 240
15	Ala Lys Asp His Ser Glu Tyr Pro Gly Met His 245	250	
20	<210> 17 <211> 12 <212> PRT <213> Artificial sequence		
25	<220> <223> Sequence used in the alignment example <400> 17		
30	Ala Cys Met Ser His Thr Trp Gly Glu Arg Asn Leu 1	5	10
35	<210> 18 <211> 14 <212> PRT <213> Artificial sequence		
40	<220> <223> Sequence used in the alignment example <400> 18		
40	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 Q4V +S58A +V60S +S83T +I86V +A150G +E210K +L227G +T231R +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 variante de lipasa comprende además sustituciones seleccionadas del grupo consistente en sustituciones en posiciones que corresponden con las posiciones 202, 211, y 225 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 15 4. Variante de lipasa de la reivindicación 3, donde las sustituciones son X202G, X211L, y X255Y/V.
5. Variante de lipasa según la reivindicación 1, donde la lipasa comprende además una sustitución en la posición que corresponde con la posición 90 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 20 6. Variante de lipasa de la reivindicación 5, donde la sustitución es X90A/R.
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 27 (usando la SEQ ID NO: 2 para la numeración).
- 25 8. Variante de lipasa de la reivindicación 7, donde la sustitución es X27R.
9. 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).
- 30 10. Variante de lipasa de la reivindicación 9, donde las sustituciones son X81Q/E, X147M/Y, y X249R/I/L.
11. Secuencia de ADN que codifica la variante de lipasa de las reivindicaciones 1-10.
- 35 12. Vector de expresión que alberga la secuencia de ADN de la reivindicación 11.
13. Célula huésped transformada que contiene la secuencia de ADN de la reivindicación 11.
- 40 14. Método para producir una variante de lipasa, método el cual comprende cultivar la célula huésped transformada de la reivindicación 13 bajo condiciones propicias para la producción de la variante de lipasa y recuperar la variante de lipasa del caldo resultante.

ES 2 629 334 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: DIPTTQLEDKFWVQYAAAT
ID NO 10: DVSTSELDQFEFVWQYAAAAS
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 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 GKPVHCSAGNCPDIEKDAAIIVVGSV VGTKTGIGAYVAT
ID NO 9: YCPNNYVAKD GEKLNCSVGNCPDVEAAGSTVKLSFS DDTITDTAGFVAV
ID NO 10: YYEADYTAQV GDKLSCSKGNCPEVEATGATVSYDFS DSTITDTAGYIAV
ID NO 11: YCSNNID SK DSNLTCTANACPSVEEASTMMLLEFDLTNDFGGTAGFLAA
ID NO 12: YCSNNID SD DSNVTCTADACPSVEEASTKMLLEFDLTNNFGGTAGFLAA
ID NO 13: YCDENLN ST GTKLTCVGNCPVLEAASTQSLDEFNESSSYGNPAGYLAA
ID NO 14: YCGKNNDAPA GTNITCTGNACPEVEKADATFLYSFE DSGVGDVTFGLAL
ID NO 15: YQTTDAWPAS RTVPKDSSLISSFD HTLKGSSGYIAF

ID NO 1: GEKEKTIYVV FRGTSSIRNA IADIVFVPVN YPPV NGA KVHKGFLDSY
ID NO 2: GENEKTIYVV FRGTSSIRNA IADIVFVPVN YPPV NGA KVHKGFLDSY
ID NO 3: GDSEKTIYIV FRGSSSIRNW IADLTFVPVS YPPV SGT KVHKGFLDSY
ID NO 4: SDKQKTIYLV FRGTNSFRSA ITDIVFNFSY YKPV KGA KVHAGFLSSY
ID NO 5: DDSKEIITV FRGTGSDTNL QLDNTYTLTP FDTLPQCNGC EVHGGYIYGW
ID NO 6: DDSKEIITV FRGTGSDTNL QLDNTYTLTP FDTLPQCNSC EVHGGYIYGW
ID NO 7: DSARKEIVVS FRGSINIRNW LTNLDFG QE DCSL VSGC GVHSGFQRAW
ID NO 8: DNARKEIVVS VRGSINVRNW ITNFNFG QK TCDL VAGC GVHTGFDAW
ID NO 9: DNTNKAIVVA FRGSYSIRNW VTDATFP QT DPGL CDGC KALGFWTAW
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 VANLNFGLD ASDL CSGC EVHSGFWKAW
ID NO 14: DNTNKLIVLS FRGSRSIENW IGNLNFDLKE INDI CSGC RGHGFTSSW
ID NO 15: NEPCKEIIVA YRGTDSLIDW LTNLNFDKTA WPAN ISNS LVHEGFLNAY

ID NO 1: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHSL GGATAVLSALDLYHHGHA
ID NO 2: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHSL GGATAVLSALDLYHHGHD
ID NO 3: GEVQNELVAT VLDQFKQYPS YKVAVTGHSL GGATALLCALDLYQREEGLS
ID NO 4: EQVVNDYFPV VQEQLTAHPT YKVIIVTGHSL GGAQALLAGMDLYQREPRLS
ID NO 5: VSVQDQVESL VKQQVSQYPD YALVTGHSL GASLAALTAAL SATYD

```

Figura 1 (cont.)

ES 2 629 334 T3

ID NO 6: ISVQDQVESL VQQQVSQFPD YALTVTGHSL GASLAALTA AOL SATYD
 ID NO 7: NEISSQATAA VASARKANPS FNVISTGHSL GGAVAVLAAAANLRVGGT
 ID NO 8: EEVAANVKAA VSAAKTANPT FKFVVTGHSL GGAVATIAAAYLRKDGf
 ID NO 9: KVVRDRIKT LDELKPEHSD YKIVVVGHSL GAAIASLAAADLRTKNY
 ID NO 10: KLVRDDIIE LKEVVAQNP N YELVVVGHSL GAAVATLAATDLRGKGY
 ID NO 11: ESAADELTSK IKSAMSTYSG YTLYFTGHSL GGALATLGATVLRNDGY
 ID NO 12: EAAADNLTSK IKSAMSTYSG YTLYFTGHSL GGALATLGATVLRNDGY
 ID NO 13: SEIADTITSK VESALSDHSD YSLVLTGHSY GAALAAALATLRNSGH
 ID NO 14: RSVADTLRQK VEDAVREHPD YRVVFTGHSL GGALATVAGADLRNGY
 ID NO 15: LVSMQQVQEA VDSLLAKCPD ATISFTGHSL GGALACISMVDTAQRHRGI

ID NO 1: NIEIYTQG QPRIGTPAFA NYVIGT KIPYQRLVHERDIVPHL
 ID NO 2: NIEIYTQG QPRIGTPEFA NYVIGT KIPYQRLVNERDIVPHL
 ID NO 3: SSNLFLYTQG QPRVGDPAFA NYVVST GIPYRRTVNERDIVPHL
 ID NO 4: PKNLSIFTVG GPRVGNPTFA YYVEST GIPFQRTVHKRDIRVPHV
 ID NO 5: NIRLYTFG EPRSGNQAF A SYMNDAFQASSPDTTQYFRVTHANDGIPNL
 ID NO 6: NIRLYTFG EPRS NQAF A SYMNDAFQASSPDTTQYFRVTHANDGIPNL
 ID NO 7: PVDIYTYG SPRVGNQALS AFVSNQ AGGEYRVTHADDPVPRL
 ID NO 8: PFDLYTYG SPRVGNDFFA NFVTQQ TGAEYRVTHGDDVPVRL
 ID NO 9: DAILYAYA APRVANKPLA EFITNQ GNNYRFTHNDDPVPKL
 ID NO 10: SAKLYAYA SPRVGNAAAL KYITAQ GNNFRFTHTNDPVPKL
 ID NO 11: SVELYTYG CPRIGNYALA EHITSQ GSGANFRVTHLNDIVPRV
 ID NO 12: SVELYTYG CPRVGNYALA EHITSQ GSGANFPVTHLNDIVPRV
 ID NO 13: SVELYNYG QPRLGNEALA TYITDQ NKGGNRVVTHHTNDIVPKL
 ID NO 14: DIDVFSYG APRVGNRAFA EFLTQV TGGTLYRITHHTNDIVPRL
 ID NO 15: KMQMFTYG QPRTGNQAF A EYVENL GHPVFRVVYRHDIVPRM

ID NO 1: PPGAFGFLHA GEEFWIMK DSSLRVCPNGIETDNCNSIV
 ID NO 2: PPGAFGFLHA GEEFWIMK DSSLRVCPNGIETDNCNSIV
 ID NO 3: PPAAFGFLHA GEEYWITD NSPETVQVCTSDLETSDCSNSIV
 ID NO 4: PPQSFGLHP GVESWIKS GTSNVQICTSEIETKDCNSIV
 ID NO 5: PPVEQGYAHG GVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCE AQGGQG
 ID NO 6: PPADEGYAHG VVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCE AQGGQG
 ID NO 7: PPLIFGYRHT TPEFWLSGGGGDKVDYITISDVKCEGAANLG CNGGTL
 ID NO 8: PPIVFGYRHT SPEYWLNG GPLDKDYTVTEIKVCEGIANVM CNGGTI
 ID NO 9: PLLTMGYVHI SPEYYITA PDNFTVTDNQVTVLDGYVNFK GNTGTS
 ID NO 10: PLLSMGYVHV SPEYWITS PNNATVSTSDIKVIDGDSFD GNTGTG
 ID NO 11: PPMDFGFSQP SPEYWITS GNGASVTASDIEVIEGINSTA GNAGEA
 ID NO 12: PPMDFGFSQP SPEYWITS GTGASVTASDIEVIEGINSTA GNAGEA
 ID NO 13: PPTLLGYHHF SPEYYISS ADEATVTTTDTVTEVTGIDATG GNDGTD
 ID NO 14: PPREFGYSHS SPEYWIKS GTLVPTVRNDIVKIEGIDATG GNNQPN
 ID NO 15: PPMDLGFQHH GQEVWYEG DENIKFCKEGENLTCELGVP

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: GGLPDLALAFHSHVWYFIHADACKGGLPLR
 ID NO 10: LPLLTDFEAHIWYF VQVDA GKGPGLPFK R
 ID NO 11: TV SVLAHLWYF FAISE CLL
 ID NO 12: TV DVLHLWYF FAISE CLL
 ID NO 13: GT SIDAHRWYF IYISE CS
 ID NO 14: IP DIPAHLWYF GLIGT CL
 ID NO 15: FSEL NAKDHSEYP GMH

Figura 1 (cont.)

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.

Figura 1 (cont.)