



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 345 973**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01401855 .0**

96 Fecha de presentación : **11.07.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1275711**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.01.2003**

54 Título: **Lipasa/aciltransferasa a partir de *Candida parapsilosis*.**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.10.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.10.2010

73 Titular/es: **Cognis IP Management GmbH**
Henkelstrasse 67
40589 Düsseldorf, DE

72 Inventor/es: **Dubreucq, Eric;**
Bigey, Frederic;
Moulin, Guy y
Weiss, Albrecht

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 345 973 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

Lipasa/aciltransferasa a partir de *Candida parapsilosis*.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a polipéptidos con actividad de lipasa/aciltransferasa, a secuencias de aminoácidos de polipéptidos, que muestran esta actividad, a ácidos nucleicos (genes), que codifican estos polipéptidos, a vectores, que contienen aquellos ácidos nucleicos, que codifican estos polipéptidos, a microorganismos transformados, que contienen estos ácidos nucleicos, a procedimientos para llevar a cabo la obtención de estos polipéptidos así como al empleo de ácidos nucleicos para encontrar nuevas lipasas/aciltransferasas y al empleo de estas lipasas/aciltransferasas como catalizadores en procedimientos químicos y bioquímicos.

Estado de la técnica

Con ocasión de la esterificación, según los métodos usuales de la síntesis química, puede producirse, por un lado, la formación de mezclas constituidas por productos monosustituidos y polisustituidos, como consecuencia de la presencia de varios grupos hidroxilo libres en el componente alcohólico o en un éster parcial del mismo de tal manera, que se requiere la introducción y la eliminación de grupos protectores cuando quiere llevarse a cabo la síntesis específica de un compuesto determinado.

Con ayuda del empleo de derivados activados de ácidos carboxílicos se forman productos acompañantes y, con frecuencia, también productos secundarios no deseados, que dificultan la elaboración, reducen los rendimientos en producto deseado y constituyen una carga para el medio ambiente. Estos inconvenientes pueden evitarse o, al menos, pueden reducirse si se lleva a cabo la obtención por vía enzimática (por ejemplo de conformidad con el procedimiento que ha sido descrito en la solicitud alemana DE 197 53 789.8).

Los enzimas son empleados, cada vez en mayor medida, en las síntesis químicas y bioquímicas, a título de catalizadores. De este modo, son empleadas ya las hidrolasas en procedimientos a escala industrial, especialmente las lipasas (EC 3.1.1.3) en muchos casos, como consecuencia de que las condiciones de la reacción son frecuentemente suaves, para llevar a cabo la disociación de grasas.

Los procedimientos enzimáticos adecuados para llevar a cabo la esterificación o la transesterificación están descritos, por ejemplo, en la publicación de los autores K. Drazuz y H. Waldmann, *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*, VCH-Verlag, Weinheim 1975.

Se sabe que la transesterificación es catalizada en medios anhidros por medio de lipasas. Cuando en el sistema de reacción de ésteres, alcohol y lipasas esté presente también el agua, se produce normalmente una disociación de los ácidos grasos enlazados para dar ácidos grasos libres. Puesto que diversas lipasas catalizan también la formación de ésteres a partir de ácidos grasos libres y de alcoholes, se lleva a cabo como efecto final una reacción de transesterificación con un producto intermedio ácido. Desde luego, para muchos procesos industriales constituye un gran inconveniente la formación de ácidos libres en el sistema. El contenido en agua impide parcialmente una reacción industrial y comercialmente aceptable (formación de un equilibrio termodinámico desfavorable). Para conseguir rendimientos satisfactorios tienen que ser empleadas costosas instalaciones industriales (eliminación del agua por ejemplo por medio de una destilación azeotrópica, procedimientos de separación por medio de membranas, destilación en vacío).

En la literatura ha sido descrito ya un polipéptido, que es único en su género hasta el presente, que presenta actividad de lipasa/aciltransferasa. Este polipéptido fue aislado a partir del microorganismo *Candida parapsilosis* CBS 604. Sin embargo, hasta el presente sólo se ha llevado a cabo la evaluación, exclusivamente, de la capacidad de reacción de este polipéptido. Es posible con el polipéptido procedente del microorganismo *Candida parapsilosis*, que presenta tanto propiedades de lipasa así como también propiedades de aciltransferasa, mantener en un nivel muy bajo los productos intermedios de un ácido (graso) libre incluso en presencia de agua (con una actividad > 0,8). Al mismo tiempo puede mantenerse controlado el coste industrial. (Véase la publicación de los autores L. Vaysse, E. Dubreucq, J.-L. Pirat, P. Galzy; *J. Biotech.* 53 (1997) 41-46).

El inconveniente de las reacciones catalizadas por vía enzimática reside frecuentemente en la disponibilidad y en la estabilidad de los polipéptidos.

60 Descripción de la invención

La tarea de la presente solicitud de patente consistía en caracterizar y en proporcionar aquellos polipéptidos, que posibiliten una transferencia de grupos acilo con elevados rendimientos incluso en un medio acuoso y que, por lo tanto, venzan los inconvenientes tradicionales que se presentan en el caso de una esterificación catalizada por medio de lipasas.

Por lo tanto, la tarea de la presente solicitud de patente consistía en aislar estos polipéptidos, en descifrar la secuencia de aminoácidos y la secuencia de nucleótidos, que codifica esta secuencia de aminoácidos, puesto que

ES 2 345 973 T3

éstas son imprescindibles tanto para la obtención por bioingeniería así como también para el desarrollo ulterior del polipéptido.

5 Otra tarea parcial consistía en posibilitar la producción por bioingeniería de las lipasas/aciltransferasas encontradas y de este modo proporcionar rendimientos elevados y conseguir entonces la posibilidad de encontrar organismos alternativos por medio de una selección de las homologías de secuencia. Por lo tanto, estaba incluido en esta tarea el hecho de proporcionar células huésped transformadas, que fuesen capaces de producir este polipéptido.

10 En el sentido de la presente solicitud, se entiende por polipéptido aquel polímero compuesto por aminoácidos naturales, estructurado de forma ampliamente lineal, que adquiere, en la mayoría de los casos, una estructura tridimensional para ejercer su función. En la presente solicitud están denominados los 19 L-aminoácidos proteinógenos, que se encuentran en la naturaleza, con el código internacional usual formado por 1 y 3 letras. Otra denominación también es la de proteína, debiéndose dar una limitación del número de unidades monómeras en el polipéptido de 50 como mínimo.

15 En el sentido de la invención se entiende por “actividad de lipasa/aciltransferasa” la actividad de un polipéptido o de un enzima, que reúne las propiedades de las lipasas con las propiedades de las aciltransferasas. Las *lipasas* (EC 3.1.1.3) pertenecen al grupo de las hidrolasas (especial de las esterasas), que disocian de forma específica a las grasas (triglicéridos) en glicerina y en ácidos grasos; este proceso, que se denomina lipólisis, se produce en la interfase comprendida entre la grasa y el agua. Una propiedad importante, que conduce a la inclusión en el grupo de las hidrolasas, consiste en la actividad tensioactiva de las lipasas. Juega un papel en la catálisis una triada catalítica constituida por la serina, la histidina y el ácido asparagínico (o ácido glutamínico). Las *aciltransferasas* (EC 2.3) se denominan también transacilasas y pertenecen al grupo de las transferasas. Éstas transfieren de una manera muy general grupos acilo o, de manera especial, grupos acetilo desde una molécula donante hasta una molécula aceptora y, por lo tanto, son especialmente importantes para la formación y para la degradación de grasas. Se ha observado por medio de estudios realizados con las *lipasas/aciltransferasas* de conformidad con la invención, que este polipéptido es tensioactivo y que cataliza aquellas reacciones, que son características de la lipasas. Así mismo se ha encontrado que este polipéptido es capaz de catalizar transesterificaciones con un contenido en agua en la mezcla de la reacción, que corresponde a una actividad en agua mayor que 0,8. Con este contenido en agua, una lipasa tradicional catalizaría únicamente la hidrólisis del éster. Por lo tanto, se trata de un polipéptido que presenta rasgos caracterizantes tanto de las lipasas así como, también, de las aciltransferasas. El polipéptido de origen natural, de conformidad con la invención, está constituido por una lipasa, como consecuencia de homologías de secuencia con respecto a los enzimas conocidos hasta ahora tales como, por ejemplo, las lipasas procedentes de *Candida albicans* y están constituidos por una aciltransferasa como consecuencia de su actividad enzimática.

35 Como donantes preferentes en el sentido de la invención para las reacciones catalíticas con la lipasa/aciltransferasa, de conformidad con la invención, son empleados todos los posibles ésteres, grasas, triglicéridos, 1,3-diglicéridos, 1,2-diglicéridos y 1-monoglicéridos. Como aceptores preferentes en el sentido de la invención para reacciones catalíticas con la lipasa/aciltransferasa, de conformidad con la invención, son empleados alcoholes primarios y secundarios con un hasta cinco átomos de carbono, de manera especial el etanol, el propanol, el butanol, el 1,2-propanodiol, el 1,3-propanodiol, el 2-metil-1-propanol, el 2-metil-1-butanol, el 3-metil-1-butanol y la hidroxilamina.

45 La expresión de “identidad”, que es empleada en este caso con relación a la secuencia de aminoácidos, designa una homología con respecto a la secuencia de aminoácidos dada que conduce a que el polipéptido con una identidad dada tiene la misma actividad biológica que el primer polipéptido. La identidad de la secuencia de nucleótidos se refiere a una primera secuencia de nucleótidos homóloga del gen. Homólogo significa con respecto a la secuencia de nucleótidos, que el gen tiene que ser alélico. Así mismo homólogo significa que el gen procede de otra especie, pero que el polipéptido codificado por este gen tiene la misma actividad biológica que el polipéptido codificado por la primera secuencia de nucleótidos.

50 El objeto de la invención está constituido por polipéptidos con actividad de lipasa/aciltransferasa con una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad del 80% como mínimo, de manera preferente del 98% como mínimo, de manera especialmente preferente del 99,8% y, de manera especial, del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO. 2. Una identidad con respecto a la secuencia de aminoácidos, que está indicada en la SEQ ID NO. 2 de, al menos, el 80%, preferentemente del 96% es especialmente válida para la región parcial, que corresponde a los aminoácidos en las posiciones 190 hasta 390. Un polipéptido, que tiene una identidad del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos, que está indicada en SEQ ID NO. 2, contiene 465 aminoácidos. Es especialmente preferente una identidad del 96% para las regiones parciales en las posiciones 190-200, 220 hasta 290 y 330 hasta 385, de manera especial en las posiciones 196, 240 y 381.

60 La secuencia de aminoácidos del enzima, de conformidad con la invención, está indicada en el protocolo de secuencias bajo la denominación SEQ ID NO. 2. La secuencia de nucleótidos de este enzima está indicada en el protocolo de secuencias bajo la denominación SEQ ID NO. 1. Por lo tanto, está disponible para desarrollos ulteriores por medio de métodos de la biología molecular en sí conocidos.

65 De la misma manera, los polipéptidos comparables con actividad de lipasa/aciltransferasa representan formas preferentes de realización de la presente invención y son reivindicadas en tanto en cuanto presenten secuencias de aminoácidos y/o secuencias de ácidos nucleicos, que se encuentren dentro del intervalo de similitud con respecto a las

ES 2 345 973 T3

secuencias indicadas en la SEQ ID NO. 1 y/o en la SEQ ID NO. 2. Este intervalo de similitud abarca todos aquellos polipéptidos, cuya secuencia de aminoácidos sea idéntica al menos en un 80%, en un 96%, en un 96,5%, en un 97%, en un 97,5%, en un 98%, en un 98,5%, en un 99%, en un 99,5%, en un 99,8% o en un 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID NO. 2. Esto es especialmente válido para la región parcial de la proteína que corresponde a los aminoácidos 190 hasta 390.

Un polipéptido, que tiene una identidad al menos del 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos, que está indicada en la SEQ ID NO. 2, tiene un peso molecular comprendido entre 49 y 55 kD tras la desglicosilación, de manera especial de 54 kD. El óptimo del pH para la reacción catalítica de la transesterificación, la hidrólisis o la esterificación, que se determinó a 28°C, se encuentra comprendido entre 3 y 8,5, de manera preferente entre 4 y 8, de manera especial entre 6 y 7,5.

Un intervalo óptimo de temperaturas en la catálisis de la hidrólisis, determinado en el óptimo del pH, se encuentra comprendido entre 30 y 50°C, de manera preferente entre 35 y 40°C. Un intervalo óptimo de temperaturas para la catálisis de la transesterificación y de la esterificación, determinada en el óptimo del pH, se encuentra comprendido entre 20 y 50°C, de manera preferente entre 20 y 30°C.

A los polipéptidos, de conformidad con la invención, pertenecen también aquellos enzimas, que presentan una similitud suficiente con los mismos o que pueden derivarse con métodos en sí conocidos.

En una forma especial de realización de la invención, se presentan glicosilados los polipéptidos con actividad de lipasa/aciltransferasa, con una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de, al menos, el 80%, de manera preferente de, al menos, el 98%, de manera especialmente preferente del 99,8% y, de manera especial, del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos, que está indicada en la SEQ ID NO. 2. Las posiciones sobre las cuales se presenta glicosilado el polipéptido y el grado de glicosilación dependen del organismo, que produzca este polipéptido. Es preferente un grado de glicosilación comprendido entre 1 y 2 restos sacáricos por molécula de polipéptido.

En otra forma de realización de la invención, los polipéptidos están enlazados con otro polipéptido. Un péptido de este tipo puede estar constituido por un marcador, que pueda conducir, por ejemplo, a que el polipéptido deseado pueda ser purificado de manera más efectiva por medio de una cromatografía, de manera especial por medio de una cromatografía de afinidad. De conformidad con la invención, el otro polipéptido está constituido por el marcador his-tag. El marcador his-tag está constituido por un péptido que está constituido a partir de seis unidades monómeras de histidina.

Una forma especial de realización de la invención corresponde a los polipéptidos con actividad de lipasa/aciltransferasa con una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de, al menos, el 80%, de manera preferente de, al menos, el 98%, de manera especialmente preferente del 99,8% y, de manera especial, del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID NO. 4.

Otra forma preferente de realización de la invención corresponde a fragmentos de polipéptido o a polipéptidos que pueden ser obtenidos por medio de mutación por delección, con una actividad de lipasa/aciltransferasa de conformidad con el polipéptido que ha sido descrito precedentemente.

Se entenderá por *fragmentos* todas aquellas proteínas o todos aquellos péptidos, que sean menores que las proteínas naturales, que sean menores que aquellas proteínas que corresponden a las secuencias SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO. 2 o SEQ ID NO. 3 o SEQ ID NO. 4., pero con las que son homólogas en las correspondientes secuencias parciales, o aquellas que corresponden a genes completamente traducidos y que, por ejemplo, también pueden ser obtenidos por síntesis. Debido a sus secuencias de aminoácidos pueden ser asociados a las correspondientes proteínas completas. Estos fragmentos pueden adquirir, por ejemplo, las mismas estructuras o las mismas actividades proteolíticas o pueden ejercer actividades parciales tales como, por ejemplo, la formación de complejos de un substrato. Los fragmentos y los derivados de delección de las proteínas de partida son en principio equivalentes; mientras que los fragmentos representan trozos más pequeños, en el caso de los mutantes por delección están ausentes sólo pequeñas regiones y, por lo tanto, sólo funciones parciales individuales.

Los fragmentos pueden estar constituidos, por ejemplo, por dominios individuales o por trozos, que no coinciden con los dominios. Tales fragmentos pueden ser preparados de una manera económica, pueden no tener ya determinadas características, eventualmente inconvenientes, de la molécula de partida, tal como posiblemente un mecanismo de regulación reductor de la actividad, o pueden desarrollar un perfil de actividad favorable. Los fragmentos proteicos pueden ser preparados no solamente por vía biosintética, sino también, por ejemplo, por vía química. La síntesis química puede ser ventajosa, por ejemplo, cuando a continuación de la síntesis deban llevarse a cabo modificaciones químicas.

De la misma manera, deben asociarse a los fragmentos los polipéptidos que pueden ser obtenidos por medio de una mutación por delección, como consecuencia de su igualdad en principio. Tales péptidos pueden coincidir ampliamente desde el punto de vista bioquímico con las moléculas de partida o precisamente ya no pueden presentar funciones individuales. Esto se pone de manifiesto, por ejemplo, en el caso de la delección de regiones inhibidoras. Como resultado, con las delecciones pueden producirse tanto una especialización así como también una ampliación del campo de aplicación de la proteína. En tanto en cuanto sea mantenida, modificada, especificada o incluso conseguida por

ES 2 345 973 T3

primera vez una actividad de lipasa/aciltransferasa en el sentido más amplio de la palabra, las variantes de delección así como los fragmentos corresponden a proteínas de conformidad con la invención; la única condición previa adicional a este respecto consiste en que se encuentran dentro del intervalo de similitud indicado con respecto a las secuencias SEQ ID NO. 1 y SEQ ID NO. 2 y SEQ ID NO. 3 y SEQ ID NO. 4 a través de la secuencia parcial homóloga todavía presente.

La mutagénesis por inversión, es decir una inversión parcial de la secuencia puede ser considerada como una forma especial de delección. Lo mismo es válido para un nuevo agrupamiento de diversas partes de la molécula, que se diferencie de la serie original de aminoácidos. Ésta puede ser considerada como variante por delección de la proteína original.

Otra forma de realización de la invención se refiere a derivados de un polipéptido con actividad de lipasa/aciltransferasa de conformidad con uno de los polipéptidos que han sido descritos precedentemente.

En el sentido de la presente solicitud se entiende por *derivados* a aquellos polipéptidos, cuya cadena pura de aminoácidos ha sido químicamente modificada. Tales derivatizaciones pueden llevarse a cabo, por ejemplo, por vía biológica en conexión con la biosíntesis de la proteína por medio del organismo huésped. Con esta finalidad pueden emplearse métodos de la biología molecular. Sin embargo también pueden llevarse a cabo por vía química, por ejemplo por medio de la transformación química de una cadena lateral de un aminoácido o por medio de un enlace covalente de otro compuesto sobre la proteína. En el caso de un compuesto de este tipo puede tratarse, por ejemplo, de otras proteínas, que son enlazadas por ejemplo a través de enlaces químicos bifuncionales sobre polipéptidos de conformidad con la invención. De la misma manera, debe entenderse por derivatización el enlace covalente sobre otro soporte macromolecular. Tales modificaciones pueden influenciar, por ejemplo, la especificidad con respecto al sustrato o la fuerza de enlace sobre el sustrato o pueden provocar un bloqueo pasajero de la actividad enzimática, cuando la sustancia acoplada esté constituida por un inhibidor. Esto puede ser conveniente, por ejemplo, para el período de tiempo correspondiente al almacenamiento. Por lo tanto, otra forma de realización corresponde a aquellos derivados, que han sido obtenidos por medio del enlace covalente sobre un soporte macromolecular, tal como, por ejemplo, el polietilenglicol o un polisacárido.

En el sentido de la presente invención, se reúnen bajo el concepto de polipéptido todos los polipéptidos, enzimas, proteínas, fragmentos y derivados, en tanto en cuanto no requieran ser citados como tales de manera explícita.

La actividad enzimática puede ser modificada de forma cualitativa o de forma cuantitativa por medio de otras regiones del polipéptido, que no participen en la reacción propiamente dicha. Esto se refiere, por ejemplo, a la estabilidad enzimática, a la actividad, a las condiciones de la reacción o a la especificidad con respecto al sustrato. Esto se debe a que, por un lado, no se conocen exactamente que restos de aminoácidos del polipéptido, de conformidad con la invención, catalizan realmente la hidrólisis, la transesterificación y la esterificación, y a que, por otro lado, no puede excluirse en principio de forma definitiva la participación en la catálisis de determinadas funciones individuales. A las funciones auxiliares o a las actividades parciales pertenecen, por ejemplo, el enlace de un sustrato, un producto intermedio o un producto final, la activación o la inhibición o la inducción de un efecto regulador sobre la actividad hidrolítica. En este caso puede tratarse por ejemplo también de la formación de un elemento estructural que se encuentre lejos del centro activo, o se trata de un péptido señal, cuya función se refiere a la segregación de la proteína formada a partir de la célula y/o a su plegamiento correcto y sin el cual no se forma *in vivo*, por regla general, ningún enzima capaz de funcionar. Desde luego debe catalizarse en conjunto una hidrólisis, una transesterificación y una esterificación.

Los polipéptidos, de conformidad con la invención, que proceden de fuentes naturales, son formas preferentes de realización de la presente invención, de manera especial cuando procedan de microorganismos tales como hongos o bacterias monocelulares. Esto se debe a que estos polipéptidos pueden ser manipulados en la mayoría de las ocasiones de una manera más sencilla que los organismos policelulares o que los cultivos celulares derivados de los metazoos. Éstos representan opciones convenientes para formas de realización especiales.

Son especialmente preferentes, de conformidad con la invención, los polipéptidos o los derivados procedentes de hongos eucariotas, especialmente aquellos que puedan desprender directamente en el medio circundante las proteínas secretadas.

Son muy especialmente preferentes de conformidad con la invención los polipéptidos o los derivados que pueden ser obtenidos a partir de microorganismos, que se eligen entre el grupo formado por *Candida parapsilosis* y, de manera preferente, formado por *Candida parapsilosis* CBS 604, *Candida antarctica* (*Trychosporon oryzae*, *Pseudozyma antarctica*) *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Candida tropicalis*, *Candida viswanathii*, *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*), *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefyi*, *C. pseudotropicalis*), *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*), *Geotrichum candidum*, *Fusarium solani* y *Aeromonas aerophila*.

Entre los polipéptidos o derivados, de conformidad con la invención, que proceden de la especie *Candida* son preferentes, a su vez, aquellos que proceden de *Candida parapsilosis*, entre los cuales especialmente los que proceden de *Candida parapsilosis* CBS 604, puesto que han sido obtenidos originalmente a partir del mismo la forma de realización del enzima de conformidad con la invención, cuya secuencias correspondientes están dadas en el protocolo de secuencias.

ES 2 345 973 T3

Son preferentes, por motivos de producción industrial, respectivamente, aquellas cepas que segreguen al medio circundante el polipéptido formado.

Otro objeto de la invención está constituido por ácidos nucleicos, que codifican un polipéptido con actividad de lipasa/aciltransferasa, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica en un 100% con respecto a la secuencia de nucleótidos que está indicada en la SEQ ID NO. 1, especialmente a través de la región parcial, que corresponde a los aminoácidos 190 hasta 390 de conformidad con la SEQ ID NO. 2. Por otra parte, se reivindican ácidos nucleicos, que codifican una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de, al menos, el 80%, de manera preferente del 99,8% y, de manera especial, del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID NO. 2, representando la secuencia de aminoácidos un polipéptido con actividad de lipasa/aciltransferasa. Son preferentes los ácidos nucleicos, que codifican una secuencia de aminoácidos, que es idéntica al menos en un 96% en las posiciones 190 hasta 390, con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID NO. 2, representando la secuencia de aminoácidos un polipéptido con actividad de lipasa/aciltransferasa. Son especialmente preferentes los ácidos nucleicos, que codifican uno de los polipéptidos o derivados que han sido descritos precedentemente. El intervalo de similitud abarca también a todos los polipéptidos, cuya secuencia de nucleótidos sea idéntica al menos en un 85%, en un 87,5%, en un 90%, en un 92,5%, en un 95%, en un 96%, en un 97%, en un 98%, en un 99% o en un 100% con respecto a la secuencia de nucleótidos que ha sido indicada en la SEQ ID NO. 1.

Otro objeto de la invención corresponde a ácidos nucleicos que codifican un polipéptido con actividad de lipasa/aciltransferasa, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica con la secuencia de nucleótidos que está indicada en la SEQ ID NO. 3.

Quedan abarcados en el ámbito de protección los ácidos nucleicos que codifican una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de, al menos, un 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID NO. 4, representando la secuencia de aminoácidos un polipéptido con actividad de lipasa/aciltransferasa. El intervalo de similitud abarca así mismo a todos los polipéptidos, cuya secuencia de nucleótidos sea idéntica al menos en un 85%, en un 87,5%, en un 90%, en un 92,5%, en un 95%, en un 96%, en un 97%, en un 98%, en un 99% o en un 100% con respecto a la secuencia de nucleótidos que está indicada en la SEQ ID NO. 3.

Se entiende por ácidos nucleicos, en el sentido de la presente solicitud, aquellas moléculas que sirven como portadoras de información, que están constituidas de forma natural a partir de nucleótidos, que codifican series lineales de aminoácidos en proteínas o en enzimas. Los ácidos nucleicos pueden presentarse en forma de hebra individual, en forma de una hebra individual complementaria de esta hebra individual o en forma de doble hebra. El ácido nucleico ADN es preferente para los trabajos en biología molecular como portador de información duradero de forma natural. Por el contrario, para la realización de la invención en un medio natural, tal como por ejemplo en una célula de expresión, se forma un ARN, con lo cual las moléculas de ARN esenciales para la invención representan así mismo formas de realización de la presente invención.

En el ADN deben tomarse en consideración las secuencias de ambas hebras complementarias respectivamente en todas las posibles pautas de lectura. Así mismo debe tenerse en consideración que diversos tripletes de codón pueden codificar los mismos aminoácidos de tal manera, que puede derivarse una determinada serie de aminoácidos de varias secuencias de nucleótidos diferentes y que presenten posiblemente sólo una ligera identidad (degeneración del código genético). Así mismo diversos organismos presentan diferencias en cuanto a la utilización de este codón. Por estos motivos deben ser incorporados tanto las secuencias de aminoácidos así como también las secuencias de nucleótidos a la hora de tomar en consideración el ámbito de protección y las secuencias de nucleótidos indicadas deben ser consideradas respectivamente sólo como una codificación tomada como ejemplo para una determinada serie de aminoácidos.

La unidad de información, que corresponde a una proteína, se denomina también como gen en el sentido de la presente solicitud.

Un técnico en la materia tiene la posibilidad de preparar los ácidos nucleicos correspondientes hasta llegar a los genes completos por medio de los métodos conocidos actualmente en general, tales como, por ejemplo, la síntesis química o la reacción en cadena de polimerasa (RCP) en combinación con métodos estándar de la biología molecular y/o de la química de proteínas, por medio de las secuencias conocidas de ADN y/o de aminoácidos. Tales métodos son conocidos, por ejemplo, por la publicación "Lexikon der Biochemie", Spektrum Akademischer Verlag, Berlin, 1999, tomo 1, páginas 267-271 y tomo 2, páginas 227-229.

Se denominan mutaciones a las variaciones de la secuencia de nucleótidos, como las que pueden ser producidas, por ejemplo, por medio de métodos de la biología molecular, en sí conocidos. De conformidad con el tipo de la modificación se conocen, por ejemplo, mutaciones por delección, por inserción o por sustitución o aquellas en las que son fusionados entre sí (shuffling) diversos genes o partes de genes; éstas son mutaciones genéticas. Los organismos correspondientes se denominan mutantes. Las proteínas, que se derivan de los ácidos nucleicos mutados, se denominan variantes. De esta forma, las mutaciones por delección, por inserción, por sustitución o las fusiones conducen, por ejemplo, a genes mutados por delección, por inserción, por sustitución o a genes de fusión y, en el plano de las proteínas, conducen a las correspondientes variantes por delección, por inserción o por sustitución, y respectivamente a las proteínas de fusión.

ES 2 345 973 T3

Otra solución de la tarea de conformidad con la invención representa los organismos, que forman una proteína o un derivado de conformidad con la invención de forma natural o que contienen ácidos nucleicos, que codifican un polipéptido o un derivado de conformidad con la invención. Esto se debe a que su descubrimiento posibilita la implementación de la idea inventiva. Tales organismos son técnicas conocidas en general en la aplicación, por ejemplo por medio del aislamiento de cepas a partir de un habitat natural o por medio de la selección de genotecas. La secuencia de nucleótidos, que está indicada en la SEQ ID NO. 1, puede ser empleada en este caso, por ejemplo, en forma de sonda para llevar a cabo la selección o puede ser empleada como modelo para la construcción de cebadores correspondientes para la RCP. De manera análoga, pueden ser empleados péptidos de cadena corta o péptidos completos con secuencias de aminoácidos según la SEQ ID NO. 2, para llevar a cabo la formación de antisueros correspondientes, con cuya ayuda pueden ser identificados organismos correspondientes, o bien las proteínas liberadas por los mismos.

De conformidad con las realizaciones dadas precedentemente, los microorganismos son, de manera preferente los hongos de levadura, entre los cuales aquellos del género *Candida*, de manera especial *Candida parapsilosis* y, de forma muy especialmente preferente se trata de *Candida parapsilosis* CBS 604, puesto que estos microorganismos se han impuesto en los procesos industriales ante todo debido a la aptitud a ser cultivados y como organismos de producción con un rendimiento de producción especialmente elevado.

Son preferentes, por motivos de producción industrial, respectivamente, aquellas cepas que liberen en el medio que las circunda al polipéptido formado.

Es posible que los productores de origen natural ciertamente puedan preparar un enzima de conformidad con la invención, pero llevan a cabo su expresión y/o lo liberan en el medio circundante sólo en pequeña proporción bajo las condiciones determinadas en primer lugar. Por lo tanto, quedan abarcados dentro del ámbito de protección de la presente invención en tanto en cuanto se de la posibilidad de determinar por vía experimental condiciones medioambientales adecuadas o factores de baja molecularidad o de otro tipo, bajo cuya acción pueden ser estimulados para llevar a cabo una producción de la proteína de conformidad con la invención, que permita vislumbrar un aprovechamiento conveniente desde el punto de vista económico. Un mecanismo de regulación de este tipo puede ser empleado específicamente para la producción biotecnológica, por ejemplo para llevar a cabo la regulación de los promotores responsables.

De conformidad con la obtención, con la elaboración o con la preparación de una proteína, ésta puede ser asociada a otros productos diferentes, especialmente cuando haya sido obtenida a partir de productores de naturales de esta proteína. Por lo tanto puede ser combinada específicamente con otros productos determinados, pero así mismo independientemente de ello, por ejemplo para llevar a cabo un aumento de su estabilidad al almacenamiento. Por lo tanto, bajo el concepto de proteína, de conformidad con la invención, se entiende, además, todas las preparaciones de la proteína propiamente dicha, que es esencial para la invención. Esto es igualmente independiente de que en una determinada preparación esté desarrollada o no realmente esta actividad enzimática. Esto se debe a que puede ser deseable que no tenga ninguna actividad o que tenga solamente una baja actividad durante el almacenamiento y que la desarrolle solamente en el instante en el que se lleve a cabo el empleo de su función. Esto puede depender, por ejemplo, del estado de plegamiento de la proteína o puede resultar del enlace reversible de uno o de varios productos acompañantes procedentes de la preparación o de un mecanismo de control de otro tipo.

Los ácidos nucleicos forman el punto de partida para llevar a cabo las verificaciones y los desarrollos ulteriores desde el punto de vista de la biología molecular. Tales métodos están descritos, por ejemplo, en el manual de los autores Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989. Así mismo, todos los métodos englobados en el estado de la técnica bajo el concepto de ingeniería de proteínas (Protein Engineering), de ingeniería genética y bioquímicos de proteínas están basados en el gen, especialmente en el gen clonado. Con tales métodos pueden ser optimizados todavía más los polipéptidos de conformidad con la invención con relación a diversas aplicaciones, por ejemplo por medio de la mutagénesis puntual o por medio de una fusión con secuencias procedentes de otros genes.

En un objeto propio de la invención, quedan incluidos los vectores, que contengan una de las regiones de ácidos nucleicos, que han sido descritas, que codifican un polipéptido de conformidad con la invención con actividad de lipasa/aciltransferasa.

Esto se debe a que, con objeto de tratar los ácidos nucleicos, se clona de manera conveniente el ADN en un vector. Los vectores son moléculas de ADN, que son adecuadas como moléculas de transporte (vehículo) para introducir (transformación) ADN foráneo en la célula huésped y eventualmente pueden ser replicados de manera autónoma en la misma. Los vectores que son empleados de manera frecuente están constituidos por plásmidos, es decir ADN bacteriano extracromosómico, en forma de anillo, de doble hebra, que pueden ser introducidos en otros microorganismos con ayuda de métodos adecuados y que pueden reproducirse en los mismos.

A los vectores pertenecen, por ejemplo, aquellos que se derivan de plásmidos bacterianos, de virus o de bacteriófagos, o los vectores o los plásmidos preponderantemente sintéticos con elementos de orígenes diversos. Los vectores son capaces de estabilizarse en las correspondientes células huésped a través de varias generaciones en forma de unidades estables con los otros elementos genéticos presentes de forma respectiva. En este caso carece de importancia, en el sentido de la invención, el que se establezcan en forma de unidades propias extracromosómicas o que se integren en un cromosoma. El sistema que es elegido, entre un gran número de sistemas, conocidos por el estado de la técnica,

ES 2 345 973 T3

depende de cada caso particular. Pueden ser determinantes, por ejemplo, el número de copias que puede ser alcanzado, de los sistemas de selección que se encuentren disponibles, entre ellos ante todo las resistencias a los antibióticos, o la posibilidad de efectuar el cultivo de las células huésped, capaces de alojar a los vectores.

5 Los vectores forman puntos de partida adecuados para verificaciones de la biología molecular y bioquímicas del gen correspondiente o de la proteína correspondiente y para los desarrollos posteriores de conformidad con la invención y, por último, para la amplificación y para la producción de las proteínas de conformidad con la invención. Por lo tanto, los vectores representan formas de realización de la presente invención, en tanto en cuanto las secuencias de las regiones de ácidos nucleicos, que están contenidas de conformidad con la invención, se encuentren dentro del intervalo
10 de homología, que ha sido indicado más arriba con mayor detalle.

Las formas de realización preferentes de la presente invención son vectores de clonación. Estos vectores de clonación son adecuados para llevar a cabo la caracterización del gen correspondiente, además de para el almacenamiento, la amplificación biológica o la selección del gen interesante, por ejemplo por medio de la preparación de una carta de restricción o por medio de la secuenciación. Por lo tanto, los vectores de clonación son también formas preferentes
15 de realización de la presente invención puesto que representan una forma transportable y almacenable del ADN reivindicado. Estos vectores también son puntos de partida preferentes para las técnicas de la biología molecular, que no dependen de las células, tal como por ejemplo la reacción en cadena de polimerasa.

20 Los vectores de expresión tienen secuencias parciales, que son capaces de replicarse en los organismos huésped optimizados para la producción de proteínas y de hacer que se verifique en los mismos la expresión del gen contenido. Las formas de realización preferentes son vectores de expresión, que portan a su vez los elementos genéticos, que son necesarios para llevar a cabo la expresión. La expresión es influenciada, por ejemplo, por promotores, que regulan la transcripción del gen. De este modo, la expresión puede llevarse a cabo por medio del promotor natural, que está
25 localizado originalmente por delante de este gen, así como también puede llevarse a cabo después de una fusión, realizada por medio de la ingeniería genética, tanto por medio de un promotor de la célula huésped, preparado sobre el vector de expresión, así como también por medio de un promotor de otro organismo, modificado o completamente diferente.

30 Las formas de realización preferentes son aquellos vectores de expresión, que pueden ser regulados a través de modificaciones de las condiciones de cultivo o por medio del aporte de determinados compuestos, tales como, por ejemplo, la densidad celular o factores especiales. Los vectores de expresión posibilitan que la proteína correspondiente sea producida de forma heteróloga, es decir en otro organismo diferente de aquel a partir del cual puede ser obtenida de manera natural. Así mismo se encuentra dentro del ámbito de protección de la presente invención una
35 obtención de proteína homóloga a partir de un organismo huésped que lleve a cabo la expresión de forma natural del gen por medio de un vector adecuado. Esta obtención puede presentar la ventaja de que pueden llevarse a cabo sobre la proteína formada reacciones de modificación naturales, que están relacionadas con la traducción, del mismo modo que las que se producirían también de forma natural.

40 Para llevar a cabo la obtención de los polipéptidos, de conformidad con la invención, son cultivados microorganismos, que han sido transformados con un vector de expresión, que contiene el gen estructural que codifica al enzima correspondiente. En este caso, los vectores de expresión se obtuvieron por medio de otros procedimientos, que están descritos más adelante. Los microorganismos especialmente preferentes, que son transformados con el vector de expresión, son *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichi pastoris*. Los vectores preferentes son aquellos plásmidos cuyas cartas
45 de restricción están representadas en las figuras 1 a 3.

A los vectores, que son empleados en el ámbito de la invención, pertenecen aquellos que se forman por medio de restricción con endonucleasas de restricción adecuadas, preferentemente con *Bam*HI o con *Sna*BI y, a continuación, recombinación con las mitades correspondientes N-terminales y respectivamente C-terminales del gen estructural del
50 enzima. Las endonucleasas de restricción son enzimas, que descomponen en fragmentos al ADN de doble hebra, específico del sustrato, debido a que disocian los enlaces de diéster de fosfato entre los constituyentes nucleótidos individuales del ADN. Todas las endonucleasas de restricción son capaces de reconocer determinadas secuencias de bases del ADN, que marcan puntos específicos de actuación (puntos de restricción) para la actividad de las correspondientes endonucleasas de restricción. Con ocasión del troceado (restricción) del ADN de doble hebra se forman
55 en algunas endonucleasas de restricción los denominados "extremos sobresalientes" específicos, que pueden unirse de nuevo (ligarse) bajo determinadas condiciones de renaturalización entre sí o con extremos sobresalientes correspondientes (complementarios) de fragmentos de ADN obtenidos por otra vía (recombinación).

De la misma manera, las formas de realización de la presente invención pueden ser sistemas de expresión exentos
60 de células, en los cuales se lleva a cabo *in vitro* la biosíntesis de proteínas. Tales sistemas de expresión están igualmente establecidos en el estado de la técnica.

Otra forma de realización de este objeto de la invención representa células, que contienen uno de los vectores que han sido definidos precedentemente, de manera especial un vector de clonación o un vector de expresión. Esto se debe
65 especialmente a que en el transcurso de los trabajos de biología molecular, como los que son necesarios, por ejemplo, para la mutagénesis, para la secuenciación o para el almacenamiento de los vectores, se lleva a cabo su transformación en células correspondientes. Con esta finalidad pueden ser adecuadas, por ejemplo, las bacterias gram-positivas, de manera especial sin embargo también las bacterias gram-negativas, en función del método.

Otra forma de realización está constituida por células huésped, que llevan a cabo la expresión de un polipéptido o de un derivado del primer objeto de la invención o que pueden ser estimuladas para llevar a cabo su expresión, de manera preferente bajo el empleo de uno de los vectores de expresión que han sido definidos precedentemente.

5 Esto se debe a que la síntesis *in-vivo* preferente de un polipéptido de conformidad con la invención requiere la transferencia del gen correspondiente a una célula huésped. Como células huésped son adecuadas, en principio, todos los organismos, es decir los procariotas, los eucariotas o los cianofitos. Son preferentes aquellas células huésped, que puedan ser perfectamente manipuladas desde el punto de vista genético, lo cual corresponde por ejemplo a la transformación con el vector de expresión y su establecimiento estable, por ejemplo hongos o bacterias monocelulares. Por
10 otra parte, las células huésped preferentes se caracterizan por una buena posibilidad de manipulación microbiológica y biotecnológica. Esto se refiere por ejemplo a la fácil posibilidad de cultivo, a las elevadas tasas de crecimiento, a las bajas exigencias en cuanto a los medios de fermentación y a las buenas tasas de producción y de secreción para proteínas foráneas. Los sistemas de expresión óptimos tienen que determinarse frecuentemente de forma experimental para cada caso particular a partir de un gran número de diversos sistemas, disponibles de conformidad con el estado de
15 la técnica. Cada proteína de conformidad con la invención puede ser obtenida de esta forma a partir de una pluralidad de organismos huésped.

Representan formas preferentes de realización aquellas células huésped, que pueden ser reguladas en cuanto a su actividad como consecuencia de elementos reguladores genéticos, que están disponibles por ejemplo sobre el vector de
20 expresión así como también que pueden estar presentes en estas células desde un principio. De forma ejemplificativa, estas células huésped pueden ser estimuladas para llevar a cabo la expresión por medio del aporte controlado de compuestos químicos tal como, por ejemplo, el metanol, que sirvan como activadores, por medio de la modificación de las condiciones de cultivo o por medio de la consecución de una densidad celular determinada. Esto posibilita una producción muy económica de las proteínas interesantes.

25 Una variante de este principio de ensayo está representada por sistemas de expresión, en los cuales genes adicionales influyen sobre la producción de proteínas de conformidad con la invención, por ejemplo aquellos genes que se ponen a disposición sobre otros vectores. En este caso puede tratarse de productos génicos modificados o puede tratarse de aquellos, que tengan que ser purificados conjuntamente con la proteína de conformidad con la invención,
30 por ejemplo para influenciar su función. En este caso puede tratarse, por ejemplo, de otras proteínas o enzimas, de inhibidores o de aquellos elementos, que influyan la interacción con diversos substratos.

Las células huésped preferentes son las células procariotas o las células bacterianas. Las bacterias se caracterizan frente a los eucariotas, por regla general, por tiempos de generación más cortos y por menores exigencias en cuanto
35 a las condiciones de cultivo. De este modo pueden establecerse procedimientos económicos para llevar a cabo la obtención de las proteínas de conformidad con la invención.

Son especialmente preferentes las células huésped, de manera especial las bacterias, que secretan en el medio circundante a la proteína o al derivado, que se han formado, de tal manera, que pueden ser purificadas directamente
40 las proteínas expresadas de conformidad con la invención.

Es preferente la expresión heteróloga. Las bacterias gram positivas, tales como, por ejemplo, los actinomicetos o los bacilos, no tienen membrana externa de tal manera, que liberen a las proteínas secretadas directamente en el medio circundante. A las bacterias preferentes para llevar a cabo la expresión heteróloga pertenecen, por lo tanto, aquellas
45 del género *Bacillus*, especialmente aquellas de las especies que están enumeradas más adelante.

De igual forma, las bacterias gram-negativas pueden ser utilizadas para llevar a cabo la expresión heteróloga. En el caso de estas bacterias se secreta una pluralidad de proteínas en la cavidad periplasmática, es decir en el compartimento situado entre las dos membranas, que rodean a las células. Esto puede ser ventajoso para aplicaciones especiales. A estas bacterias gram-negativas pertenecen, por ejemplo, aquellas de los géneros *Klebsiella* o *Escherichia*, de manera
50 preferente de las especies que están enumeradas también más adelante.

De la misma manera, las células eucariotas pueden ser adecuadas para llevar a cabo la producción de los polipéptidos de conformidad con la invención. Ejemplos a este respecto son las levaduras tales como *Saccharomyces* o *Kluyveromyces*. Esto puede ser especialmente ventajoso, por ejemplo, cuando las proteínas deban sufrir modificaciones específicas en relación con su síntesis, que posibiliten tales sistemas. A estas modificaciones pertenecen, por
55 ejemplo, el enlace de compuestos de bajo peso molecular tales como anclajes de la membrana u oligosacáridos.

Para llevar a cabo la producción de los polipéptidos, de conformidad con la invención, a partir de células huésped transformadas son especialmente preferentes los microorganismos, que son elegidos entre el grupo formado por *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Pichia boidinii*, *Pichia stipitis*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schwanniomyces castellii*, *Yarrowia lipolytica*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amylolicofaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Mucor sp* y *Rhizopus sp*.
60

65 Las células huésped transformadas o denominadas también transformantes, se cultivan a continuación en una forma en sí conocida, de manera preferente tal como se describe en los ejemplos, y se aíslan los polipéptidos de conformidad con la invención, que se han formado.

Con objeto de llevar a cabo la obtención de los polipéptidos, de conformidad con la invención, pueden ser combinados en procedimientos todos los elementos, que ya han sido citados precedentemente. Por lo tanto, estos procedimientos representan otro objeto de la invención. En este caso, puede imaginarse una pluralidad de posibilidades de combinación de las etapas del procedimiento para cada proteína, de conformidad con la invención. Todas ellas llevan a cabo la implementación de la idea en la que está basada la presente invención, concretamente tomándose como representativa la obtención cuantitativa, con ayuda de la información genética correspondiente, de un tipo de proteína, que está definido por la actividad de lipasa/aciltransferasa y, al mismo tiempo, por la elevada homología con respecto a las secuencias, que están indicadas en los protocolos de secuencias. El procedimiento óptimo debe ser determinado, por vía experimental, para cada caso individual concreto.

En este caso de procede, en principio, de la siguiente manera: se ligan de manera adecuada los ácidos nucleicos de conformidad con la invención, es decir aquellos que se presentan dentro del intervalo de similitud, que ha sido definido precedentemente, con respecto a la secuencia de SEQ ID NO. 1 o de SEQ ID NO. 3, en forma del ADN de un vector de expresión adecuado. Este vector de expresión se transforma en la célula huésped, por ejemplo en células de una cepa bacteriana, que pueda ser cultivada fácilmente, que secrete en el medio nutriente circundante las proteínas, cuyos genes se encuentran bajo el control de elementos genéticos correspondientes; pueden proporcionarse, por ejemplo, por medio del vector de expresión, elementos reguladores para esta finalidad. A partir del medio circundante puede ser purificada la proteína de conformidad con la invención por medio de varias etapas de purificación, tales como, por ejemplo, precipitaciones o cromatografías. Un técnico en la materia es capaz de extrapolar a una escala de producción industrial un sistema, que haya sido optimizado experimentalmente a escala de laboratorio.

Otro objeto de la invención consiste en el empleo de microorganismos naturales y/o recombinantes, como los que han sido descritos precedentemente, que contienen un ácido nucleico para llevar a cabo la obtención de un polipéptido de conformidad con la invención, descrito precedentemente.

Otra aplicación, de conformidad con la invención, de los ácidos nucleicos y/o de la secuencia de aminoácidos, que han sido descritos precedentemente, que tienen una identidad de, al menos, un 49%, de manera preferente de un 80%, de manera preferente de, al menos, un 98%, de manera especialmente preferente de un 99,8% y, de manera especial, de un 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID NO. 2 y/o con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID NO. 4, consiste en el descubrimiento de nuevas aciltransferasas.

Este descubrimiento de nuevas enzimas se denomina también selección. De manera especial se seleccionan genotecas de determinados organismos de conformidad con los métodos generales tales como, por ejemplo, los que están descritos en la publicación de los autores Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

Por medio de una comparación con los enzimas conocidos, que están depositados por ejemplo en bancos de datos accesibles al público, pueden seguirse partes moleculares características a partir de la secuencia de aminoácidos o de la secuencia de nucleótidos tales como, por ejemplo, elementos estructurales o la actividad enzimática de un enzima considerado. Una comparación de este tipo se lleva a cabo por medio de la adscripción recíproca de series similares en las secuencias de nucleótidos o en las secuencias de aminoácidos de las proteínas consideradas. Esto se denomina homologación. Una adscripción tabulada de las posiciones correspondientes se denomina alineamiento. En el análisis de las secuencias de nucleótidos deben tenerse en consideración a su vez ambas hebras complementarias respectivamente del conjunto de las tres pautas de lectura posibles; de la misma manera debe tomarse en consideración la degeneración del código genético y el uso de codones. Entre tanto se han establecido alineaciones por medio de programas de ordenador, tal como por ejemplo por medio de los algoritmos FASTA o BLAST; esta forma de proceder está descrita por ejemplo por los autores D. J. Lipman y W. R. Pearson (1985) in Science, tomo 227, páginas 1435-1441. Se denomina secuencia de consenso a una recopilación de todas las posiciones coincidentes en las secuencias que han sido comparadas.

De igual modo, una comparación de este tipo permite una predicción sobre la similitud o la homología de las secuencias comparadas entre sí. Esta similitud se representa en porcentaje de identidad, es decir en la proporción de los nucleótidos o de los restos de aminoácidos, que son idénticos en las mismas posiciones. Otro concepto de homología adoptado incluye los intercambios conservados de aminoácidos en este valor con uno. Entonces se habla de porcentaje de similitud. Tales predicciones pueden llevarse a cabo a través de todas las proteínas o genes o únicamente a través de regiones individuales.

Las regiones homólogas de diversas proteínas son, en la mayoría de los casos, aquellas con elementos estructurales y/o funciones idénticas, que pueden reconocerse por medio de las coincidencias en la secuencia primaria de aminoácidos. La homología llega hasta la identidad total en las regiones más pequeñas, que se denominan cajas, que únicamente comprenden un número reducido de aminoácidos y que, en la mayoría de los casos ejercen funciones esenciales para la actividad total. Debe entenderse por funciones de las regiones homólogas, las funciones parciales mínimas de la función ejercida por el conjunto de la proteína, tal como, por ejemplo, la formación de enlaces por medio de puentes de hidrógeno individuales, para formar complejos de un sustrato o complejos de transición.

Como consecuencia de los alineamientos, los polipéptidos de conformidad con la invención pueden adquirir ampliamente las mismas estructuras secundarias y terciarias que en el caso de las proteínas empleadas para llevar a

cabo la homologación. Cuyos elementos estructurales pueden ser consultados en bancos de datos accesibles al público tales como, por ejemplo, en el EMBL-European Bioinformatics Institute (EBI) en Cambridge, Gran Bretaña (<http://www.ebi.ac.uk>), Swiss-Prot o GenBank (National Center for Biotechnology Information NCBI, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). En el caso en que se produzcan estructuras que se desvíen de las anteriores o en el caso en que se ponga de manifiesto que existen diversas variantes de plegamiento con propiedades variables, lo cual concierne por ejemplo a las condiciones óptimas de reacción o a la especificidad con respecto al sustrato, todas éstas quedan cubiertas por el ámbito de protección de la presente invención. Esto se debe a que, por un lado, el plegamiento puede depender de las condiciones de obtención, por ejemplo cuando esté presente o ausente el péptido conductor. Por otro lado, puede ponerse de manifiesto que estas variantes son especialmente adecuadas respectivamente para diversas posibilidades de aplicación.

Otro objeto de la invención consiste en el empleo de los polipéptidos descritos a modo de catalizadores en las reacciones de transferencia de grupos acilo, especialmente en las reacciones elegidas entre el grupo formado por la alcoholisis de los ésteres, especialmente de los gliceroles o de los esteroides, la alcoholisis de los tioésteres, la tiolisis de los ésteres, la aminolisis de un éster con hidroxilaminas o con hidrazinas; la reacción de un éster con peróxidos de hidrógeno y la síntesis enantioselectiva de ésteres, de tioésteres o de lactonas por medio de una alcoholisis. Las reacciones especiales que son catalizadas por los polipéptidos de conformidad con la invención están descritas, por ejemplo, en las publicaciones: a) Fournand *et al.* J. Mol. Catalysis B, 1998, 5, 207-211; b) Briand *et al.* Eur. J. Biochem. 1995, 228, 169-175.

Ejemplos

1. Ejemplo

25 *Cultivo de la cepa y aislamiento del polipéptido*

Se depositó la cepa *Candida parapsilosis* (Ashford) Langeron y Talice, CBS 604 en el Centraalbureau voor Schimmelcultures, Yeast division, Delft Países Bajos.

30 El cultivo se llevó a cabo de la misma forma que ha sido descrita por los autores Briand *et al.* en la publicación Eur. J. Biochem., 1995, 228, 169-175. El cultivo principal se ajustó a pH 6,5 con tampón de fosfato 100 mM y se combinó con 5 g/l de glucosa como fuente de carbono.

35 Al final de la fase exponencial de crecimiento se centrifugó el caldo de cultivo (7.000 g durante 15 minutos) y se obtuvo la lipasa/aciltransferasa a partir del sobrenadante líquido. La purificación del polipéptido se llevó a cabo según los métodos descritos en la publicación de los autores Riaublanc A. *et al.* J. Am. Oil Chem. Soc. 1993, 70, 497-500.

2. Ejemplo

40 *Etapas de trabajo de biología molecular*

Todas las etapas de trabajo de biología molecular siguen métodos estándar, como los que están indicados, por ejemplo, en los manuales tales como el de los autores Fritsch, Sambrook y Maniatis "Molecular cloning: a laboratory manual", Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, 1989.

45 Se midió el contenido en lipasa/aciltransferasa en unidades (U), determinado como contenido en ácido oleico que se obtiene por minuto en el caso de la hidrólisis de trioleilglicerol bajo las condiciones descritas por los autores Briand *et al.* en la publicación Eur. J. Biochem. 1995; 228; 169-175. La concentración en proteína se determinó según el método de Bradford (1976; Anal. Biochem. 72; 248-254).

50 3. Ejemplo

Expresión de un gen que contiene el ácido nucleico según la SEC ID NO. 1 en Saccharomyces cerevisiae

55 Para llevar a cabo la expresión de la secuencia de ácidos nucleicos deseada se llevó a cabo en primer lugar una hidrólisis parcial con la endonucleasa de restricción *Bam*HI ADN. Se construyeron cebadores por medio de la RCP degenerada, que contiene el ácido nucleico según la SEQ ID NO. 1. Se emplearon los siguientes pares de cebadores (el codón de iniciación y el codón de detención están subrayados; el lado de restricción *Bam*HI está escrito en negrita):

60 ascendente

5'-CTCGGATCCATGCGT TACTTTGCTATTGC

65 descendente

5'-CACGGATCCTTAAAAAGCAAACGTTCCA AACTTGAGCAATCC

ES 2 345 973 T3

Para llevar a cabo la amplificación por RCP se ejecutó el siguiente programa de tiempo/temperatura: desnaturalizado durante 5 minutos a 95°C y a continuación 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C, 1 minutos a 72°C y como última etapa 10 minutos a 72°C.

5 Los fragmentos, procedentes de la RCP, se sometieron a digestión con la endonucleasa de restricción *Bam*HI y, a continuación, se ligaron en el vector pVT100-U, escindido con la endonucleasa de restricción *Bam*HI, para formar un plásmido. Se obtuvo el vector pVT100CpLIP2 de conformidad con la figura 1 (plásmido replicativo). Se verificó la ausencia de mutaciones por medio de la secuenciación de los insertos. Se llevó a cabo la transformación del ADN neocombinado en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* W303-1a de conformidad con el método de la electroporación
10 descrito por los autores Becker *et al.* en la publicación *Methods in Enzymology*, 1991, 194, 182-187. Los transformantes se seleccionaron sobre medio YNB sin uracilo (6,7 g/l de Yeast nitrogen base sin aminoácidos de la firma [Difco], 20 g/l de glucosa, 150 mg/l de leucina, 100 mg/l de adenina, 100 mg/l de histidina, 100 mg/l de triptofano) con una frecuencia de $1-2 \times 10^4$ transformantes por μg de ADN. Los transformantes se seleccionaron en un ensayo de placa con respecto a la actividad de la lipasa de conformidad con el método de Kouker descrito en: Kouker G. *et al.*,
15 *Applied Environ. Microbiol.* 1987, 59, 211-213.

El transformante seleccionado se cultivó en un matraz sometido a sacudidas a 28°C en medio YPD. (YPD = 10 g/l de extracto de levadura [Difco], 20 g/l de peptona Bacto [Difco], 60 g/l de glucosa, 150 mg/l de leucina, 100 mg/l de adenina, 100 mg/l de histidina y 100 mg/l de triptofano). El caldo de cultivo se recolectó al cabo de una fermentación
20 durante 36 horas y el sobrenadante de la solución de cultivo se separó del residuo por medio de una centrifugación. El sobrenadante contenía 2.500 U de lipasa/aciltransferasa recombinante por litro y una actividad específica de 0,7 U/mg. Después de la concentración por medio de una ultrafiltración y de una cromatografía hidrófuga sobre Phenylsepharose 6 Fast-Flow Gel pudo obtenerse de nuevo el 10% de la actividad, con una actividad específica de 80 U/mg.

25 4. Ejemplo

Expresión de un gen que contiene la SEQ ID NO. 1 en Pichia pastoris

30 Se llevó a cabo la expresión de la lipasa/aciltransferasa como fusión para dar un péptido N-terminal, que codifica la señal de secreción del factor α a partir de *Saccharomyces cerevisiae*. En primer lugar se amplificó por RCP el gen de manera correspondiente a la SEQ ID NO. 1 y, de este modo, se obtuvo un gen escindido del gen maduro. Se emplearon los siguientes cebadores: (el codón de detención está subrayado, el primer codón de fenilalanina del gen maduro está escrito en negrita)

35

ascendente 5'-**TTT**GTCTTGGCTCCCAAAAAGCCA

40 descendente 5'-TTAAAAAGCAAACGTTCCAACCTGAGCAATCC

Con objeto de llevar a cabo la amplificación por medio de la RCP se ejecutó el siguiente programa de tiempo/temperatura: desnaturalizado durante 2 minutos a 94°C y a continuación 15 ciclos de 15 segundos a 94°C, 30
45 segundos a 50°C, 90 segundos a 72°C más 5 segundos por ciclo para los períodos de extensión del ciclo 11 y como última etapa 7 minutos a 72°C.

Después de la amplificación se llevó a cabo una fosforilación del fragmento obtenido con T4-polinucleótido-lipasa y se tamponó con T4-ADN-polimerasa. El fragmento se ligó a continuación con un plásmido pPIC9K sometido a
50 digestión con *Sna*BI y se obtuvo el vector pPIC9KCpLIP2 (plásmido replicativo) (figura 2). Se verificó la ausencia de mutaciones por medio de la secuenciación de los insertos.

Se llevó a cabo la transformación de los esferoplastos de levadura con el estuche de expresión *Pichia* de la firma Invitrogen (Groningen Países Bajos). La frecuencia de transformación fue de 10^3 transformaciones por μg de
55 ADN.

Se cultivó en un fermentador un transformante seleccionado con un medio sintético descritos por los autores Boze *et al.* En la publicación: (Boze H. *et al.*; *Process Biochem*, 2001, 36, 907-913) al que se le agregaron 40 g de glicerol. Después de la fase de crecimiento (al cabo de 2.500 minutos de fermentación) según el procedimiento por tandas,
60 se aportó metanol puro (5 g/l) en el procedimiento de alimentación por tandas con objeto de inducir la expresión del gen. Al cabo de 4 días de cultivo con una elevada densidad celular se separó del residuo el sobrenadante del caldo de cultivo por medio de una centrifugación. El sobrenadante obtenido contenía 102.000 U/l de lipasa/aciltransferasa recombinante con una actividad específica de 80 U/mg de proteína. Una concentración por medio de ultrafiltración con membranas 10.000 kD cut-off proporcionó una concentración en enzima de 830.000 U/l con una actividad específica
65 de 150 U/mg.

ES 2 345 973 T3

5. Ejemplo

Expresión de una lipasa/aciltransferasa modificada (His-tagged) en Saccharomyces cerevisiae

5 Para llevar a cabo la expresión de la deseada secuencia de ácidos nucleicos modificada de conformidad con la SEQ ID NO 3, que posibilita la fusión del péptido 6-His con el extremo C-terminal de la secuencia del polipéptido de conformidad con la SEQ ID NO 2, se llevó a cabo en primer lugar una hidrólisis parcial con la endonucleasa de restricción *Bam*HI ADN. Se construyeron cebadores por medio de la RCP, que contienen los ácidos nucleicos de conformidad con la SEQ ID NO. 1. Fueron empleados los siguientes pares de cebadores, que posibilitan una extensión de la secuencia de ácidos nucleicos con 6 codones de histidina (el codón de iniciación y el codón de detención están subrayados; el lado de restricción *Bam*HI está escrito en negrita, los codones His están descritos en cursiva):

ascendente 5'-CTCGGATCCATGCGTTACTTTGCTATTGC

15

descendente 5'-

CACGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGAAAAGCAAACGTTCCAACTT

20

GAGCAATCC

25

Con objeto de llevar a cabo la amplificación por medio de la RCP se ejecutó el siguiente programa de tiempo/temperatura: desnaturalizado durante 5 minutos a 95°C y a continuación 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 50°C, 1 minuto a 72°C y como última etapa 10 minutos a 72°C.

30

Los fragmentos, procedentes de la RCP, se sometieron a digestión con la endonucleasa de restricción *Bam*HI y, a continuación, se ligaron en el vector pVT100-U escindido con la endonucleasa de restricción *Bam*HI. Se obtuvo el vector pVT100CpLIP2His según la figura 3 (plásmido integrativo). La transformación de *Saccharomyces cerevisiae* W303-1a y la expresión del gen se llevaron a cabo de conformidad con el ejemplo 3.

35

El transformante seleccionado se cultivó en matraces sometidos a sacudidas a 28°C en medio YPD (YPD = 10 g/l de extracto de levadura [Difco], 20 g/l de peptona Bacto [Difco], 60 g/l de glucosa, 150 mg/l de leucina, 100 mg/l de adenina, 100 mg/l de histidina y 100 mg/l de triptofano). El caldo de cultivo se separó al cabo de una fermentación durante 36 horas y el sobrenadante de la solución de cultivo se separó del residuo por medio de una centrifugación. El sobrenadante contenía 3.100 U de lipasa/aciltransferasa his-tagged recombinante por litro y una actividad específica de 0,25 U/mg de proteína. Se aprovecharon las propiedades formadoras de quelatos con iones para llevar a cabo una purificación en una etapa. Con esta finalidad se empleó el gel de afinidad Ni-NitriloTriacetic-Acid Agarose de la firma Qiagen, en la forma descrita por el fabricante. Se obtuvo un 26% del enzima con una actividad específica de 150 U/mg de proteína.

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptidos con actividad de lipasa/aciltransferasa, con una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de, al menos, el 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos indicada en la SEQ ID No. 2.
2. Polipéptidos con actividad de lipasa/aciltransferasa, con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en las posiciones 190 hasta 390 al menos en un 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 2.
- 10 3. Polipéptidos con actividad de lipasa/aciltransferasa, con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en las posiciones 190 hasta 390 al menos en un 96% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 2.
- 15 4. Polipéptidos con actividad de lipasa/aciltransferasa, con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 2.
5. Polipéptidos según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizados** porque se presentan en estado glicosilado.
- 20 6. Polipéptidos según una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizados** porque están enlazados con otro péptido.
7. Polipéptidos según la reivindicación 6, **caracterizados** porque el otro péptido está constituido por un marcador, preferentemente está constituido por his-tag.
- 25 8. Polipéptidos con una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad del 80% como mínimo con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 4.
9. Polipéptidos con una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en un 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 4.
- 30 10. Fragmento polipéptido o polipéptidos, que pueden ser obtenidos por medio de una mutación por delección, con actividad de lipasa/aciltransferasa, según una de las reivindicaciones 1 a 9.
- 35 11. Polipéptidos con actividad de lipasa/aciltransferasa según las reivindicaciones 1 a 10, cuya cadena pura de aminoácidos ha sido químicamente modificada.
12. Polipéptidos según al menos una de las reivindicaciones 1 a 11, **caracterizados** porque pueden ser obtenidos de forma natural a partir de un microorganismo.
- 40 13. Polipéptidos según la reivindicación 12, **caracterizados** porque el microorganismo está constituido por un hongo eucariota, de manera preferente está constituido por hongos de levadura.
- 45 14. Polipéptidos según la reivindicación 12, **caracterizados** porque pueden ser obtenidos a partir de microorganismos, elegidos entre el grupo que está formado por *Candida parapsilosis*, *Candida antarctica* (*Trychosporon oryzae*, *Pseudozyma antarctica*), *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Candida tropicalis*, *Candida viswanathii*, *Issatchenkia orientalis* (*Candida krusei*), *Kluyveromyces marxianus* (*C. kefyi*, *C. pseudotropicalis*), *Pichia guilliermondii* (*Candida guilliermondii*), *Geotrichum candidum*, *Fusarium solani* y *Aeromonas aerophila*.
- 50 15. Ácidos nucleicos, que codifican un polipéptido con actividad de lipasa/aciltransferasa, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica en un 100% con respecto a la secuencia de nucleótidos que está indicada en la SEQ ID No. 1, especialmente a través de la región parcial, que corresponde a los aminoácidos 190 hasta 390 de conformidad con la SEQ ID No. 2.
- 55 16. Ácidos nucleicos, que codifican una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de, al menos, un 80% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 2, representando la secuencia de aminoácidos un polipéptido con actividad de lipasa/aciltransferasa.
- 60 17. Ácidos nucleicos, que codifican una secuencia de aminoácidos, que es idéntica en las posiciones 190 hasta 390 al menos en un 96% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 2, representando la secuencia de aminoácidos un polipéptido con actividad de lipasa/aciltransferasa.
- 65 18. Ácidos nucleicos, que codifican uno de los polipéptidos o derivados que han sido indicados en las reivindicaciones 1 a 14.
19. Ácidos nucleicos, que codifican un polipéptido con actividad de lipasa/aciltransferasa, cuya secuencia de nucleótidos es idéntica a la secuencia de nucleótidos que está indicada en la SEQ ID No. 3.

ES 2 345 973 T3

20. Ácidos nucleicos, que codifican una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de un 80% como mínimo con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 4, representando la secuencia de aminoácidos un polipéptido con actividad de lipasa/aciltransferasa.

5 21. Vector, que contiene uno de los ácidos nucleicos indicados en las reivindicaciones 15 a 20, que codifica uno de los polipéptidos o derivados que han sido indicados en las reivindicaciones 1 a 14.

22. Vector de clonación según la reivindicación 21.

10 23. Vector de expresión según la reivindicación 21.

24. Célula, que contiene un vector según una de las reivindicaciones 21 a 23.

15 25. Célula huésped transformada, que expresa uno de los polipéptidos o derivados que han sido indicados en las reivindicaciones 1 a 14 o que puede ser inducida para llevar a cabo su expresión, por medio del empleo de un vector de expresión según la reivindicación 23.

20 26. Célula huésped transformada según la reivindicación 25, que contiene un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 2.

25 27. Célula huésped transformada según la reivindicación 25 y/o 26, que contiene un ácido nucleico, que codifica una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de un 80% como mínimo con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 2.

28. Célula huésped transformada según la reivindicación 25, que contiene un ácido nucleico, que codifica una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad del 100% con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 4.

30 29. Célula huésped transformada según la reivindicación 25 y/o 26, que contiene un ácido nucleico, que codifica una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de un 80% como mínimo con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 4.

35 30. Células huésped transformadas según una de las reivindicaciones 25 a 29, **caracterizadas** porque las células huésped, que deben ser transformadas, están constituidas por células huésped procedentes de microorganismos.

31. Células huésped transformadas según una de las reivindicaciones 25 a 30, **caracterizadas** porque las células huésped, que deben ser transformadas, están constituidas por células huésped procedentes de microorganismos, que se eligen entre el grupo que está formado por *Candida parapsilosis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Pichia pastoris*, *Pichia boidinii*, *Pichia stipitis*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces lactis*, *Schwanniomyces castellii*, *Yarrowia lipolytica*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amylolicofaciens*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus licheniformis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma reesei*, *Mucor sp.* y *Rhizopus sp.*

45 32. Procedimiento para la obtención de un polipéptido según, al menos, una de las reivindicaciones 1 a 14, por medio del empleo de un ácido nucleico, que codifica una secuencia de aminoácidos, que tiene una identidad de un 80% como mínimo con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 2 y/o por medio del empleo de un vector según una de las reivindicaciones 21 a 23 y/o por medio del empleo de una célula huésped transformada según una de las reivindicaciones 25 a 31 o con empleo de una célula, que lo forma de manera natural.

50 33. Empleo de microorganismos naturales y/o recombinantes, que contienen un ácido nucleico para la obtención de un polipéptido según, al menos, una de las reivindicaciones 1 a 14.

55 34. Empleo de un ácido nucleico según las reivindicaciones 15 a 20 y/o empleo de secuencias de aminoácidos, que tienen una identidad de un 80% como mínimo con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 2, para llevar a cabo el descubrimiento de nuevas aciltransferasas.

60 35. Empleo de un ácido nucleico según las reivindicaciones 15 a 20 y/o empleo de secuencias de aminoácidos, que tienen una identidad de un 80% como mínimo con respecto a la secuencia de aminoácidos que está indicada en la SEQ ID No. 4, para llevar a cabo el descubrimiento de nuevas aciltransferasas.

65 36. Empleo de polipéptidos según la reivindicación 1 a 14 como catalizadores en las reacciones de transferencia de grupos acilo, de manera especial en las reacciones que están elegidas entre el grupo formado por la alcoholisis de los ésteres, la alcoholisis de los tioésteres, la tiolisis de los ésteres, la aminolisis de un éster con hidroxilaminas o con hidrazinas; la reacción de un éster con peróxidos de hidrógeno y la síntesis enantioselectiva de ésteres, de tioésteres, de lactonas por medio de una alcoholisis.

Figura 1: Vector pVT100CpLIP2

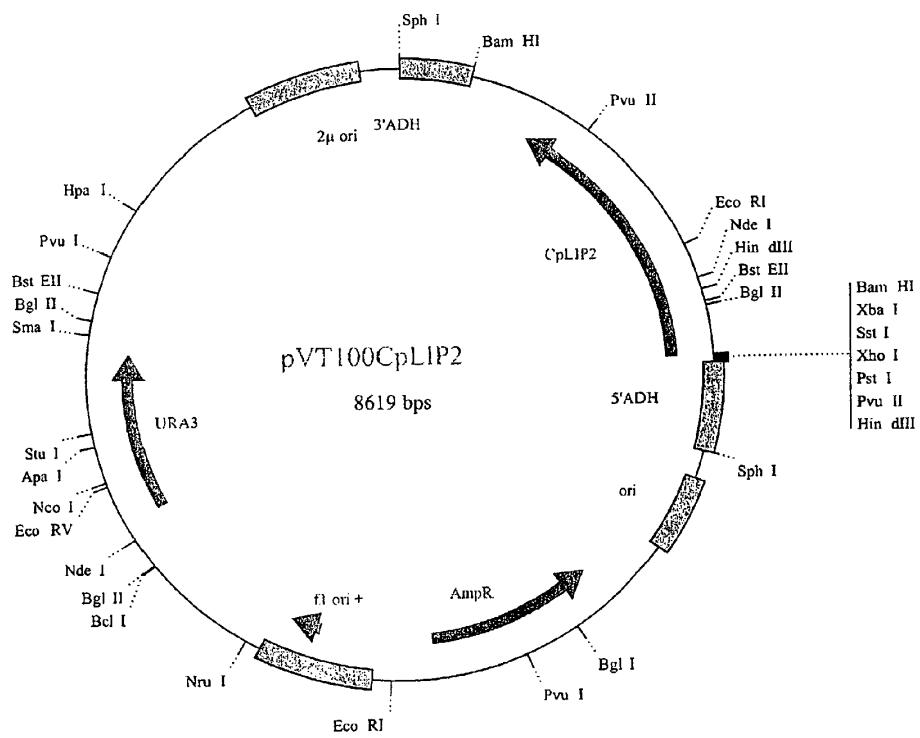


Figura 2: Vector pPIC9KCpLIP2

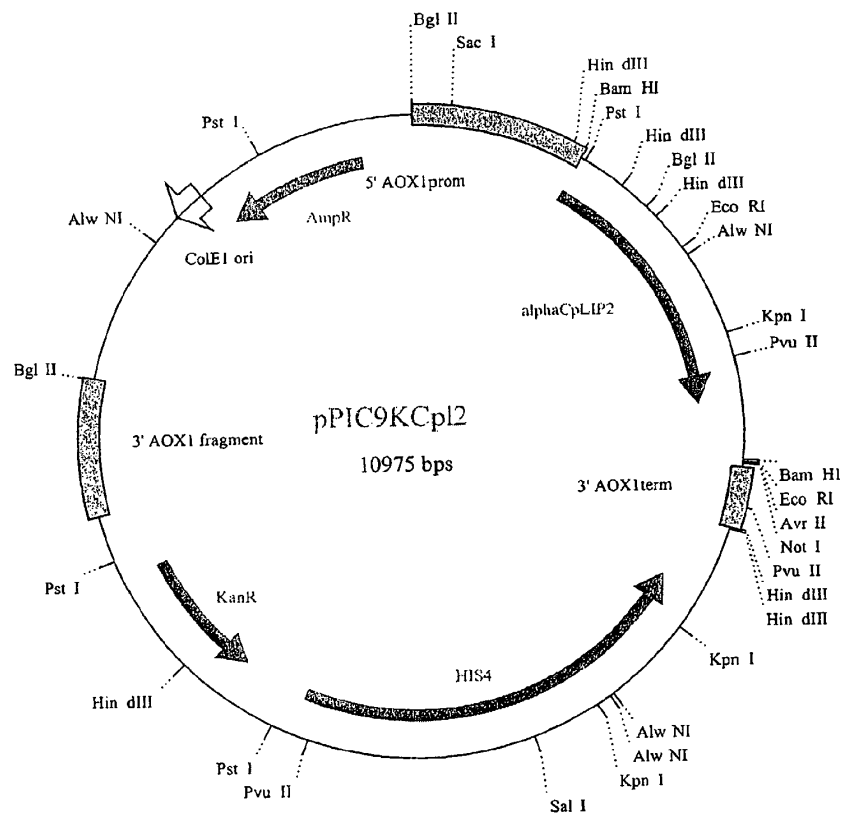
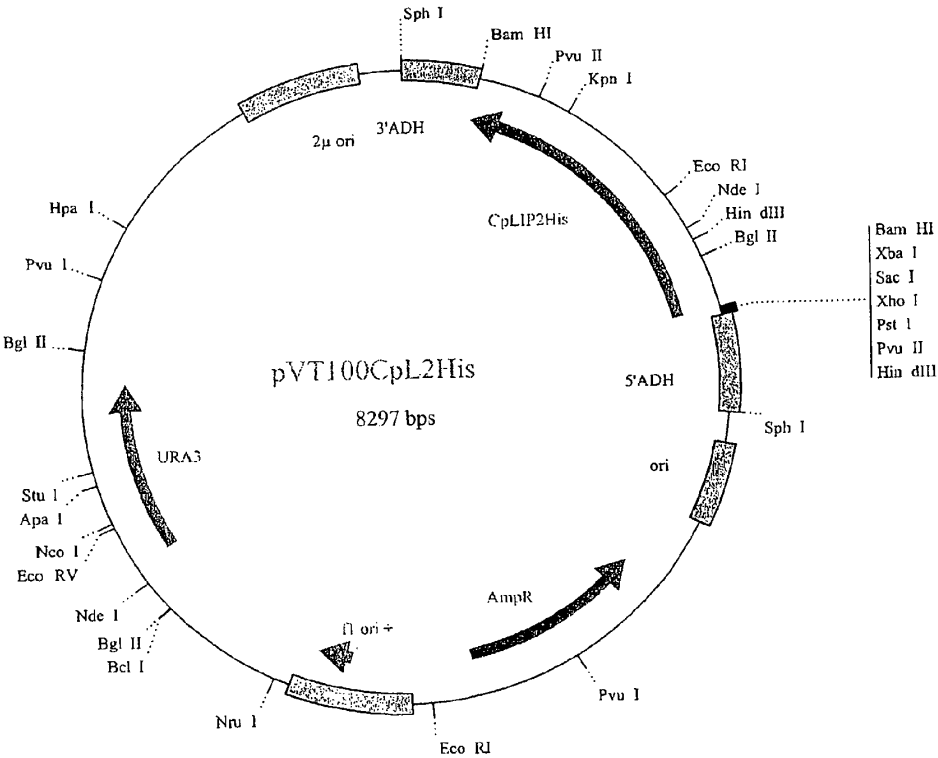


Figura 3: Vector pVT100CpLIP2His



ES 2 345 973 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Cognis Deutschland GmbH
 <120> Lipasa/aciltransferasa
 5 <130> C2425
 <140>
 <141>
 10 <160> 4
 <170> PatentIn Ver. 2.1
 <210> 1
 <211> 1398
 15 <212> ADN
 <213> *Candida parapsilosis*
 <220>
 20 <221> CDS
 <222> (1)..(1398)

 <400> 1

25	atg cgt tac ttt gct att gct ttc ttg ctc atc aat acc att tca gct	48
	Met Arg Tyr Phe Ala Ile Ala Phe Leu Leu Ile Asn Thr Ile Ser Ala	
	1 5 10 15	
30	ttt gtc ttg gct ccc aaa aag cca tct caa gac gat ttc tac act cca	96
	Phe Val Leu Ala Pro Lys Lys Pro Ser Gln Asp Asp Phe Tyr Thr Pro	
	20 25 30	
35	cca caa ggt tat gaa gct caa cct ctt ggt tct att ttg aaa aca aga	144
	Pro Gln Gly Tyr Glu Ala Gln Pro Leu Gly Ser Ile Leu Lys Thr Arg	
	35 40 45	
40	aac gtc ccc aat cca ttg act aat gtt ttc act cca gtt aaa gtt caa	192
	Asn Val Pro Asn Pro Leu Thr Asn Val Phe Thr Pro Val Lys Val Gln	
	50 55 60	
45	aac gcc ata gtc act acc att att caa cct ttc aat gct aaa aag gat	288
	Asn Ala Ile Val Thr Thr Ile Ile Gln Pro Phe Asn Ala Lys Lys Asp	
	85 90 95	
50	aag ctt gtt tct tat caa aca ttt gaa gat tct ggt aaa ttg gat tgt	336
	Lys Leu Val Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ser Gly Lys Leu Asp Cys	
	100 105 110	
55	gct cca tca tat gct att caa tat gga tgc gac att tgc act ttg acc	384
	Ala Pro Ser Tyr Ala Ile Gln Tyr Gly Ser Asp Ile Ser Thr Leu Thr	
	115 120 125	
60	act caa ggt gaa atg tac tac atc tct gct tta tta gat caa ggt tac	432
	Thr Gln Gly Glu Met Tyr Tyr Ile Ser Ala Leu Leu Asp Gln Gly Tyr	
	130 135 140	
65	tat gtt gtc act cct gat tac gag ggt cca aag agt aca ttc act gta	480
	Tyr Val Val Thr Pro Asp Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Thr Phe Thr Val	
	145 150 155 160	

ES 2 345 973 T3

Asn Leu Glu Tyr Pro Gly Thr Pro Gln Ser Ile Lys Asn Tyr Phe Glu
 420 425 430

5 gct gca ttg cac gca att ttg ggc ttt gat ttg ggt cca gat gtt aag 1344
 Ala Ala Leu His Ala Ile Leu Gly Phe Asp Leu Gly Pro Asp Val Lys
 435 440 445

10 aga gat aag gtt act ttg ggc gga ttg ctc aag ttg gaa cgt ttt gct 1392
 Arg Asp Lys Val Thr Leu Gly Gly Leu Leu Lys Leu Glu Arg Phe Ala
 450 455 460

ttt tag 1398
 Phe
 465

15 <210> 2
 <211> 465
 <212> PRT
 20 <213> *Candida parapsilosis*
 <400> 2

25 Met Arg Tyr Phe Ala Ile Ala Phe Leu Leu Ile Asn Thr Ile Ser Ala
 1 5 10 15
 Phe Val Leu Ala Pro Lys Lys Pro Ser Gln Asp Asp Phe Tyr Thr Pro
 20 25 30
 Pro Gln Gly Tyr Glu Ala Gln Pro Leu Gly Ser Ile Leu Lys Thr Arg
 35 35 40 45
 Asn Val Pro Asn Pro Leu Thr Asn Val Phe Thr Pro Val Lys Val Gln
 50 55 60
 Asn Ala Trp Gln Leu Leu Val Arg Ser Glu Asp Thr Phe Gly Asn Pro
 65 70 75 80
 Asn Ala Ile Val Thr Thr Ile Ile Gln Pro Phe Asn Ala Lys Lys Asp
 85 90 95
 Lys Leu Val Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ser Gly Lys Leu Asp Cys
 100 105 110
 Ala Pro Ser Tyr Ala Ile Gln Tyr Gly Ser Asp Ile Ser Thr Leu Thr
 115 120 125
 Thr Gln Gly Glu Met Tyr Tyr Ile Ser Ala Leu Leu Asp Gln Gly Tyr
 130 135 140
 Tyr Val Val Thr Pro Asp Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Thr Phe Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Leu Gln Ser Gly Arg Ala Thr Leu Asn Ser Leu Arg Ala Thr Leu
 165 170 175
 Lys Ser Gly Asn Leu Thr Gly Val Ser Ser Asp Ala Glu Thr Leu Leu
 180 185 190
 Trp Gly Tyr Ser Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Trp Ala Ala Ile
 195 200 205
 Gln Lys Glu Tyr Ala Pro Glu Leu Ser Lys Asn Leu Leu Gly Ala Ala
 210 215 220
 Leu Gly Gly Phe Val Thr Asn Ile Thr Ala Thr Ala Glu Ala Val Asp
 225 230 235 240
 Ser Gly Pro Phe Ala Gly Ile Ile Ser Asn Ala Leu Ala Gly Ile Gly
 245 250 255
 Asn Glu Tyr Pro Asp Phe Lys Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Val Ser Pro
 260 265 270
 Leu Leu Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Gly Asn Thr His Cys Leu Leu Asp
 275 280 285
 Gly Gly Ile Ala Tyr Phe Gly Lys Ser Phe Phe Ser Arg Ile Ile Arg
 290 295 300
 Tyr Phe Pro Asp Gly Trp Asp Leu Val Asn Gln Glu Pro Ile Lys Thr
 305 310 315 320
 Ile Leu Gln Asp Asn Gly Leu Val Tyr Gln Pro Lys Asp Leu Thr Pro
 325 330 335
 Gln Ile Pro Leu Phe Ile Tyr His Gly Thr Leu Asp Ala Ile Val Pro
 340 345 350

65

ES 2 345 973 T3

5 Ile Val Asn Ser Arg Lys Thr Phe Gln Gln Trp Cys Asp Trp Gly Leu
 355 360 365
 Lys Ser Gly Glu Tyr Asn Glu Asp Leu Thr Asn Gly His Ile Thr Glu
 370 375 380
 Ser Ile Val Gly Ala Pro Ala Ala Leu Thr Trp Ile Ile Asn Arg Phe
 385 390 395 400
 Asn Gly Gln Pro Pro Val Asp Gly Cys Gln His Asn Val Arg Ala Ser
 405 410 415
 Asn Leu Glu Tyr Pro Gly Thr Pro Gln Ser Ile Lys Asn Tyr Phe Glu
 420 425 430
 10 Ala Ala Leu His Ala Ile Leu Gly Phe Asp Leu Gly Pro Asp Val Lys
 435 440 445
 Arg Asp Lys Val Thr Leu Gly Gly Leu Leu Lys Leu Glu Arg Phe Ala
 450 455 460
 Phe
 15 465

<210> 3
 <211> 1416
 <212> ADN
 20 <213> *Candida parapsilosis*
 <220>
 <221> CDS
 25 <222> (1)..(1416)
 <400> 3

30 atg cgt tac ttt gct att gct ttc ttg ctc atc aat acc att tca gct 48
 Met Arg Tyr Phe Ala Ile Ala Phe Leu Leu Ile Asn Thr Ile Ser Ala
 1 5 10 15
 35 ttt gtc ttg gct ccc aaa aag cca tct caa gac gat ttc tac act cca 96
 Phe Val Leu Ala Pro Lys Lys Pro Ser Gln Asp Asp Phe Tyr Thr Pro
 20 25 30
 40 cca caa ggt tat gaa gct caa cct ctt ggt tct att ttg aaa aca aga 144
 Pro Gln Gly Tyr Glu Ala Gln Pro Leu Gly Ser Ile Leu Lys Thr Arg
 35 40 45
 45 aac gtc ccc aat cca ttg act aat gtt ttc act cca gtt aaa gtt caa 192
 Asn Val Pro Asn Pro Leu Thr Asn Val Phe Thr Pro Val Lys Val Gln
 50 55 60
 50 aat gca tgg caa tta ttg gtt aga tct gaa gat aca ttt ggt aac cca 240
 Asn Ala Trp Gln Leu Leu Val Arg Ser Glu Asp Thr Phe Gly Asn Pro
 65 70 75 80
 55 aac gcc ata gtc act acc att att caa cct ttc aat gct aaa aag gat 288
 Asn Ala Ile Val Thr Thr Ile Ile Gln Pro Phe Asn Ala Lys Lys Asp
 85 90 95
 60 aag ctt gtt tct tat caa aca ttt gaa gat tct ggt aaa ttg gat tgt 336
 Lys Leu Val Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ser Gly Lys Leu Asp Cys
 100 105 110
 65 gct cca tca tat gct att caa tat gga tcg gac att tcg act ttg acc 384
 Ala Pro Ser Tyr Ala Ile Gln Tyr Gly Ser Asp Ile Ser Thr Leu Thr
 115 120 125
 70 act caa ggt gaa atg tac tac atc tct gct tta tta gat caa ggt tac 432
 Thr Gln Gly Glu Met Tyr Tyr Ile Ser Ala Leu Leu Asp Gln Gly Tyr
 130 135 140
 75 tat gtt gtc act cct gat tac gag ggt cca aag agt aca ttc act gta 480

ES 2 345 973 T3

	Tyr Val Val Thr Pro Asp Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Thr Phe Thr Val 145 150 155 160	
5	ggg ttg caa tca gga aga gct act ttg aat tcg ctt aga gct act ttg Gly Leu Gln Ser Gly Arg Ala Thr Leu Asn Ser Leu Arg Ala Thr Leu 165 170 175	528
10	aaa tca gga aac ttg act ggt gtt tca tca gac gct gag aca tta ttg Lys Ser Gly Asn Leu Thr Gly Val Ser Ser Asp Ala Glu Thr Leu Leu 180 185 190	576
15	tgg ggt tat tca gga gga agt ctt gct tca gga tgg gct gct gct ata Trp Gly Tyr Ser Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Trp Ala Ala Ala Ile 195 200 205	624
20	caa aaa gaa tat gct cca gag ttg agt aaa aac ttg ctt ggt gct gca Gln Lys Glu Tyr Ala Pro Glu Leu Ser Lys Asn Leu Leu Gly Ala Ala 210 215 220	672
25	ctt ggt gga ttc gtt aca aac att act gcc act gct gaa gct gtt gat Leu Gly Gly Phe Val Thr Asn Ile Thr Ala Thr Ala Glu Ala Val Asp 225 230 235 240	720
30	agt ggt cca ttt gca gga atc atc tcc aat gca ttg gct ggt att gga Ser Gly Pro Phe Ala Gly Ile Ile Ser Asn Ala Leu Ala Gly Ile Gly 245 250 255	768
35	aat gaa tac cct gat ttc aaa aac tat ctt ttg aaa aaa gtg tca cca Asn Glu Tyr Pro Asp Phe Lys Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Val Ser Pro 260 265 270	816
40	ttg ctt tca atc act tat cgt ttg gga aac act cac tgt ttg ctt gat Leu Leu Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Gly Asn Thr His Cys Leu Leu Asp 275 280 285	864
45	ggt ggt att gct tat ttc ggt aaa tca ttc ttt tcc aga att att aga Gly Gly Ile Ala Tyr Phe Gly Lys Ser Phe Phe Ser Arg Ile Ile Arg 290 295 300	912
50	tat ttc cct gat gga tgg gat ctt gtc aac caa gaa cct atc aaa acc Tyr Phe Pro Asp Gly Trp Asp Leu Val Asn Gln Glu Pro Ile Lys Thr 305 310 315 320	960
55	atc ttg caa gat aat gga ttg gtt tac caa cca aag gac ttg acc cca Ile Leu Gln Asp Asn Gly Leu Val Tyr Gln Pro Lys Asp Leu Thr Pro 325 330 335	1008
60	caa att cca tta ttc atc tac cac ggt acc ttg gat gca att gtc ccc Gln Ile Pro Leu Phe Ile Tyr His Gly Thr Leu Asp Ala Ile Val Pro 340 345 350	1056
65	att gtc aac tca aga aag aca ttc caa caa tgg tgt gat tgg gga ctc Ile Val Asn Ser Arg Lys Thr Phe Gln Gln Trp Cys Asp Trp Gly Leu 355 360 365	1104
	aaa tct ggt gaa tat aat gaa gat ttg acc aat gga cac att act gaa Lys Ser Gly Glu Tyr Asn Glu Asp Leu Thr Asn Gly His Ile Thr Glu 370 375 380	1152
	tca att gtg ggt gca cca gct gct ttg act tgg att atc aat cgt ttc Ser Ile Val Gly Ala Pro Ala Ala Leu Thr Trp Ile Ile Asn Arg Phe 385 390 395 400	1200
	aat gga cag cct cca gtt gat gga tgt caa cat aat gtg aga gct tca Asn Gly Gln Pro Pro Val Asp Gly Cys Gln His Asn Val Arg Ala Ser 405 410 415	1248

ES 2 345 973 T3

aac ttg gaa tat cca gga act cca caa tca atc aag aat tac ttt gaa 1296
 Asn Leu Glu Tyr Pro Gly Thr Pro Gln Ser Ile Lys Asn Tyr Phe Glu
 420 425 430

5 gct gca ttg cac gca att ttg ggc ttt gat ttg ggt cca gat gtt aag 1344
 Ala Ala Leu His Ala Ile Leu Gly Phe Asp Leu Gly Pro Asp Val Lys
 435 440 445

10 aga gat aag gtt act ttg ggc gga ttg ctc aag ttg gaa cgt ttt gct 1392
 Arg Asp Lys Val Thr Leu Gly Gly Leu Leu Lys Leu Glu Arg Phe Ala
 450 455 460

ttt cat cat cat cat cat cat taa 1416
 Phe His His His His His His
 465 470

15 <210> 4
 <211> 471
 <212> PRT

20 <213> *Candida parapsilosis*

<400> 4

25 Met Arg Tyr Phe Ala Ile Ala Phe Leu Leu Ile Asn Thr Ile Ser Ala
 1 5 10 15
 Phe Val Leu Ala Pro Lys Lys Pro Ser Gln Asp Asp Phe Tyr Thr Pro
 20 25 30
 Pro Gln Gly Tyr Glu Ala Gln Pro Leu Gly Ser Ile Leu Lys Thr Arg
 35 40 45
 Asn Val Pro Asn Pro Leu Thr Asn Val Phe Thr Pro Val Lys Val Gln
 50 55 60
 Asn Ala Trp Gln Leu Leu Val Arg Ser Glu Asp Thr Phe Gly Asn Pro
 65 70 75 80
 Asn Ala Ile Val Thr Thr Ile Ile Gln Pro Phe Asn Ala Lys Lys Asp
 85 90 95
 35 Lys Leu Val Ser Tyr Gln Thr Phe Glu Asp Ser Gly Lys Leu Asp Cys
 100 105 110
 Ala Pro Ser Tyr Ala Ile Gln Tyr Gly Ser Asp Ile Ser Thr Leu Thr
 115 120 125
 Thr Gln Gly Glu Met Tyr Tyr Ile Ser Ala Leu Leu Asp Gln Gly Tyr
 130 135 140
 40 Tyr Val Val Thr Pro Asp Tyr Glu Gly Pro Lys Ser Thr Phe Thr Val
 145 150 155 160
 Gly Leu Gln Ser Gly Arg Ala Thr Leu Asn Ser Leu Arg Ala Thr Leu
 165 170 175
 Lys Ser Gly Asn Leu Thr Gly Val Ser Ser Asp Ala Glu Thr Leu Leu
 180 185 190
 45 Trp Gly Tyr Ser Gly Gly Ser Leu Ala Ser Gly Trp Ala Ala Ile
 195 200 205
 Gln Lys Glu Tyr Ala Pro Glu Leu Ser Lys Asn Leu Leu Gly Ala Ala
 210 215 220
 Leu Gly Gly Phe Val Thr Asn Ile Thr Ala Thr Ala Glu Ala Val Asp
 225 230 235 240
 Ser Gly Pro Phe Ala Gly Ile Ile Ser Asn Ala Leu Ala Gly Ile Gly
 245 250 255
 Asn Glu Tyr Pro Asp Phe Lys Asn Tyr Leu Leu Lys Lys Val Ser Pro
 260 265 270
 55 Leu Leu Ser Ile Thr Tyr Arg Leu Gly Asn Thr His Cys Leu Leu Asp
 275 280 285
 Gly Gly Ile Ala Tyr Phe Gly Lys Ser Phe Phe Ser Arg Ile Ile Arg
 290 295 300
 Tyr Phe Pro Asp Gly Trp Asp Leu Val Asn Gln Glu Pro Ile Lys Thr
 305 310 315 320
 60 Ile Leu Gln Asp Asn Gly Leu Val Tyr Gln Pro Lys Asp Leu Thr Pro
 325 330 335

ES 2 345 973 T3

	Gln	Ile	Pro	Leu	Phe	Ile	Tyr	His	Gly	Thr	Leu	Asp	Ala	Ile	Val	Pro
				340					345					350		
	Ile	Val	Asn	Ser	Arg	Lys	Thr	Phe	Gln	Gln	Trp	Cys	Asp	Trp	Gly	Leu
			355					360					365			
5	Lys	Ser	Gly	Glu	Tyr	Asn	Glu	Asp	Leu	Thr	Asn	Gly	His	Ile	Thr	Glu
		370					375					380				
	Ser	Ile	Val	Gly	Ala	Pro	Ala	Ala	Leu	Thr	Trp	Ile	Ile	Asn	Arg	Phe
		385				390					395					400
	Asn	Gly	Gln	Pro	Pro	Val	Asp	Gly	Cys	Gln	His	Asn	Val	Arg	Ala	Ser
				405						410					415	
10	Asn	Leu	Glu	Tyr	Pro	Gly	Thr	Pro	Gln	Ser	Ile	Lys	Asn	Tyr	Phe	Glu
			420						425					430		
	Ala	Ala	Leu	His	Ala	Ile	Leu	Gly	Phe	Asp	Leu	Gly	Pro	Asp	Val	Lys
			435					440					445			
	Arg	Asp	Lys	Val	Thr	Leu	Gly	Gly	Leu	Leu	Lys	Leu	Glu	Arg	Phe	Ala
15		450					455					460				
	Phe	His	His	His	His	His	His									
		465					470									

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65