



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0707202-3 B1

(22) Data do Depósito: 22/01/2007

(45) Data de Concessão: 22/08/2017



(54) Título: VARIANTE, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE EXPRESSEÃO, MICROORGANISMO TRANGÊNICO, E, MÉTODO DE PRODUZIR UMA VARIANTE DE LIPASE

(51) Int.Cl.: C12N 9/20

(30) Prioridade Unionista: 23/01/2006 US 60/761,109, 27/10/2006 US 60/854,891

(73) Titular(es): NOVOZYMES INC.. NOVOZYMES A/S

(72) Inventor(es): JESPER VIND; JÜRGEN CARSTEN FRANZ KNÖTZEL; KIM BORCH; ALLAN SVENDSEN; THOMAS HONGER CALLISEN; DEBBIE YAVER; MADS ESKELUND BJORNVAD; PETER KAMP HANSEN; HAIYAN GE; MICHAEL LAMSA

“VARIANTE, SEQUÊNCIA DE DNA, VETOR DE EXPRESSÃO, MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, E, MÉTODO DE PRODUZIR UMA VARIANTE DE LIPASE”

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção diz respeito a variantes de lipase.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Lipases são úteis, por exemplo, como enzimas detergentes para remover lipídeos ou manchas de gordura de roupas e outros têxteis, como aditivos para a massa de pão e outros produtos assados. Desta maneira, a lipase derivada de *Thermomyces lanuginosus* (sinônimo *Humicola lanuginosa*, EP 258 068 e EP 305 216) é vendida para o uso detergente sob o nome comercial Lipolase (produto da Novo Nordisk A/S), WO 0060063 descreve variantes da lipase *T. lanuginosus* com uma primeira boa lavagem particularmente desempenhada em uma solução detergente. WO 9704079, 10 WO 9707202 e WO 0032758 também divulgam variantes da lipase *T. lanuginosus*. 15

Em algumas aplicações, é de interesse minimizar a formação da geração de odor por ácidos graxos de cadeia curta. Desta maneira, é conhecido que detergentes de lavagem de roupas com lipases podem algumas vezes deixar odores residuais ligados às roupas manchadas com leite (EP 20 430315). O WO 02062973 divulga variantes de lipase onde a geração de odor foi reduzida pela ligação de uma extensão de terminal C.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Os inventores observaram que pela introdução de mutações em 25 certas regiões/posições de uma lipase é possível melhorar as propriedades ou características da lipase.

Em uma forma de realização preferida, a presente invenção diz respeito a lipases fornecendo propriedades melhoradas para o uso em detergentes. Por exemplo, a invenção fornece variantes com tendência

reduzida por gerar odor obtida pela introdução mutações e uma ou mais regiões identificadas na origem de lipase. Em outra forma de realização preferida, a presente invenção fornece variantes de lipase que, como comparadas à origem de lipase, tiveram o potencial reduzido para a
5 degradação sem a ligação de uma extensão de terminal C.

Em um outro aspecto a invenção diz respeito a uma seqüência de DNA que codifica a variante de lipase da invenção, um vetor de expressão abriga a dita seqüência de DNA e uma célula hospedeira transformada contendo uma seqüência de DNA ou o vetor de expressão.

10 Em um outro aspecto, a invenção fornece um método de produzir as variantes de lipase da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra o alinhamento das lipases.

LISTAGENS DE SEQÜÊNCIA

15 A SEQ ID N^o: 1 mostra a lipase que codifica a seqüência de DNA de *Thermomyces lanoginosus*.

A SEQ ID N^o: 2 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Thermomyces lanoginosus*.

20 A SEQ ID N^o: 3 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Absidia reflexa*.

A SEQ ID N^o: 4 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Absidia corymbifera*.

A SEQ ID N^o: 5 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Rhizomucor miehei*.

25 A SEQ ID N^o: 6 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Rhizopus oryzae*.

A SEQ ID N^o: 7 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Aspergillus niger*.

A SEQ ID N^o: 8 mostra uma seqüência de aminoácido de uma

lipase de *Aspergillus tubingensis*.

A SEQ ID N^o: 9 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Fusarium oxysporum*.

5 A SEQ ID N^o: 10 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Fusarium heterosporum*.

A SEQ ID N^o: 11 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Aspergillus oryzae*.

A SEQ ID N^o: 12 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Penicillium camemberti*.

10 A SEQ ID N^o: 13 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Aspergillus foetidus*.

A SEQ ID NO; 14 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Aspergillus niger*.

15 A SEQ ID N^o: 15 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Aspergillus oryzae*.

A SEQ ID N^o: 16 mostra uma seqüência de aminoácido de uma lipase de *Landerina penisapora*.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Origem de lipases

20 Qualquer origem de lipase adequada pode ser usada. Em uma forma de realização preferida, a origem de lipase pode ser uma lipase fúngica. Em outra forma de realização preferida, a origem de lipase pode ser a lipase com uma seqüência de aminoácido tendo pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou ainda 100% de homologia como
25 definido na seção “Homologia e alinhamento” à seqüência de lipase *T. lanuginosus* mostrada na SEQ ID N^o: 2.

A origem de lipase pode ser um polipeptídeo de levedura tal como um polipeptídeo *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, ou *Yarrowia*; ou mais preferivelmente um polipeptídeo

fúngico filamentoso tal como um polipeptídeo *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*,
5 *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, ou *Trichoderma*.

Em um aspecto preferido, a origem de lipase é um polipeptídeo *Saccharomyces carisbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis*, ou *Saccharomyces oviformis* tendo
10 atividade de lipase.

Em um outro aspecto preferido, a origem de lipase é um polipeptídeo *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus turbigensis*, *Fusarium*
15 *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*
20 *torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Thermomyces lanuginosus* (sinônimo: *Humicola lanuginosa*), *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* ou *Trichoderma viride*.

25 Em um outro aspecto preferido, a origem de lipase é uma lipase *Thermomyces*.

Em um aspecto mais preferido, a origem de lipase é uma lipase *Thermomyces lanuginosus*. Em uma forma de realização ainda mais preferida a origem de lipase é a lipase da SEQ ID N^o: 2.

Variantes de lipases

As variantes de lipase da presente invenção compreendem, em comparação com a origem de lipase, pelo menos três substituições selecionadas do grupo que consiste de:

- 5 a) pelo menos duas substituições na região I, e
 b) pelo menos uma substituição na região II, e
 c) pelo menos uma substituição na região III, e
 d) pelo menos uma substituição na região IV;
 e em que as variantes tem atividade de lipase.

- 10 Em uma forma de realização preferida, a variante de lipase é uma variante de uma lipase *Thermomyces*, mais preferivelmente, uma lipase *T. lanuginosus*, e ainda mais preferivelmente, a lipase *T. lanuginosus* mostrada na SEQ ID N^o: 2. Em uma forma de realização preferida a variante de lipase tem pelo menos 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 97%,
 15 98% ou 99% da identidade da SEQ ID N^o:2.

- A variante de lipase pode ser uma variante de uma origem de lipase codificada por um gene derivado/obtido a partir de um dos organismos de origem seguintes: *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, ou *Yarrowia*, *Acremonium*, *Aspergillus*,
 20 *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizophyllum*, *Talaromyces*, *Thermoascus*, *Thielavia*, *Tolyposcladium*, ou *Trichoderma*. Em uma forma de realização preferida, a variante de lipase tem pelo menos 50%, 60%, 70%,
 25 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da identidade à uma origem de lipase codificada por um gene derivado/obtido a partir de um dos organismos de origem seguintes: *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, ou *Yarrowia*, *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*,

Humicola, Magnaporthe, Mucor, Myceliophthora, Neocallimastix, Neurospora, Paecilomyces, Penicillium, Piromyces, Schizophyllum, Talaromyces, Thermoascus, Thielavia, Tolypocladium, ou Trichoderma.

Em um aspecto preferido, a variante de lipase é um variante
 5 Saccharomyces carlsbergensis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces
 diastaticus, Saccharomyces douglasii, Saccharomyces kluyveri,
 Saccharomyces norbensis, ou Saccharomyces oviformis. Em uma forma de
 realização preferida, a variante de lipase tem pelo menos 50%, 60%, 70%,
 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da identidade à uma origem
 10 de lipase codificada por um gene derivado/obtido de Saccharomyces
 carlsbergensis, Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces diastaticus,
 Saccharomyces douglasii, Saccharomyces kluyveri, Saccharomyces
 norbensis, ou Saccharomyces oviformis.

A variante de lipase pode ser uma variante de uma origem de
 15 lipase codificada por um gene derivado/obtido a partir de um dos organismos
 de origem seguintes: 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
 20 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
 25 insolens, Thermomyces lanuginosus (sinônimo: Humicola lanuginose), Mucor
 miehei, Myceliophthora thermophila, Neurospora crassa, Penicillium
 purpurogenum, Trichoderma harzianum, Trichoderma koningii, Trichoderma
 longibrachiatum, Trichoderma reesei, ou Trichoderma viride. Em uma forma
 de realização preferida, a variante de lipase tem pelo menos 50%, 60%, 70%,

80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da identidade á uma origem de lipase codificada por um gene derivado/obtido a partir de um dos organismos de origem seguintes: *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* (sinônimo: *Humicola lanuginose*), *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* ou *Trichoderma viride*.

Em um outro aspecto preferido, a variante é uma variante de uma lipase *Thermomyces*.

Em um aspecto mais preferido, a origem de lipase é uma lipase de *Thermomyces lanuginosus*. Em uma forma de realização ainda mais preferida a origem de lipase é a lipase da SEQ ID N°: 2.

Identificação de regiões e substituições

As posições referidas em uma Região I através da Região IV abaixo são as posições dos resíduos de aminoácido na SEQ ID N°:2. Para observar as posições correspondentes (ou homólogas) em uma lipase diferente, o procedimento descrito em “Homologia e alinhamento” é usado.

Substituições na Região I

A Região I consiste de resíduos de aminoácidos adjacentes ao resíduo E1 do terminal N. Nesta região, é preferido substituir um aminoácido de uma origem de lipase com um aminoácido mais positivo. A variante de

lipase pode compreender pelo menos duas substituições na Região I, tal como três, quatro, cinco ou seis substituições na Região I.

Os resíduos de aminoácidos correspondentes às posições seguintes são compreendidos pela Região I: 1, 2 a 11 e 223 a 239. As posições seguintes são de interesse particular: 1, 4, 8, 11, 223, 227, 229, 231, 233, 234, 236.

Em particular as substituições seguintes foram identificadas: X1N/* X4V, X227G, X231R e X233R.

Em uma forma de realização preferida a variante de lipase tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% da identidade da SEQ ID N^o:2

Em uma forma de realização mais preferida a variante de lipase é uma variante de lipase tendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID N^o: 2.

15 Substituições na Região II

A Região II consiste de resíduos de aminoácidos em contato com substrato em uma cadeia de acila secundária e uma parte de álcool secundário. Nesta região é preferido substituir um aminoácido de uma origem de lipase com um aminoácido mais positivo ou com um aminoácido menos hidrofóbico.

A variante de lipase pode compreender pelo menos uma substituição na região tal como duas, três, quatro, cinco ou seis substituições na Região II.

Os resíduos de aminoácidos correspondentes às posições seguintes são compreendidos pela Região II: 202 a 211 e 249 a 269. As posições seguintes são de interesse particular: 202, 210, 211, 253, 254, 255, 256.

Em particular as substituições seguintes foram identificadas: X202G, X210K/W/A, X255Y/V/A e X256K/R e X259G/M/Q/V.

Em uma forma de realização preferida a variante de lipase tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da identidade da SEQ ID N°:2

5 Em uma forma de realização mais preferida a variante de lipase é uma variante de lipase tendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID N°: 2.

Substituições na Região III

10 A Região III consiste de resíduos de aminoácidos que formam uma estrutura flexível e deste modo permitem o substrato conseguir um local ativo. Nesta região é preferido substituir um aminoácido de uma origem de lipase com um aminoácido mais positivo ou um aminoácido menos hidrofóbico.

15 A variante de lipase pode compreender pelo menos uma substituição na região III, tal como duas, três, quatro, cinco ou seis substituições na Região III.

Os resíduos de aminoácidos correspondentes às posições seguintes são compreendidos pela Região III: 82 a 102. As posições seguintes são de interesse particular: 83, 86, 87, 90, 91, 95, 96, 99.

20 Em particular as substituições seguintes foram identificadas: X83T, X86V e X90A/R.

Em uma forma de realização preferida a variante de lipase tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da identidade da SEQ ID N°:2

25 Em uma forma de realização mais preferida a variante de lipase é uma variante de lipase tendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID N°: 2.

Substituições na Região IV

A Região IV consiste de resíduos de aminoácido que ligam-se eletrostaticamente à superfície. Nesta região é preferido substituir um

aminoácido de uma origem de lipase com um aminoácido mais positivo.

A variante de lipase pode compreender pelo menos uma substituição na região IV, tal como duas, três, quatro, cinco ou seis substituições na Região IV.

5 Os resíduos de aminoácidos correspondentes às posições seguintes são compreendidos pela Região IV: 27 e 54 a 62. As posições seguintes são de interesse particular: 27, 56, 57, 58, 60.

Em particular as substituições seguintes foram identificadas: X27R, X58N/AG/T/P e X60V/S/G/N/R/K/A/L.

10 Em uma forma de realização preferida a variante de lipase tem pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% da identidade da SEQ ID NQ:2

Em uma forma de realização mais preferida a variante de lipase é uma variante de lipase tendo a seqüência de aminoácido da SEQ ID N°: 2.

Aminoácidos em outras posições

A origem de lipase pode opcionalmente compreender alterações adicionais, por exemplo, substituição de outro aminoácido, particularmente menos do que 10, menos do que 9, menos do que 8, menos do que 7, menos do que 6, menos do que 5 alterações como comparados à uma origem de lipase. Os exemplos são substituições correspondentes de uma ou mais posições 24, 37, 38, 46, 74, 81, 83, 115, 127, 131, 137, 143, 147, 150, 199, 200, 203, 206, 211, 263, 264, 265, 267 e 269 da origem de lipase. Em uma forma de realização particular aqui é uma substituição de pelo menos uma da posição correspondente à posição 81, 147, 150, 227 e 249. Em uma forma de realização preferida pelo menos uma substituição é selecionada do grupo que consiste de X38R, X81Q/E, X143S/C/N/D/A, X147M/Y, X150G/K, X227G e X249R/I/L.

A variante pode compreender substituições fora da Região I a

IV definida; o número de substituições fora da Região I a IV definida é preferivelmente menos do que seis, tal como cinco, quatro, três, duas ou uma substituição.

5 As substituições adicionais podem, por exemplo, ser feitas de acordo com o princípio conhecido na técnica, por exemplo, substituições descritas em WO 92/05249, WO 94/25577, WO 95/22615, WO 97/04079 e WO 97/07202.

Origem de variantes de lipase

10 As variantes de lipases incluem origem de lipases tendo as substituições listadas na tabela 1 abaixo (usando SEQ ID N°: 2 para numeração).

Tabela 1

Região I	Região II	Região III	Região IV	Regiões externas
X4V + X227G + X231R + X233R	X210K + X256K	X83T + X86V	X58A + X60S	X150G
X227G + X231R + X233R	X256K	X86V	X58N + X60S	X150G
X231R + X233R	X255Y			
X231R + X233R	X202G			
X227G + X231R + X233R	X256K	X86V		
X4V + X231R + X233R			X58N + X60S	
X231R + X233R		X90R	X58N + X60S	
X231R + X233R	X255V	X90A		
X227G + X231R + X233R	X256K	X86V	X58N + X60S	X150G
X231R + X233R	X211L		X58N + X60S	X147M
X231R + X233R				X150K

Em uma outra forma de realização particular, a origem de lipase é idêntica à SEQ ID N°:2, e as variantes da Tabela 1 serão deste modo:

Tabela 2: Algumas das variantes particulares da SEQ ID N°:2

Região I	Região II	Região III	Região IV	Regiões externas
Q4V + L227G + T231R + N233R	E210K + P256K	S83T + I86V	S58A + V60S	A150G
L227G + T231R + N233R	P256K	I86V	S58N + V60S	A150G
T231R + N233R	I255Y			
T231R + N233R	I202G			
L227G + T231R + N233R	P256K	I86V		
Q4V + T231R + N233R			S58N + V60S	
T231R + N233R		I90R	S58N + V60S	
T231R + N233R	I255V	I90A		
L227G + T231R + N233R	P256K	I86V	S58N + V60S	A150G
T231R + N233R	F211L		S58N + V60S	L147M
T231R + N233R				A150K

Nomenclatura para modificações de aminoácido

Em descrição as variantes de lipase de acordo com a invenção, a nomenclatura seguinte é usada para facilitar a referência:

5 Aminoácido original (s): posição (s): aminoácido substituído (s)

De acordo com esta nomenclatura, por exemplo a substituição de ácido glutâmico para glicina na posição 195 é mostrada como G195E. A anulação da glicina na mesma posição é mostrada como G195*, e a inserção de um resíduo de aminoácido adicional tal como lisina é mostrada como
10 G195GK.

Onde uma lipase específica contém uma “anulação” em comparação com outras lipases e uma inserção é feita em uma tal posição esta é indicada como *36D para inserção de um ácido aspártico na posição 36.

15 As mutações múltiplas são separadas por sinais de adição, isto é: R170Y+G195E, representando mutações nas posições 170 e 195 de

substituição de tirosina e ácido glutâmico para arginina e glicina, respectivamente.

O X231 indica que o aminoácido em uma origem de polipeptídeo correspondente à posição 231, quando aplica o procedimento de alinhamento descrito. O X231R indica que o aminoácido é substituído com R. Para a SEQ ID N^o: 2 X é T, e X231R deste modo indica uma substituição de T na posição 231 com R. Onde o aminoácido em uma posição (por exemplo, 231) pode ser substituído por um outro aminoácido selecionado a partir de um grupo de aminoácidos, por exemplo, o grupo que consiste de R e P e Y, e será indicado por X231R/P/Y

Em todos os casos, a letra simples IUPAC aceitável ou letra tripla de abreviação de aminoácido é utilizado.

Disposição de aminoácido

Nesta especificação, os aminoácidos são classificados como carga negativa, carga positiva ou eletricamente neutra de acordo com sua carga elétrica em pH 10. Desta maneira, os aminoácidos negativos são E, D, C (cisteína) e Y, particularmente E e D. Os aminoácidos positivos são R, K e H, particularmente R e K. Os aminoácidos neutros são G, A, V, L, I, P, F, W, S, T, M, N, Q e C quando parte de formação de uma ponte de bissulfeto. Uma substituição com um outro aminoácido no mesmo grupo (negativo, positivo ou neutro) é denominado uma substituição conservativa.

Os aminoácidos neutros podem ser divididos em hidrofóbicos ou não polares (G, A, V, L, I, P, F, W e C como partes de uma ponte de bissulfeto) e hidrofílicos ou polares (S, T, M, N, Q).

25 Identidade de aminoácido

A relação entre duas seqüências de aminoácidos ou entre duas seqüências de nucleotídeos é descrita pelo parâmetro de “identidade”.

Para os propósitos da presente invenção, o alinhamento de duas seqüências de aminoácidos é determinada pelo uso do programa de

Needle a partir da embalagem EMBOSS (<http://emboss.org>) versão 2,8,0. Os implementos do programa de Needle, o algoritmo de alinhamento global descrito em Needleman, S. B. e Wunsch, C. D. (1970) *J. Mol. Biol.*, 48, 443-453. A matriz de substituição usada é BLOSUM62, a penalidade de abertura da fenda é 10, a penalidade da extensão da fenda é 0,5.

O grau de identidade entre uma seqüência de aminoácido da presente invenção (“seqüência da invenção”; por exemplo, aminoácidos 1 a 269 da SEQ ID N°:2) e uma seqüência de aminoácido diferente (“seqüência estranha”) é calculada com o número de equiparações exatas em um alinhamento de duas seqüências, dividido pelo comprimento da “seqüência da invenção” ou comprimento da “seqüência estranha”, quaisquer que sejam mais curtas. O resultado é expressado em identidade percentual.

Em equiparações exatas ocorre quando a “seqüência da invenção” e a “seqüência estranha” tem resíduos de aminoácidos idênticos nas mesmas posições do sobreposto. O comprimento de uma seqüência é o número de resíduos de aminoácidos na seqüência (por exemplo, o comprimento da SEQ ID N°:2 é 269).

O procedimento acima pode ser usado pelo cálculo da identidade bem como homologia e por alinhamento. No contexto da presente invenção homologia e alinhamento foram calculados como descrito abaixo.

Homologia e alinhamento

Para os propósitos da presente invenção, o grau de homologia pode ser determinado adequadamente pelo meios de programas de computador conhecidos na técnica, tal como GAP fornecido na embalagem do programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. e Wunsch, C.D., (1970), *Journal of Molecular Biology*, 48, 443-45), usando GAP com os seguintes ajustes para comparação de seqüência de polipeptídeo: A penalidade de criação de

GAP de 3,9 e penalidade de extensão de GAP de 0,1.

Em uma presente invenção, posições correspondentes (ou homólogas) nas seqüências de lipase de *Absidia reflexa*, *Absidia corymbifera*, *Rhizomucor miehei*, *Rhizopus delemar*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubigensis*, *Rusarium oxysporum*, *Rusarium heterosporum*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus* (sinônimo: *Humicola lanuginosa*) e *Landerina penisapora* são definidos pelo alinhamento mostrado na Figura 1.

Para observar as posições homólogas nas seqüências de lipase não mostradas no alinhamento, a seqüência de interesse é alinhado à seqüência mostrada na Figura 1. A nova seqüência é alinhada ao alinhamento presente na Figura 1 pelo uso do alinhamento GAP às seqüências mais homólogas observadas pelo programa GAP. O GAP é fornecido na embalagem do programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. e Wunsch, CD., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-45). Os seguintes ajustes são usados por comparação de seqüência de polipeptídeo: A penalidade de criação de GAP de 3,0 e penalidade de extensão de GAP de 0,1.

20 **Hibridização**

A presente invenção também diz respeito a polipeptídeos isolados tendo atividade de lipase que são codificados por polinucleotídeos que hibridizam-se sob condições de estringência muito baixas, preferivelmente condições de estringência baixas, mais preferivelmente condições de estringência médias, mais preferivelmente condições de estringência média altas, ainda mais preferivelmente condições de estringência altas e mais preferivelmente condições de estringência muito altas (i) nucleotídeos de 178 a 660 da SEQ ID N°: 1, (ii) a seqüência de cDNA contida nos nucleotídeos de 178 a 660 da SEQ ID N°: 1, (iii) uma

subseqüência de (i) ou (ii) ou (iv) um filamento complementar de (i), (ii) ou (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2^o edição, Cold Spring Harbor, New York). Uma subseqüência de SEQ ID N^o: 1 contém pelo menos 100 nucleotídeos contíguos ou preferivelmente pelo menos 200 nucleotídeos contíguos. Além disso, a subseqüência pode codificar um fragmento de polipeptídeo que tem atividade de lipase.

Para sondas longas de pelo menos 100 nucleotídeos de comprimento, as condições de estringência de muito baixa a muito alta são definidas como a pré-hibridização e a hibridização a 42° C em 5X de SSPE, 0,3% de SDS, 200 ug/ml dividido em DNA de esperma de salmão desnaturado e 25% de formamida para estringências muito altas e muito baixas, 35% de formamida para estringências médias e médias-altas ou 50% de formamida para estringências altas e muito altas, seguindo os procedimentos de Southern blotting padrão por 12 a 24 horas otimamente.

Para sondas longas de pelo menos 100 nucleotídeos de comprimento, o material carregador é finalmente lavado três vezes cada por 15 minutos usando-se 2X de SSC, 0,2% de SDS preferivelmente pelo menos a 45° C (estringência muito baixa), mais preferivelmente pelo menos a 50° C (estringência baixa), mais preferivelmente pelo menos a 55° C (estringência média), mais preferivelmente pelo menos a 60° C (estringência média-alta), ainda mais preferivelmente pelo menos a 65° C (estringência alta) e mais preferivelmente pelo menos em 70° C (estringência muito alta).

Seqüência de DNA, Vetor de expressão, Célula hospedeira, Produção de lipase

A invenção fornece uma seqüência de DNA que codifica a lipase da invenção, um vetor de expressão que abriga a seqüência de DNA e uma célula hospedeira transformada contendo a seqüência de DNA ou o vetor de expressão. Estes podem ser obtidos pelos métodos conhecidos na técnica.

A invenção também fornece um método de produzir a lipase pelo cultivo da célula hospedeira transformada sob condições condutoras para a produção da lipase e recuperação da lipase a partir do caldo resultante. O método pode ser praticado de acordo com os princípios conhecidos na técnica.

5 **Atividade de lipase**

Atividade de lipase em tributirina em pH neutro (LU)

Um substrato para lipase é preparado pela emulsificação da tributirina (tributirato de glicerina) usando-se goma Arábica como o emulsificador. A hidrólise de tributirina a 30° C em pH 7 ou 9 é seguida em um experimento de titulação de pH-stat. Uma unidade de atividade de lipase (1 LU) iguala a quantidade de enzima capaz de liberar 1 micro mol de ácido butírico/minuto em pH 7.

Risco Benefício

O fator Risco Benefício que descreve o desempenho comparado com o risco reduzido quanto ao cheiro do odor é definido como: $BR = RP_{avg}/R$, como descrito abaixo.

Usos

As enzimas da presente invenção podem encontrar uso industrial, por exemplo, serem incluídas nas composições de detergente para a remoção de qualquer matéria graxa.

EXEMPLOS

Os produtos químicos usados como tampões e substratos foram os produtos comerciais pelo menos de grau de reagente.

Meios e Soluções

25	<u>Produto</u>	<u>Nome Comercial</u>
	LAS:	Surfac P
	Zeólito A	Wessalith P

Outros ingredientes usados são reagentes de laboratório padrão.

Materiais

Produto Fornecedor

EMPA22I EMPA St. Gallen, Lerchfeldstrasse 5, CH-9014 St. Gallen,
Suíça

5 Exemplo 1

Produção de enzima

Um plasmídeo contendo o gene que codifica a lipase é construído e transformado em uma célula hospedeira adequada usando-se métodos padrão da técnica.

10 A fermentação é realizada como uma fermentação por batelada alimentada usando-se uma temperatura média constante de 34° C em um volume inicial de 1,2 litro. O pH inicial do meio é ajustado a 6,5. Uma vez que o pH aumentou a 7,0 este valor é mantido através da adição de 10% de H₃PO₄. O nível de oxigênio dissolvido no meio é controlado variando-se a
15 taxa de agitação e usando-se uma taxa de aeração fixa de 1,0 litro de ar por litro de meio por minuto. A taxa de adição de alimentação é mantida em um nível constante durante a fase de batelada de alimentação total.

 O meio de batelada contém xarope de maltose como a fonte de carbono, uréia e extrato de levedura como a fonte de nitrogênio e uma mistura
20 de metais e sais traço. A alimentação adicionada de maneira contínua durante a fase de batelada de alimentação contém xarope de maltose visto que o extrato de levedura e uréia é adicionado a fim de garantir um fornecimento suficiente de nitrogênio.

 A purificação da lipase pode ser realizada pelo uso de métodos
25 padrão conhecidos na técnica, por exemplo, pela filtração do sobrenadante de fermentação e cromatografia hidrofóbica e cromatografia trocadora de íon, por exemplo, como descrito no EP 0 851 913 EP, Exemplo 3.

Exemplo 2

AMSA – Ensaio de Tensão Mecânica Automatizada – para o cálculo de

Desempenho Relativo (RP)

As enzimas variantes do presente pedido são testados usando-se o Ensaio de Tensão Mecânica Automatizado (AMSA). com o teste AMSA o desempenho de lavagem de uma grande quantidade de soluções de enzima-detergente de volume pequeno pode ser examinado. A placa AMSA têm diversas fendas para as soluções de teste e uma tampa que comprime firmemente a amostra de tecido a ser lavada contra todas as aberturas de fenda. Durante o período de lavagem, a placa, as soluções de teste, os têxteis e a tampa são vigorosamente agitados para colocar a solução de teste em contato com o têxtil e aplicar tensão mecânica. Para a descrição adicional ver, WO 02/42740 especialmente o parágrafo “Formas de realização de método especiais” nas páginas 23-24. Os recipientes que contém a solução de teste de detergente, consistem de orifícios cilíndricos (6 mm de diâmetro, 10 mm de profundidade) em uma placa metálica. O tecido tingido (material de teste) está na parte superior das placas metálicas e é usado como uma tampa e sela os recipientes. Uma outra placa metálica está no topo do tecido tingido para evitar qualquer derramamento de cada recipiente. As duas placas metálicas juntas com o tecido tingido são submetidos à vibração para cima e para baixo em uma frequência de 30 Hz com uma amplitude de 2 mm.

O ensaio é conduzido sob as condições experimentais especificadas abaixo:

Tabela 3

Solução de teste	0,5 g/l de LAS 0,52 g/l de Na ₂ CO ₃ 1,07 g/l de Zeólito A 0,52 g/l de Na ₃ Citrato
Volume de solução de teste	160 micro l
PH	Como é (≈9,9)
Tempo de lavagem	20 minutos
Temperatura	30° C
Dureza da água	15° dH Taxa de Ca ²⁺ /Mg ²⁺ /NaCO ₃ : 4:1:7,5
Concentração de enzima na solução de teste	0,125, 0,25, 0,50, 1,0 mg ep/ l
Secagem	Desempenho de lavagem: Após a lavagem, os pedaços de têxteis são imediatamente pulverizados em água de torneira e secado ao

	ar a 85° C em 5 minutos Odor: Após a lavagem, os pedaços de têxteis são imediatamente pulverizados em água de torneira e secados em temperatura ambiente (20° C) por 2 horas
Material de teste	Amostras turméricas creme como descrito abaixo (EMPA221 usado como têxtil de algodão)

As amostras turméricas creme foram preparadas misturando-se 5 g de turmérico (Santa Maria, Denmark) com 100 g de creme (38% de gordura, Aria, Denmark) a 50° C, a mistura foi deixada nesta temperatura por cerca de 20 minutos e filtrada (50° C) para remover quaisquer partículas não dissolvidas. A mistura é esfriada a 20 ° C e amostras de algodão tecidas, EMPA221, foram imersas na mistura creme-turmérica e posteriormente deixadas secar em temperatura ambiente durante a noite e congeladas até o uso. A preparação de amostras creme-turméricas é divulgada na patente WO 2006/125437.

10 O desempenho da amostra variante é medido como a claridade da cor das amostras têxteis lavadas com aquela enzima variante específica. A claridade também pode ser expressada como a intensidade da luz refletida a partir da amostra têxtil quando iluminada com luz branca. Quando o têxtil é tingido, a intensidade da luz refletida é menor, do que aquela de um têxtil limpo.

Portanto, a intensidade da luz refletida pode ser usada para medir o desempenho de lavagem de uma enzima variante.

As medições de cor são feitas com um scanner de leito plano profissional (PFU DL2400pro), que é usado para capturar uma imagem das amostras de tecido lavadas. As varreduras são feitas com uma resolução de 200 dpi e com uma profundidade de cor de saída de 24 bits. A fim de conseguir resultados precisos, o scanner é freqüentemente calibrado com uma alvo IT8 refletivo Kodak.

Para extrair um valor quanto à intensidade de luz a partir das imagens escaneadas, uma aplicação de software projetado especial é usada

(Novozymes Color Vector Analyzer). O programa recupera os valores de pixel de 24 bits a partir da imagem e os converte em valores para vermelho, verde e azul (RGB). O valor de intensidade (Int) é calculado pela adição dos valores RGB junto como vetores e então tomando-se o comprimento do vetor resultante:

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

O desempenho de lavagem (P) das variantes é calculado de acordo com a fórmula abaixo:

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

onde

Int(v) é o valor de intensidade de luz da superfície têxtil lavada com enzima e

Int(r) é o valor de intensidade de luz da superfície têxtil lavada sem a enzima.

Um registro de desempenho relativo é dado como o resultado da lavagem AMSA de acordo com a definição:

Os registros de desempenho relativo (RP) são somados aos desempenhos (P) das variantes de enzima testadas contra a enzima de referência:

$$RP = P(\text{enzima de teste})/P(\text{enzima de referência}).$$

RPavg indica o desempenho médio relativo em comparação com a enzima de referência em todas as três concentrações de enzima (0,125, 0,25, 0,5, 1,0 mg ep/l)

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

Uma variante é considerada apresentar desempenho de lavagem melhorado, se esta tiver desempenho melhor do que a referência.

No contexto da presente invenção, a enzima de referência é a parte madura da SEQ ID N^o:2 com as substituições T231R + N233R.

25 Exemplo 3

GC – Cromatografia a Gás – para o cálculo do fator de risco

A liberação de ácido butírico das amostras lavadas com lipase foram medidas pela Cromatografia Gasosa de Micro Extração de Fase Sólida (SPME-GC) usando-se o seguinte método. Quatro pedaços têxteis (5 mm de diâmetro), lavados na solução especificada na Tabela 1 contendo 1 mg/l de lipase, foram transferidos a um frasco de Cromatografia Gasosa (GC). As amostras foram analisadas em um Varian 3800 GC equipado com uma coluna Stabilwax- DA w/integra-Guard (30 m, 0,32 mm de ID e 0,25 micro-m df) e uma fibra Carboxen PDMS SPME (75 micro-m). Cada amostra foi pré-incubada por 10 minutos a 40° C seguido por 20 minutos de amostragem com a fibra de SPME no espaço superior sobre os pedaços têxteis. A amostra foi subsequente injetada na coluna (temperatura do injetor = 250° C). Fluxo da coluna = 2 ml de Hélio/min. Gradiente de temperatura do forno de coluna: 0 min = 40° C, 2 min = 40° C, 22 min = 240° C, 32 min = 240° C. O ácido butírico foi detectado pela detecção FID e a quantidade de ácido butírico foi calculada com base em uma curva padrão de ácido butírico.

O Odor do Desempenho de Risco, R, de uma variante de lipase está entre a quantidade de ácido butírico da amostra de tecido lavada com a variante de lipase e a quantidade de ácido butírico de uma amostra lavada com a parte madura da lipase da SEQ ID N°: 2, após ambos os valores serem corrigidos para a quantidade de ácido butírico liberado a partir de uma amostra de tecido não lavada com lipase. O risco (R) das variantes é calculado de acordo com a fórmula abaixo:

Odor = medido em micro g de ácido butírico desenvolvido em 1 mg de proteína de enzima / l corrigido para o branco

$$\text{Alfa}_{\text{enzima de teste}} = \text{Odor}_{\text{enzima de teste}} - \text{Branco}$$

$$\text{Alfa}_{\text{enzima de referência}} = \text{Odor}_{\text{enzima de referência}} - \text{Branco}$$

$$R = \text{Alfa}_{\text{enzima de teste}} / \text{Alfa}_{\text{enzima de referência}}$$

Uma variante é considerada apresentar odor reduzido em

comparação com a referência, se o fator R for menor do que 1.

Exemplo 4

Atividade (LU) com relação à absorvância em 280 nm

A atividade de uma lipase com relação à absorvância em 280 nm é determinada pelo seguinte ensaio:

LU/A280:

A atividade da lipase é determinada como descrito acima na seção Atividade de lipase. A absorvância da lipase em 280 nm é medida (A280) e a razão LU/A280 é calculada. O LU/A280 relativo é calculado como o LU/A280 da variante dividida pelo LU/A280 de uma enzima de referência. No contexto da presente invenção a enzima de referência é a lipase da SEQ ID N^o:2 com as substituições T231R + N233R.

Exemplo 5

BR – Risco Benefício

O fator de Risco Benefício que descreve o desempenho em comparação com o risco reduzido para o cheiro do odor é definido desta maneira como:

$$BR = RP_{Avg}/R$$

Uma variante é considerada apresentar desempenho de lavagem melhorado e odor reduzido, se o fator BR for maior do que 1.

Aplicando-se os método acima, os seguintes resultados foram obtidos:

Tabela 4

Variante	Mutações em SEQ ID NO: 2	RP médio (RP _{avg})	BR	LU/A280
1	I202G + T231R + N233R	0,84	1,41	Não 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
Referência	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	Não determinado	850
8	G91A + E99K + T231R, N233R + Q249R + 270H + 271T + 272P + 273S + 274S + 275G + 276R + 277G + 278G	0,13	Não determinado	500

A lipase de referência e as variantes 7 e 8 na Tabela 4 são descritas no WO 2000/060063.

Exemplo 6

BR – Risco Benefício

- 5 O Risco Benefício foi medido para as variantes listadas na Tabela 5. O fator de Risco Benefício foi medido da mesma maneira como descrito no Exemplo 5 e foi observado estar acima de 1 para todas as variantes listadas.

Tabela 5

Variante	Mutações em SEQ ID NO: 2
Referência	T231R + N233R
9	L97V+ T231R+N233R
10	A150G+T231R+N233R
11	I90R+T231R+N233R
12	I202V+T231R+N233R
13	L227G+ T231R+ N233R+ P256K
14	I90A+ T231R+ N233R
15	T231R+N233R+ I255P
16	I90V+I255V+T231R+N233R
17	F211L+ L227G+ T231R+ N233R+ I255L+ P256K
18	S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L
19	S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249I
20	A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
21	K46L+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
22	Q4L+ E43T+ K46I+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
23	Q4L+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
24	K46I+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254L
25	K46L+ S58N+ V60S+ K223I+ T231R+ N233R+ D254I

26	E43T+ K46I+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ Q249L+ D254I
27	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
28	K24R+ K46R+ K74R+ I86V+ K98R+ K127R+ D137K+ A150G+ K223R+ T231R+ N233R
29	S58A+V60A+ I86V+T231R+N233R
30	K24R+ K46R+ S58N+ V60S+ K74R+ I86V+ K98R+ K127R+ D137K+ K223R+ T231R+ N233R
31	S58A+ V60A+ I86V+ A150G+ T231R+ N233R
32	S58N+ V60V+ D62G+ T231R+ N233R
33	Q4V+ S58N+ V60S+ I86V+ T231R+ N233R+ Q249L
34	Q4V+ S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ T231R+ N233R+ I255V
35	Q4V+ S58N+ V60S+ I90A+ A150G+ T231R+ N233R+ I255V
36	Y53A+ S58N+ V60S+ T231R+ N233R+ P256L
37	I202L+ T231R+ N233R+ I255A
38	S58A+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
39	D27R+ S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
40	V60K+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
41	Q4V+ S58A+ V60S+ S83T+ I86V+ A150G+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
42	Q4V+ V60K+ S83T+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
43	D27R+ V60K+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
44	Q4N+ L6S+ S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
45	E1N+ V60K+ I86V+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
46	V60K+ I86V+ A150G+ K223N+ G225S+ T231R+ N233R+ P256K
47	E210V+ T231R+ N233R+ Q249R
48	S58N+ V60S+ E210V+ T231R+ N233R+ Q249R
49	Q4V+ V60K+ I90R+ T231R+ N233R+ I255V
50	Q4V+ V60K+ A150G+ T231R+ N233R
51	V60K+ S83T+ T231R+ N233R
52	V60K+ A150G+ T231R+ N233R+ I255V
53	T231R+ N233G+ D234G
54	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+ Q249R+ P256K
55	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+ I255A+ P256K
56	S58N+ V60S+ I86V+ A150G+ G156R+ E210K+ L227G+ T231R+ N233R+

	I255A+ P256K
57	S58T+ V60K+ I86V+ N94K+ A150G+ E210V+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
58	S58T+ V60K+ I86V+ D102A+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
59	S58T+ V60K+ I86V+ D102A+ A150G+ E210V+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
60	S58T+ V60K+ S83T+ I86V+ N94K+ A150G+ E210V+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
61	S58A+ V60S+ I86V+ T143S+ A150G+ L227G+ T231R+ N233R+ P256K
62	G91S+ D96V+ D254R
63	V60L+ G91M+ T231W+ Q249L
64	T37A+ D96A+ T231R+ N233R+ Q249G
65	E56G+E87D+T231R+N233R+D254A
66	E210K+T231R+N233R
67	D27H+E87Q+D96N+T231R+N233R+D254V
68	F181L+E210V+T231R+N233R
69	D27N+ D96G+ T231R+ N233R
70	D96N+ T231R+ N233R
71	T231R+ N233R+ D234G
72	S58K+ V60L+ E210V+ Q249R
73	S58H+ V60L+ E210V+ Q249R
74	Q4V+ F55V+ I86V+ T231R+ N233R+ I255V
75	Q4V+ S58T+ V60K+ T199L+ N200A+ E210K+ T231R+ N233R+ I255A+ P256K
76	Q4V+ D27N+ V60K+ T231R+ N233R
77	I90F+ I202P+ T231R+ N233R+ I255L
78	S58N+ V60S+ D158N+ T231R+ N233R
79	S58N+ V60S+ S115K+ T231R+ N233R
80	S58N+ V60S+ L147M+ A150G+ F211L+ T231R+ N233R
81	V60K+ A150G+ T231R+ N233R
82	I90V+L227G+T231R+N233R+ P256K
83	T231R+N233R+ I255S
84	I86G+ T231R+ N233R
85	V60K+ I202V+ E210K+ T231R+ N233R+ I255A+ P256K
86	I90G+ I202L+ T231R+ N233R+ I255S
87	S58G+ V60G+ T231R+ N233R

A lipase de referência é descrita no WO 2000/060063.

REIVINDICAÇÕES

1. Variante de uma lipase precursora mostrada na SEQ ID NO:

2, caracterizada pelo fato de que a variante compreende um conjunto de substituições selecionadas do seguinte grupo:

- 5 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
 10 f) I90A + T231R + 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 +
 15 L227G + T231R + N233R + P256K
 j) S58N + V60S + I86V + A150G + L227G + T231R + N233R
 + P256K

e em que a variante tem atividade de lipase.

20 2. Sequência de DNA, caracterizada pelo fato de que codifica
 a variante de lipase como definida na reivindicação 1.

3. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que abriga a
 sequência de DNA como definida na reivindicação 2.

4. Microrganismo transgênico, caracterizada pelo fato de que é
 transformado com a sequência de DNA como definida na reivindicação 2.

25 5. Método de produzir uma variante de lipase, caracterizado
 pelo fato de que o método compreende cultivar o microrganismo transgênico
 transformado como definido na reivindicação 4 sob condições condutoras
 para a produção da variante de lipase e recuperação da variante de lipase a
 partir do caldo resultante.

```

ID NO 1:  SSSSTQDRIASEAEITTAHTFYALSAANA
ID NO 2:  SSSSTQDRIASEAEITTAHTFYALSAANA
ID NO 3:  SILGGIRAAAPQEIINELNYTTLSAAS
ID NO 4:  SASDGGHVAATTAQIQEFTKIAGIATA
ID NO 5:  TACHALAASTQ QISEDLNYSYL VEMMPTISQAA
ID NO 6:  TACHALAASTQ QISEDLNYSYL VEMMPTISQAA
ID NO 7:  AVGVTTIDSGEPEFYIQIGAAA
ID NO 8:  TVSTQDLSENEEFYLGIRAAA
ID NO 9:  DLEPTQLRDTFFFWQYAAAT
ID NO 10:  EWTSELDQEEFFWVQYAAAG
ID NO 11:  SVSTSLDELQLLRQNSAAA
ID NO 12:  SVSTSLDELQLLRQNSAAA
ID NO 13:  DWSCILLRMLGLRATYCPAA
ID NO 14:  EWSQILFWLWELFAQNSPAA
ID NO 15:  RMLANTCHALLVXYATTWGLA

ID NO 1:  YCSTVIFG  GNSCPDCEVAS  HLNQITKIPST  LIIDENWLVAV
ID NO 2:  YCSTVIFG  GNSCPDCEVAP  HLNQITKIPST  LIIDENWLVAV
ID NO 3:  YCSTVIFG  MWDGCHNCDAE  DLEIIRYWT  LIYENHFWAR
ID NO 4:  YCSTVIFG  NNSDQVQCGRWV  DSKLIITFTS  LLSDTNWFVR
ID NO 5:  YALLCHIPST  IINGENIYNSQIDENWILR
ID NO 6:  YALLCHIPST  IINGENIYNSQIDENWILR
ID NO 7:  YC NSEAAA  ASKITQCSNOCCTQCGERTIVTSP  VCSERIGEGEVAT
ID NO 8:  YC NENTAV  GKEWICSAGMCPDIEIHALIVGCV  VQYTRIGAYVAT
ID NO 9:  YCPNMYVAK  GSKLBCVVMCPDVEAGSTVILEPS  EDITIGRQFVAV
ID NO 10:  YHEADYTAQ  GSKLCCSNMCPVEATQRTVSDFS  DSTITDTATTAV
ID NO 11:  YCSMID SK  DSHLTCMPCPVEEASTTWLLEDFLINDFCGTLGFLAA
ID NO 12:  YCSMID SD  DSNVTCMPCPVEEASTTWLLEDFLINDFCGTLGFLAA
ID NO 13:  YCGRHLN ST  GFWLTCVSNCLVRAASTQSLDSETHSSRYNOMRATLAA
ID NO 14:  YCRHNSRA  GTHLPTQMLCREVEMDAPFLYSF  DSGVQDVKGLAL
ID NO 15:  YCTDANRAS  RTVPEHTLIGSTP  HLENSGNYIAF

ID NO 1:  GEMKTIIVV  FPGFSIEMA  IADIVFVEM  YPFV  NGA  IYHROFIDSY
ID NO 2:  GEMKTIIVV  FPGFSIEMA  IADIVFVEM  YPFV  NGA  IYHROFIDSY
ID NO 3:  GDSKTIIVV  FPGGSIEMW  IADLTFVEM  YPFV  SGT  IYHROFIDSY
ID NO 4:  SERKTIIVV  FPGHSEMA  IEDIVFVEM  YPFV  NGA  IYHROFIDSY
ID NO 5:  DDSKTIIVV  FPGFSIEM  QADIVFVEM  STPLDQNGC  EVHGGYIEM
ID NO 6:  DCSKTIIVV  FPGFSIEM  QADIVFVEM  STPLDQNGC  EVHGGYIEM
ID NO 7:  DSAPREIVS  FPGSINTRW  LKHLDF  Q  DQSL  VSOC  GVRSGFQEM
ID NO 8:  ENAPREIVS  FPGSINTRW  ITHNDF  Q  TQSL  VQCC  GYHGFQEM
ID NO 9:  LKTHFIVVA  FPGSINTRW  VIDATF  Q  DQSL  CQCC  KAEFGFQEM
ID NO 10:  LKTHFIVVA  FPGSINTRW  VADATF  HT  DQSL  CQCC  LAELGFQEM
ID NO 11:  LKTHFIVVA  FPGSINTRW  IAKLFILED  HEDL  CQCC  IYHGFQEM
ID NO 12:  LKTHFIVVA  FPGSINTRW  IAKLFILED  HEDL  CQCC  IYHGFQEM
ID NO 13:  DETHKLVLS  FPGSINTRW  VANLDFLED  HEDL  CSOC  EVHGGFQEM
ID NO 14:  DETHKLVLS  FPGSINTRW  IYHGFQEM  INDI  CSOC  RSDGFTSEM
ID NO 15:  NELCREITVA  YRSTISLAW  IYHGFQEM  WGAN  ISMR  EVHGGFQEM

ID NO 1:  NEVQDLVAB  VYQLEHNEG  YKIVVGHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 2:  NEVQDLVAB  VYQLEHNEG  YKIVVGHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 3:  GEVQDLVAT  VLDQFQYES  YKIVVGHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 4:  EGVVGHTEPV  VQDQTAHPT  YKIVVGHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 5:  VEVDQVESL  VQDQVQD  YALVTVGHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 6:  ISVDQVESL  VQDQVQD  YALVTVGHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 7:  NEISSQATAR  VASAKANDS  ENVISTGHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 8:  EVVAVVRA  VSAKANT  FKFVTVGHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 9:  FVVDKTIK  DDELDFHSD  YKIVVGHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 10:  FLVDFITK  LKTHFIVVA  YKIVVGHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 11:  EAADELTK  IYHGFQEM  YLTVFTHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 12:  EAADELTK  IYHGFQEM  YLTVFTHSL  GCAVAVLSALDLYHONH
ID NO 13:  SELATITK  VESALDLYHONH  YLTVFTHSL  GCAVAVLSALDLYHONH

```

Figura 1

ID NO 14: RQVADTLRQK WEDAVRSHPD TRVVFTGHSL GCALATVRCADLLGNGY
 ID NO 15: LVRKQGVQGEA VDCILLAWCHD RTISFTGHSL GCALACISWVDRQGRHEGI

ID NO 1: NIEIYTCG QPRIGTPEFA MYVIGT KIPYKALVNERDIVEPML
 ID NO 2: NIEIYTCG QPRIGTPEFA MYVIGT KIPYKALVNERDIVEPML
 ID NO 3: SCHLFLYTCG QPRVGHSAFA NYVFT GEPYKALVNERDIVEPML
 ID NO 4: SYLISITVQ QPRVGHSAFA YVVEFT GIPYKALVNERDIVEPML
 ID NO 5: NIEIYTCG EPKQHQAF A SMDLAFQASSMFTTQYFRVTHAELGIML
 ID NO 6: NIEIYTCG EPKQ HQAF A SMDLAFQASSMFTTQYFRVTHAELGIML
 ID NO 7: EPEIYTCG EPVCHACLS RYVSHQ AGGELVTHAEDFVPL
 ID NO 8: EPEIYTCG EPVCHACLS RYVSHQ TQELVTHAEDFVPL
 ID NO 9: DAILYATA EPVCHACLS EPIYHQ GNYIYTHAEDFVPL
 ID NO 10: SAILYATA EPVCHACLS EPIYHQ GNYIYTHAEDFVPL
 ID NO 11: SVELYTCG QPRIGTPEFA EPIYHQ GQAMPTVTHAEDFVPL
 ID NO 12: SVELYTCG QPRIGTPEFA EPIYHQ GQAMPTVTHAEDFVPL
 ID NO 13: SVELYTCG QPRIGTPEFA EPIYHQ GQAMPTVTHAEDFVPL
 ID NO 14: SVELYTCG QPRIGTPEFA EPIYHQ GQAMPTVTHAEDFVPL
 ID NO 15: SVELYTCG QPRIGTPEFA EPIYHQ GQAMPTVTHAEDFVPL

ID NO 1: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 2: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 3: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 4: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 5: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 6: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 7: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 8: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 9: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 10: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 11: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 12: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 13: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 14: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV
 ID NO 15: PPRAGFLHA GEPWIKK DCLAVCHNGIETLSCSNSTV

ID NO 1: PPT SVIHLSTYLDANTCL CL
 ID NO 2: PPT SVIHLSTYLDANTCL CL
 ID NO 3: PPT SVIHLSTYLDANTCL CL
 ID NO 4: PPT SVIHLSTYLDANTCL CL
 ID NO 5: VS NAHTTYE QMISCHOTW
 ID NO 6: VS NAHTTYE QMISCHOTW
 ID NO 7: GL DIPAHLYE QMISCHOTW
 ID NO 8: GL DIPAHLYE QMISCHOTW
 ID NO 9: GLEDELLAFHSHVWTFIHAIDWONGDPLPL
 ID NO 10: LEMLANPEAHNIWYF VQVDA QWDEPLPK R
 ID NO 11: TV SVLAHLWYF FAISE OLE
 ID NO 12: TV SVLAHLWYF FAISE OLE
 ID NO 13: GT SIDAHWYF IYISE OS
 ID NO 14: IP DIPAHLYE QMISCHOTW
 ID NO 15: PSEL NAHTTYE QMISCHOTW

ID NO:	Microorganismo	SEQ ID NO.:
1.	<i>Absidia reflexa</i>	3
2.	<i>Absidia corymbifera</i>	4
3.	<i>Rhizomucor miehei</i>	5
4.	<i>Rhizopus delemar (oryzea)</i>	6
5.	<i>Aspergillus niger</i>	7
6.	<i>Aspergillus tubingensis</i>	8
7.	<i>Fusarium oxysporum</i>	9
8.	<i>Fusarium heterosporum</i>	10
9.	<i>Aspergillus oryzae</i>	11
10.	<i>Penicillium camembertii</i>	12

Figura 1 (Cont.)

11.	<i>Aspergillus foetidus</i>	13
12.	<i>Aspergillus niger</i>	14
13.	<i>Aspergillus oryzae</i>	15
14.	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	2
15.	<i>Landerina penisapora</i>	16

Figura 1. Alinhamento das seqüências de lipase.

Figura 1 (Cont.)