



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

(21) PI 0719072-7 A2



(22) Data de Depósito: 26/11/2007
(43) Data da Publicação: 03/12/2013
(RPI 2239)

(51) Int.Cl.:
C12N 9/20
C12P 7/40

(54) Título: MÉTODO PARA PREPARAR UM
POLIPEPTÍDEO, POLIPEPTÍDEO, E, MÉTODO PARA
REALIZAR UMA REAÇÃO CATALISADA POR LIPASE

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 28/11/2006 DK PA 2006 01560

(73) Titular(es): Novozymes A/S

(72) Inventor(es): Allan Svendsen, Jesper Brask, Kim Borch,
Leonardo De Maria, Michael Skjot, Shamkant Anant Patkar

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007062783 de
26/11/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/065060de
05/06/2008

“MÉTODO PARA PREPARAR UM POLIPEPTÍDEO, POLIPEPTÍDEO, E, MÉTODO PARA REALIZAR UMA REAÇÃO CATALISADA POR LIPASE”

CAMPO DA INVENÇÃO

5 A presente invenção refere-se a um polipeptídeo com atividade de enzima lipolítica e a um método para prepará-lo.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

WO8802775 descreve lipase B de *Candida antarctica* (CALB). Uppenberg, Hansen, Patkar, Jones, Structure 2, 293-308 (1994)
10 descrevem a sequência de aminoácidos e a estrutura tridimensional (3D) de CALB. A estrutura 3D foi encontrada no Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (RCSB PDB) (<http://www.rcsb.org/>), seu identificador sendo 1TCA.

 Variantes de CALB são descritas em Zhang et al. Prot. Eng.
15 2003, 16, 599-605; Lutz. 2004, Tetrahedron: Asymmetry, 15, 2743-2748; Qian e Lutz, JACS, 2005, 127, 13466-13467; e em WO 2004/024954.

WQ9324619 descreve uma lipase de *Hyphozyma sp.* Sequências de aminoácidos para outras lipases podem ser encontradas em UniProt [o Universal Protein Resource] com números de acesso Q4pep1,
20 Q7RYD2, Q2UE03, Q4WG73, Q6BVP4 e Q4HUY1.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

 Os inventores realizaram simulação de dinâmica molecular (MD) sobre a estrutura de 1TCA. A análise revela dois capuzes até agora desconhecidos com mobilidade notável, Capuz 1 consistindo dos resíduos de
25 135 ou 136 a 155 ou 160, e Capuz 2 consistindo dos resíduos 267-295. A simulação indicou uma forma semelhante a mais fechada em solução aquosa e uma forma mais totalmente aberta em solução em solvente orgânico. A análise revelou áreas importantes reveladas na estrutura 3D para afetar a atividade e a funcionalidade da lipase, e os inventores usaram isto para

projetar variantes de enzima lipolítica com atividade específica aumentada, particularmente para substratos volumosos (e.g. ésteres de um ácido ramificado ou ácido graxo de cadeia longa e/ou um álcool secundário) e/ou atividade aumentada em pH alto (mais alto que pH ótimo) e/ou enancioseletividade aumentada.

Ademais, os inventores têm selecionado resíduos de aminoácido e projetado variantes de enzima lipase baseado em um alinhamento de CALB com algumas sequências de lipase homólogas.

Consequentemente, a invenção proporciona um método para preparar um polipeptídeo, compreendendo

a) selecionar um polipeptídeo originário que tem atividade de enzima lipolítica e tem uma sequência de aminoácidos com pelo menos 30% de identidade com CALB (SEQ ID NO: 1),

b) selecionar um ou mais resíduos de aminoácido na sequência correspondendo a qualquer um dos resíduos 1, 13, 25, 38-51, 53-55, 58, 69-79, 91, 92, 96, 97, 99, 103, 104-110, 113, 132-168, 173, 187-193, 197-205, 215, 223-231, 242, 244, 256, 259, 261-298, 303, 305, 308-313, ou 315 de CALB (SEQ ID NO: 1),

c) alterar a sequência de aminoácidos selecionada sendo que a alteração compreende substituição ou deleção do(s) resíduo(s) selecionado(s) ou inserção de pelo menos um resíduo adjacente ao(s) resíduo(s) selecionado(s),

d) preparar um polipeptídeo alterado tendo a sequência de aminoácidos alterada,

e) determinar a atividade de enzima lipolítica ou a enancioseletividade para ligações de éster carboxílico do polipeptídeo alterado, e

f) selecionar um polipeptídeo alterado que tem atividade de enzima lipolítica mais alta ou uma enancioseletividade mais alta do que a do

polipeptídeo originário.

A invenção também proporciona um polipeptídeo que:

a) tem atividade de enzima lipolítica, e

b) tem uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos

5 80% de identidade (particularmente pelo menos 90% ou pelo menos 95% de identidade) com CALB (SEQ ID NO: 1) e tem uma diferença de CALB (SEQ ID NO: 1) que compreende uma substituição, deleção ou inserção de aminoácido em uma posição correspondendo a qualquer um dos resíduos
10 1,13, 25, 38-51, 53-55, 58, 69-79, 91, 92, 96, 97, 99, 103, 104-110, 113, 132-168, 173, 187-193, 197-205, 215, 223-231, 242, 244, 256, 259, 261-298, 303, 305, 308-313, ou 315.

Finalmente, a invenção proporciona o uso do polipeptídeo variante acima em um processo catalisado por lipase.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

15 Fig. 1 mostra um alinhamento de sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS. 1-7.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Polipeptídeo originário

20 O polipeptídeo originário tem atividade de enzima lipolítica e tem uma sequência de aminoácidos com pelo menos 30% de identidade (particularmente pelo menos 40%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90%) com lipase B de *Candida antarctica* (CALB, SEQ ID NO: 1) que é descrita em WO8802775, e cuja sequência é dada em Uppenberg, J., Hansen, M.T., Patkar, S., Jones, T.A.,
25 Structure v2 pp. 293-308, 1994. O polipeptídeo originário pode ser qualquer uma das seguintes lipases. Um alinhamento é mostrado em Fig. 1.

SEQ ID NO: 1: lipase B de *Candida antarctica* (CALB),

1TCA

SEQ ID NO: 2: *Hyphozyma sp.*, WQ9324619

SEQ ID NO: 3: *Ustilago maydis*, UniProt Q4pep1

SEQ ID NO: 4: *Gibberella zeae* (*Fusarium graminearum*),
UniProt Q4HUY1

SEQ ID NO: 5: *Debaryomyces hansenii*, UniProt Q6BVP4

5 SEQ ID NO: 6: *Aspergillus fumigatus*, UniProt Q4WG73

SEQ ID NO: 7: *Aspergillus oryzae*, UniProt Q2UE03

SEQ ID NO: 8: lipase de *Neurospora crassa*, UniProt
Q7RYD2

O alinhamento foi feito usando o programa agulha do pacote
10 EMBOSS (<http://www.emboss.org>) versão 2.8.0 com os seguintes
parâmetros: Penalidade de abertura de lacuna: 10,00, Penalidade de extensão
de lacuna: 0,50, Matriz de substituição: EBLOSUM62. O programa de
computador é descrito em *EMBOSS: The European Molecular Biology Open
Software Suite (2000)*, Rice, P. Longden J. e Bleasby A, Trends in Genetics 16,
15 (6) pp276-277. O programa agulha implementa o algoritmo de alinhamento
global descrito em Needleman, S. B. e Wunsch, C. D. (1970) J. Mol. Biol. 48,
443-453, e Kruskal, J. B. (1983).

Outros polipeptídeos originários podem alinhar com as
sequências em Fig. 1 pelo mesmo método ou pelos métodos descritos em D.
20 Sankoff e J. B. Kruskal, (ed.), "Time warps, string edits and macromolecules:
the theory and practice of sequence comparison", pp. 1-44 Addison Wesley.

Capuzes e estrutura tridimensional (3D)

Em 1TCA de estrutura 3D, os inventores identificaram dois
capuzes com mobilidade alta em resíduos de aminoácido de 135 ou 136 a 155
25 ou 160 (Capuz 1) e resíduos 267-295 (Capuz 2) de SEQ ID NO: 1. A
simulação MD indicou que as seguintes regiões são de interesse particular por
causa de uma mobilidade particularmente alta: resíduos 141-149 em Capuz 1
e as seguintes regiões em Capuz 2: 267-269, 272, 275-276, 279-280, 282-283,
286-290.

Seleção de resíduo de aminoácido

Um resíduo de aminoácido pode ser selecionado tendo um átomo de não-hidrogênio dentro de 0,8 nm de um átomo de não-hidrogênio em Capuz 1 ou Capuz 2 em uma estrutura 3D. Este critério seleciona os seguintes resíduos na estrutura 1TCA: 38-51, 53-55, 58, 69-79, 104-110, 113, 132-168, 173, 187-193, 197-205, 223-231, 259, 261-298, 305, 308-313, 315 de SEQ ID NO: 1.

O resíduo pode ser particularmente selecionado dentro de 0,6 nm dos capuzes, levando aos seguintes resíduos em 1TCA: 40-42, 46-51, 54, 58, 70-77, 79, 104-107, 109, 133-165, 167, 173, 187-192, 197-203, 223-225, 228-229, 261-297, 308-312.

Um resíduo de aminoácido também pode ser selecionado pelo alinhamento de sequências de enzima lipolítica homólogas e seleção de um resíduo em uma posição com variabilidade, i.e. uma posição onde sequências diferentes têm resíduos diferentes. Assim, os seguintes resíduos em CALB (SEQ ID NO: 1) podem ser selecionados por uma comparação com *Hyphozyma* lipase (SEQ ID NO: 2) baseado no alinhamento mostrado em Fig. 1: 1, 3, 5, 10, 12-15, 25, 30, 31, 32, 57, 62, 66, 76, 78, 80, 83, 88, 89, 91, 92, 96, 97, 114, 121, 123, 143, 147-149, 159, 163, 164, 168, 169, 174, 188, 194, 195, 197, 199, 205, 210, 214, 215, 221, 223, 229, 238, 242, 244, 249, 251, 254, 256, 261, 265, 268, 269, 212-21 A, 277-280, 282-284, 287, 303-306, 309, 314, 315, 317.

Os seguintes resíduos são de interesse especial: 1,13, 25, 38, 42, 74, 140, 143, 147, 164, 168, 190, 199, 215, 223, 242, 244, 256, 265, 277, 280, 281, 283, 284, 285, 292, 303, 315 de CALB (SEQ ID NO: 1).

Resíduos correspondentes em outras lipases podem ser identificados de um alinhamento de sequência. Um alinhamento de várias sequências é mostrado em Fig. 1. Outras sequências podem ser alinhamentos por métodos conhecidos, tais como AlignX (um componente do vetor nti suite

9.0.0) usando ajustes padrão.

Sequência de aminoácidos alterada

A sequência de aminoácidos alterada é derivada da sequência originária pela realização de alteração de um aminoácido em uma ou mais posições selecionadas, e opcionalmente também em outras posições. Cada alteração de aminoácido consiste de substituição ou deleção do resíduo selecionado ou inserção de pelo menos um resíduo adjacente ao resíduo selecionado no lado N- ou C-terminal.

Substituições particulares

As seguintes alterações em SEQ ID NO: 1 podem ser opcionalmente combinadas:

- K13Q, A25G, P38V,L,S, T42N, N74Q, V78I, Y91S, A92S, N96S, L99V, W104H, D134L,M,N, T138L, L140E, P143S,L, D145S, A146T, L147N,F, A148P, V149P, S150A, W155Q,N, Q157N, T158S, L163F, T164V, R168D, V190I.A, S197L,G, L199P, V215I, D223G, T229Y, R242A, T244P, T256K, L261A, D265P, P268A, E269Q, L277I, P280V, A281S, A283K, A284N, I285E,D, G288D, N292C,Q, P303K, K308D, otV315I.

- Substituições múltiplas:
 - I258D G288D
 - S197GL199P
 - T164VL163F
 - V190XQ157X
 - A281XW155X
 - D223XA281X
 - D223XI285X
 - A281X I285X
 - A281XW155XA148X
 - D145XK308XK138X

- D223XA281XI285X

- Inserções: L147FN, G137ASV, V190GAH, L1QL, L1QGPL

- Deleção: N97*

5 Baseado no alinhamento tal como aquele mostrado em Fig. 1, uma sequência pode ser usada como um modelo para alterações em outra sequência. Assim, Capuz 1 ou Capuz 2 de uma sequência pode ser substituído pela região de capuz correspondente de outra sequência. As seguintes variantes são projetadas pela alteração de Capuz 1 de CALB usando o

10 polipeptídeo indicado como modelo:

- Q7RYD2 (*Neurospora crassa*) como modelo: Y135F K136H V139M G142Y P143G D145C L147G A148N V149F S150GKVAKAGAPC A151P W155L

15 G142N P143I L144G D145G L147T A148G V149L S150IN A151T S153A W155V

- lipase de *Hyphozyma sp.* como modelo: L140E P143L L147F A148G V149L.

20 P143L D145S A146T L147F A148G V149L S150A A151S P152Q.

Cada uma das variantes acima pode ser opcionalmente combinada com N292C e/ou D223G e/ou A281S e/ou I285E.

25 As seguintes substituições podem ser feitas em SEQ ID NO: 2 (lipase de *Hyphozyma sp.*): V192I, Q159N, D136L,M,N, P41V.L, S50A, N45S, W106H.

Nomenclatura para alterações de aminoácido

Neste relatório descritivo, uma substituição de aminoácido é descrita pelo uso de códigos de uma letra, e.g. W155Q. X é usado para indicar uma substituição com qualquer resíduo diferente (e.g. V190X). Substituições

múltiplas são concatenadas, e.g. S197G L199P para indicar uma variante com duas substituições. Alternativas são indicadas por vírgulas, e.g. W155Q,N para indicar uma substituição de W155 com Q ou N. Um asterisco indica uma deleção. Uma inserção é indicada como substituição de um resíduo com dois
 5 ou mais resíduos (e.g. L147FN)

Atividade de enzima lipolítica

Os polipeptídeos originários e variante têm atividade de enzima lipolítica (particularmente atividade de lipase), i.e. são capazes de hidrolisar ligações éster carboxílico para liberar carboxilato (EC 3.1.1),
 10 particularmente ligações éster em triglicerídeos (atividade de triacil-glicerol-lipase, EC 3.1.1.3).

A atividade de enzima pode ser expressada como atividade específica, i.e. atividade hidrolítica por mg de proteína enzima. A quantidade de proteína enzima pode ser determinada e.g. da absorção a 280 nm ou por
 15 titulação de sítio-ativo (AST), como descrito por Rotticci et al. Biochim. Biophys. Acta 2000, 1483, 132-140.

Enancioseletividade

Enancioseletividade é muitas vezes um parâmetro importante em reações catalisadas por CaLB, tanto na hidrólise quanto na direção de
 20 síntese. O substrato pode ser uma mistura racêmica de dois enanciômeros, ou pode ser uma forma meso pró-quiral. Em ambos os casos um produto de enanciômero único é muitas vezes desejado. Excesso enanciomérico (ee) é medido pela quantificação da quantidade de ambos os produtos enancioméricos, e então calculando $ee = (\text{rendimento de enanciômero desejado} - \text{rendimento de outro enanciômero}) / (\text{soma de ambos os rendimentos})$. A quantificação é muitas vezes por cromatografia gasosa (GC) quiral ou cromatografia líquida de desempenho alto (HPLC).
 25

Uso de variante de enzima lipolítica

A variante de enzima lipolítica pode ser usada para biocatálise

em uma reação catalisada por lipase, tanto em hidrólise de éster quanto em reações de síntese, e.g. em síntese de alguns polímeros. A reação catalisada por lipase pode ser:

a) hidrólise com um éster de ácido carboxílico e água como reagentes, e um ácido carboxílico livre e um álcool como produtos,

b) síntese de éster com um ácido carboxílico livre e um álcool como reagentes, e um éster de ácido carboxílico como produto,

c) alcoólise com um éster de ácido carboxílico e um álcool como reagentes, ou

d) acidólise com um éster de ácido carboxílico e um ácido graxo livre como reagentes.

Como CALB, a variante da invenção pode ser particularmente usada em aplicações onde quimio-, regio-, e/ou estereosseletividade, estabilidade e velocidade de reação de enzima ou a capacidade para aceitar uma variedade relativamente ampla de substratos é importante. Os produtos de reação são tipicamente usados na indústria química, de química fina, farmacêutica, ou agroquímica, ou como ingredientes de alimento. A variante pode estar imobilizada, e.g. por adsorção sobre uma resina adsorvente tal como polipropileno.

O éster na reação catalisada por lipase pode ter um grupo ácido volumoso ou uma parte de álcool secundário ou volumoso, tal como 2-Me-butirato de pNP, octanoato de 6,8-difluoro-4-metil-umbeliferila (octanoato de DiFMU) ou um iso-propil-éster de ácido graxo iso- (e.g. ácido C₁₆-C₁₈ graxo que pode ser saturado ou insaturado).

A variante pode ser usada como descrito para CALB em A. J. J. Straathof, S. Panke, A. Schmid. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2002**, *13*, 548-556; E. M. Anderson, K. M. Larsson, O. Kirk. *Biocat. Biotrans.* **1998**, *16*, 181-204; R. A. Gross, A. Kumar, B. Kaira. *Chem. Rev.* **2001**, *101*, 2097-2124).

EXEMPLOS

Exemplo 1: Seleção de resíduos de aminoácido por dinâmica molecular

Foram encontradas a partir de simulações de dinâmica molecular 2 regiões de importância alta para a atividade de lipase B de *Candida antarctica*, como segue.

5 CHARMm foi usado para preparar a estrutura de 1TCA para as simulações. Átomos de hidrogênio foram adicionados em ambas proteína e águas usando o comando HBUILD. O sistema foi embebido em moléculas de água explícitas e confinado em uma caixa cúbica de lado igual a 9,0 nanômetros. Houve no total 24630 moléculas de água incluindo aquelas já
10 presentes na estrutura de 1TCA. Uma simulação em temperatura constante, 300K, e pressão constante, 102,668 quilopascas, foi realizada por um total de 20 nanossegundos usando NAMD. Método de copulação de Berendsen foi usado para manter a temperatura e a pressão nos valores desejados. Os resultados da estimulação foram então analisados usando CHARMm
15 (Referências para CHARMM: MacKerell, A. D., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L, Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L, Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C, Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., Reiher, W. E., Roux, B., Schlenkrich, M., Smith, J. C, Stote, R., Straub, J., Watanabe, M.,
20 Wiorkiewicz-Kuczera, J., Yin, D., Karplus, M. *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 3586; MacKerell, A. D., Jr., Brooks, B., Brooks, C. L, III, Nilsson, L, Roux, B., Won, Y., Karplus, M. Em *The Encyclopedia of Computational Chemistry*; Schleyer, P. v. R. et al., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1998; Vol. 1, p 271; Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J.,
25 Swaminathan, S., Karplus, M. *J. Comput. Chem.* **1983**, *4*, 187).

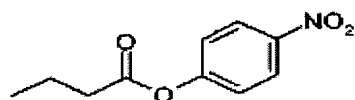
A análise revelou até agora capuzes desconhecidos com mobilidade alta. Foi verificado que várias regiões se movem quando a enzima está em solução. Foi concluído que a especificidade e a funcionalidade da enzima são dependentes desta mobilidade e a estrutura específica no meio

escolhido para a hidrólise ou a reação de síntese. A simulação indicou uma forma semelhante a mais fechada em solução aquosa e uma forma mais totalmente aberta em solução em solvente orgânico, i.e. mais semelhante à estrutura cristalina em solução aquosa contendo algum tensoativo.

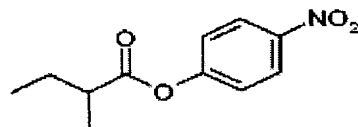
5 Uso de cálculo do Quadrado da Média da Raiz dos Deslocamentos isotrópicos para os átomos de C-alfa dos resíduos em CALB ao longo da simulação mencionada acima, regiões com mobilidade aumentada foram identificadas. As regiões de capuz móveis encontradas foram resíduos 136-160 para Capuz 1 e resíduos 267-295 para Capuz 2. Foi concluído que os
10 resíduos na vizinhança destes capuzes novos interagem com a mobilidade de capuz e são assim muito importantes para a atividade de enzima.

Exemplo 2: Reações de hidrólise

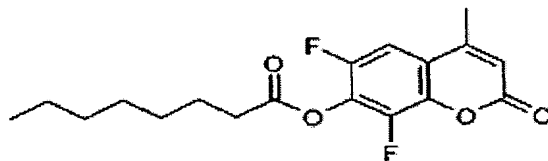
Atividade hidrolítica das variantes foi avaliada em butirato de pNP, 2-metil-butirato de pNP racêmico, e octanoato de 6,8-difluoro-4-metil-umbeliferila (octanoato de DiFMU). 2-Me-butirato de pNP racêmico foi
15 sintetizado de acordo com *J. Biol. Chem.* **1971**, 246, 6019-6023. Octanoato de DiFMU, adquirido de Molecular Probes, tem sido previamente relatado por Lutz *et al.* (*J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 13466-13467) em ensaios de CALB. Enquanto que 2-Me-butirato de pNP seleciona variantes com aceitação
20 melhorada de substratos com um grupo ácido volumoso, octanoato de DiFMU seleciona variantes com aceitação melhorada de uma parte de álcool volumosa. Reações foram realizadas em tampão aquoso de fosfato 50 mM, pH 7,0 com 0,1% de Triton X-100. Cinética de reação foi seguida por aproximadamente 15 min em placas de microtítulo, medindo a 405 nm (pNP)
25 ou 350/485 nm (ex/em para DiFMU). Atividades foram normalizadas baseado em A_{280} de enzima.



butirato de pNP



2-Me-butyrate de pNP



Octanoato de DiFMU

Resultados são mostrados abaixo como atividade para vários substratos em % de CALB de tipo selvagem.

Variante	Butirato de pNP	2-Me-butyrate de pNP	Octanoato de DiFMU
N74Q	77	113	110
P143S	50	113	42
A281S	215	232	208
P38S	35	107	44
N292Q	73	158	105
L1QGPL	63	144	85
L1QL	65	193	49
I285E	233	332	236
L147F	98	232	90
L147N	79	178	79
N292C	80	282	90
L140E	51	151	79
P143L	79	192	112
A146T	55	126	42
P280V	48	100	36
A283K	104	115	94
A284N	65	125	19
T103G, A148P	70	167	0
W104H, A148P	11	146	0
N74Q, A281S	88	156	0
V190A	64	143	
L199P	74	162	75
T256K	105	120	79
T42N	35	216	47
R242A	24	119	39
V215I	105	133	43
T164V	75	130	80
L163F, T164V	81	160	92
D265P	28	117	44
P303K	35	108	50
R168D	62	122	53
A25G	66	111	26
V315I	65	102	19

T244P	56	146	20
K13Q	56	122	39
L277I	53	137	51
Y91S, A92S, N96S, N97*, L99V	39	135	76
D223G	830	3621	820
originário (CALB)	100	100	100

Os resultados demonstram que a atividade específica para um substrato volumoso (éster com um ácido graxo ramificado) pode ser aumentada em até 37 vezes pela substituição de um único resíduo de aminoácido selecionado.

5 Exemplo 3: Variantes com substituição de capuz

Variantes baseadas em CaLB de tipo selvagem (SEQ ID NO: 1) foram projetadas pela substituição de capuz 1 pelos resíduos correspondentes da lipase de *Fusarium* (SEQ ID NO: 4), da lipase de *Debaryomyces* (SEQ ID NO: 5) ou da lipase de *Neurospora* (SEQ ID NO: 8).

10 Outras variantes foram projetadas pela combinação desta com uma única substituição de um resíduo selecionado (A281S). Resultados são expressados como atividade em % de atividade de CALB sobre o mesmo substrato.

Variante	butirato de pNP	2-Me-butirato de pNP	octanoato de DiFMU
V139I, G142N, P143I, L144G, D145G, L147T, A148G, V149L, S150IN, A151T, S153A, W155V	187	661	836
Y135F, V139R, L140M, A141V, G142P, P143V, D145C, A146P, L147S, A148F, V149P, S150KLSC, A151P, W155L	62	306	14
Y135F, K136H, V139M, G142Y, P143G, D145C, L147G, A148N, V149F, S150GKVAKAGAPC, A151P, W155L	341	1223	14
V139I, G142N, P143I, L144G, D145G, L147T, A148G, V149L, S150IN, A151T, S153A, W155V, A281S	1052	1612	631
Y135F, K136H, V139M, G142Y, P143G, D145C, L147G, A148N, V149F, S150GKVAKAGAPC, A151P, W155L, A281S	378	2397	76

Os resultados demonstram que a atividade específica para um substrato volumoso pode ser significativamente aumentada pela substituição do capuz de uma lipase pelo capuz de outra lipase, e que esta pode ser

adicionalmente aumentada pela combinação com uma única substituição de um resíduo selecionado.

Exemplo 4: Enancioseletividade

Reações de hidrólise foram realizadas em escala de 2 mL usando 2-Me-butirato de pNP 2 mM como substrato em tampão fosfato de sódio, 0,5 M pH 7,0 com 1% de Triton X-100. As reações foram interrompidas pela adição de HCl 2 M (0,1 mL), e então extraídas em Et₂O (2 mL). Após análise por GC quiral (coluna Varian CP-Chiralsil-DEX CB 10 m, programa de temperatura 80 a 180°C a 2 °C/min), E (razão enantiomérica) foi calculada como $E = \ln[ee_p(1-ee_s)/(ee_p+ee_s)] / \ln[ee_p(1+ee_s)/(ee_p+ee_s)]$, com ee_s e ee_p sendo ee (excesso enantiomérico) para substrato e produto, respectivamente. Reações foram realizadas em tripletos para cada enzima (interrompida em conversões diferentes) e E relatado como uma média.

CALB foi testada e comparada com variante Y135F, K136H, V139M, G142Y, P143G, D145C, L147G, A148N, V149F, S150GKVAKAGAPC, A151P, W155L. Os resultados foram E=2,4 para a variante e E=1,05 para a lipase originária (CALB), mostrando que CALB é quase inteiramente não-seletiva, mas a variante tem uma enancioseletividade aumentada.

Exemplo 5: Hidrólise de éster de ácido graxo de cadeia longa

Constantes de Michaelis-Menten foram determinadas para uma variante de CALB com laurato de pNP como um substrato de cadeia longa. Experimentos foram realizados em tampão fosfato de sódio 0,5 M, pH 7,0, contendo 1% de Triton X-100 (para evitar soluções turvas em concentrações de substrato altas).

	k_{cat} (S ⁻¹)	K_M (micro-M)	k_{cat}/K_M (s ⁻¹ M ⁻¹)
originário (caLB)	3,1	535	$0,58 \cdot 10^4$
V139I, G142N, P143I, L144G, D145G, L147T, A148G, V149L, S150IN, A151T, S153A, W155V	23	170	$14 \cdot 10^4$

Os resultados mostram que a variante é 23 vezes mais ativa do

que a lipase originária sobre substrato de cadeia longa (medido como k_{cat} / K_M).

Exemplo 6: Hidrólise de iso-propil-éster

A variante usada no exemplo prévio também foi testada em hidrólise de palmitato de iso-propila. Os resultados mostraram que a hidrólise foi 26% mais alta para a variante do que para CALB. A hidrólise foi realizada como segue:

Como substrato, palmitato de isopropila foi adicionado em uma concentração de 3 mg/ml em Acetato de Na 50 mM Na de pH 5,0 (= tampão), aquecido a 60°C por 5 minutos e homogeneizado por Ultra Turrax por 45 segundos e usado imediatamente após a preparação. Preparações de enzima purificada foram diluídas para uma concentração correspondendo a OD280=0,00016 em água dessalinizada e 10 ppm de Triton X-100. Em placas para PCR 20 micro-L de tampão, 60 micro-L de substrato e 20 micro-L de solução de enzima foram misturados a 800 RPM por 20 segundos e transferidos para um termociclizador de PCR por 30 minutos de reação a 30°C seguido por 5 minutos a 90°C para inativar as enzimas e adição de 20 micro-L de solução 10% de TritonX100 (em água dessalinizada). A quantidade para ácidos graxos produzidos foi determinada usando o kit NEFA C de Wako e resultados foram calculados como uma média de 6 determinações e subtração do branco de enzima.

Exemplo 7: Atividade em pH alto

Atividade de lipase de duas variantes de CALB foi medida em vários pH a 30°C com tributirina como substrato e goma arábica como emulsificador. Os resultados são expressados como atividade relativa, considerando a atividade em pH 7,0 como 100.

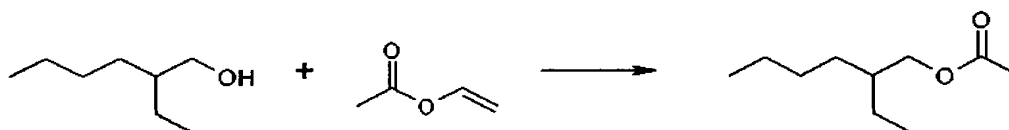
	pH5,0	pH6,0	pH7,0	pH8,0	pH9,0
Y135F, K136H, V139M, G142Y, P143G, D145C, L147G, A148N, V149F, S150GKVAKAGAPC, A151P, W155L	53	97	100	90	151
V139I, G142N, P143I, L144G, D145G, L147T, A148G, V149L, S150IN, A151T, S153A, W155V	41	76	100	99	148
Lipase originária (CALB)	47	62	100	60	49

É visto que as variantes têm atividade aumentada em pH alcalino (pH 7-9) e um ótimo pH mais alto.

Exemplo 8: Reações de síntese

As variantes foram imobilizadas em polipropileno poroso Accurel por adsorção física para uma carga de 20 mg/g (baseada em A280). Reações foram realizadas em tubos Eppendorf com 1 mmol de cada reagente, aproximadamente 0,8 mL de hexano, e 5 mg de enzima imobilizada @ 40 °C, 1200 rpm. Amostras foram retiradas para análise por NMR e GC quiral.

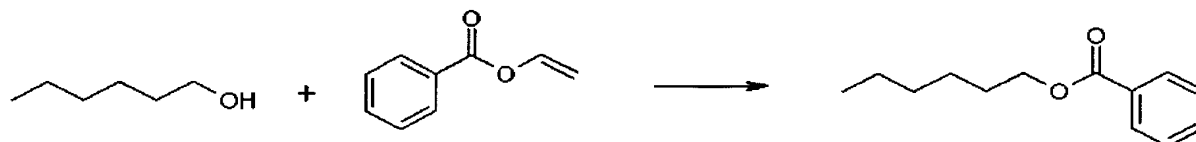
Resultados de uma reação de síntese com 2-etil-1-hexanol e acetato de vinila como reagentes são mostrados abaixo como conversão % (ee%):



Variante	15 min	30 min	1 h	2 h	3 h
originária (CaLB)	11 (32)	24 (27)	43 (22)	61 (17)	63(17)
Y135F K136H V139M G142Y P143G D145C L147G A148N V149F S150GKVAKAGAPCA151PW155L	6(46)	13(46)	24 (45)	41 (40)	52 (38)
V139I G142N P143I L144G D145G L147T A148G V149L S150IN A151T S153AW155V	0,1 (51)	6(49)	12(50)	22 (49)	33 (48)

A razão enantiomérica foi calculada pela fórmula dada acima. Os resultados foram E=1,9 para a lipase originária (CALB), e E=3,0 e E=3,2 para as duas variantes. Assim, os resultados mostram enantiosseletividade melhorada para as duas variantes.

Outro experimento foi feito na mesma maneira, mas com benzoato de vinila e 1-hexanol como reagentes.



Após 72 horas, foi verificada uma conversão de 17% para a variante I285E, enquanto que a CALB originária deu 9%.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Novozymes A/S
 <120> Variantes de enzima lipolítica
 <130> 10617-WO
 <160> 8
 <170> Patent In version 3.4
 <210> 1
 <211> 317
 <212> PRT
 <213> Candida antarctica
 <400> 1
 Leu Pro Ser Gly Ser Asp Pro Ala Phe Ser Gln Pro Lys Ser Val Leu
 1 5 10 15
 Asp Ala Gly Leu Thr Oys Gln Gly Ala Ser Pro Ser Ser Val Ser Lys
 20 25 30
 Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Thr Thr Gly Pro Gln Ser Phe
 35 40 45
 Asp Ser Asn Trp Ile Pro Leu Ser Thr Gln Leu Gly Tyr Thr Pro Oys
 50 55 60
 Trp Ile Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Thr Gln Val Asn Thr
 65 70 75 80
 Glu Tyr Met Val Asn Ala Ile Thr Ala Leu Tyr Ala Gly Ser Gly Asn
 85 90 95
 Asn Lys Leu Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Val Ala Gln
 100 105 110
 Trp Gly Leu Thr Phe Phe Pro Ser Ile Arg Ser Lys Val Asp Arg Leu
 115 120 125
 Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Val Leu Ala Gly Pro Leu
 130 135 140
 Asp Ala Leu Ala Val Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr Thr Gly
 145 150 155 160
 Ser Ala Leu Thr Thr Ala Leu Arg Asn Ala Gly Gly Leu Thr Gln Ile
 165 170 175
 Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Ile Val Gln Pro
 180 185 190
 Gln Val Ser Asn Ser Pro Leu Asp Ser Ser Tyr Leu Phe Asn Gly Lys
 195 200 205

Asn Val Gln Ala Gln Ala Val Oys Gly Pro Leu Phe Val Ile Asp His
210 215 220

Ala Gly Ser Leu Thr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Arg Ser Ala
225 230 235 240

Leu Arg Ser Thr Thr Gly Gln Ala Arg Ser Ala Asp Tyr Gly Ile Thr
245 250 255

Asp Oys Asn Pro Leu Pro Ala Asn Asp Leu Thr Pro Glu Gln Lys Val
260 265 270

Ala Ala Ala Ala Leu Leu Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ile Val Ala Gly
275 280 285

Pro Lys Gln Asn Oys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg Pro Phe
290 295 300

Ala Val Gly Lys Arg Thr Oys Ser Gly Ile Val Thr Pro
305 310 315

<210> 2

<211> 319

<212> PRT

<213> Hyphozyma sp.

<400> 2

Phe Thr Pro Phe Pro Thr Gly Ala Asp Pro Ala Phe Thr Gln Ser Gln
1 5 10 15

Ala Thr Leu Asp Ala Gly Leu Thr Oys Gln Ser Gly Ser Pro Ser Ser
20 25 30

Gln Lys Asn Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Asn Thr Gly Pro
35 40 45

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

Ser Pro Oys Trp Val Ser Pro Pro Pro Phe Met Leu Asn Asp Ser Gln
65 70 75 80

Ile Asn Ala Glu Tyr Ile Val Asn Ala Ile His Thr Leu Ser Ser Gly
85 90 95

Ser Gly Ser Lys Val Pro Val Leu Thr Trp Ser Gln Gly Gly Leu Ala
100 105 110

Ala Gln Trp Ala Leu Thr Phe Phe Pro Ser Thr Arg Asn Lys Val Asp
115 120 125

Arg Leu Met Ala Phe Ala Pro Asp Tyr Lys Gly Thr Val Glu Ala Gly
130 135 140

Leu Leu Asp Ala Phe Gly Leu Ser Ala Pro Ser Val Trp Gln Gln Thr
145 150 155 160

Ala Gln Ser Ala Phe Val Thr Ala Leu Asp Gln Ala Gly Gly Leu Asn
165 170 175

Gln Ile Val Pro Thr Thr Asn Leu Tyr Ser Ala Thr Asp Glu Val Val
180 185 190

Gln Pro Gln Phe Ala Asn Gly Pro Pro Asp Ser Ser Tyr Leu Ser Asn
195 200 205

Gly Lys Asn Ile Gln Ala Gln Ser Ile Cys Gly Pro Leu Phe Ile Ile
210 215 220

Gly His Ala Gly Ser Leu Tyr Ser Gln Phe Ser Tyr Val Val Gly Lys
225 230 235 240

Ser Ala Leu Ala Ser Pro Thr Gly Gln Ala Gln Ser Ser Asp Tyr Ser
245 250 255

Ile Lys Asp Cys Asn Pro Ala Pro Ala Asn Pro Leu Thr Ala Gln Gln
260 265 270

Lys Leu Asp Ser Ala Ala Ile Ile Leu Val Ala Gly Lys Asn Ile Val
275 280 285

Thr Gly Pro Lys Gln Asn Cys Glu Pro Asp Leu Met Pro Tyr Ala Arg
290 295 300

Lys Tyr Arg Ile Gly Lys Lys Thr Cys Ser Gly Val Ile Thr Gly
305 310 315

<210> 3

<211> 336

<212> PRT

<213> Ustilago maydis

<400> 3

Met Lys Thr Thr Ser Val Ile Ser Ala Leu Val Thr Leu Ala Ser Ile
1 5 10 15

Ile Arg Ala Ala Pro Leu Ala Ser Ser Asp Pro Ala Phe Ser Thr Pro
20 25 30

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

Ser Gln Thr Lys Pro Ile Leu Leu Val Pro Gly Thr Gly Ala Asn Gly
50 55 60

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

<210> 4
 <211> 445
 <212> PRT
 <213> Gibberella zeae

<400> 4

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

```
<210> 5
<211> 455
<212> PRT
<213> Debaromyces hansenii
<400> 5
```

H s Pro Thr Lys Glu Leu Glu Arg Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asp
1 5 10 15
Asp Ile Val Asn Ser Thr Ile Asp Asn Gly Glu Ala His Lys Asp Asn
20 25 30
Ala Lys Ser Ala Ile Thr Asp Ile Phe Asp Lys Ile Asn Asp Gly Ile
35 40 45

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

Ala Tyr Val Pro Thr Thr Ser Ile Tyr Ser Gly Phe Asp Glu Ile Val
325 330 335

Gln Pro Gln Ser Gly Lys Gly Ala Ser Gly Leu Ile Asn Asp Asn Arg
340 345 350

Asn Val Gly Val Thr Asn Asn Glu Val Gln Thr Ile Cys Pro Asp Arg
355 360 365

Pro Ala Gly Lys Tyr Tyr Thr His Glu Gly Val Leu Tyr Asn Pro Val
370 375 380

Gly Tyr Ala Leu Ala Val Asp Ala Leu Thr His Glu Gly Pro Gly Gln
385 390 395 400

Leu Ser Arg Ile Asp Leu Asp Thr Glu Cys Gly Arg Ile Val Pro Asp
405 410 415

Gly Leu Thr Tyr Thr Asp Leu Leu Ala Thr Glu Ala Leu Ile Pro Glu
420 425 430

Ala Leu Val Leu Ile Leu Ser Tyr Asp Asp Lys Thr Arg Asp Glu Pro
435 440 445

Glu Ile Arg Ser Tyr Ala Gln
450 455

<210> 6

<211> 440

<212> PRT

<213> *Aspergillus fumigatus*

<400> 6

Ala Val Ile Pro Arg Gly Ala Val Pro Val Ala Ser Asp Leu Ser Leu
1 5 10 15

Val Ser Ile Leu Ser Ser Ala Ala Asn Asp Ser Ser Ile Glu Ser Glu
20 25 30

Ala Arg Ser Ile Ala Ser Leu Ile Ala Ser Glu Ile Val Ser Lys Ile
35 40 45

Gly Lys Thr Glu Phe Ser Arg Ser Thr Lys Asp Ala Lys Ser Val Gln
50 55 60

Glu Ala Phe Asp Lys Ile Gln Ser Ile Phe Ala Asp Gly Thr Pro Asp
65 70 75 80

Phe Leu Lys Met Thr Arg Glu Ile Leu Thr Val Gly Leu Ile Pro Ala
85 90 95

Asp Ile Val Ser Phe Leu Asn Gly Tyr Leu Asn Leu Asp Leu Asn Ser
100 105 110

Ile His Asn Arg Asn Pro Ser Pro Lys Gly Gln Ala Ile Tyr Pro Val
 115 120 125
 Lys Ala Pro Gly Asp Ala Arg Tyr Ser Val Ala Glu Asn Ala Leu Arg
 130 135 140
 Ala Ala Ile His Ile Pro Ala Ser Phe Gly Tyr Gly Lys Asn Gly Lys
 145 150 155 160
 Lys Pro Val Ile Leu Val Pro Gly Thr Ala Thr Pro Ala Gly Thr Thr
 165 170 175
 Tyr Tyr Phe Asn Phe Gly Lys Leu Gly Ser Ala Ala Asp Ala Asp Val
 180 185 190
 Val Trp Leu Asn Ile Pro Gln Ala Ser Leu Asn Asp Val Gln Ile Asn
 195 200 205
 Ser Glu Tyr Val Ala Tyr Ala Ile Asn Tyr Ile Ser Ala Ile Ser Glu
 210 215 220
 Ser Asn Val Ala Val Leu Ser Trp Ser Gln Gly Gly Leu Asp Thr Gln
 225 230 235 240
 Trp Ala Leu Lys Tyr Trp Pro Ser Thr Arg Lys Val Val Asp Asp Phe
 245 250 255
 Ile Ala Ile Ser Pro Asp Phe His Gly Thr Val Met Arg Ser Leu Val
 260 265 270
 Cys Pro Trp Leu Ala Ala Leu Ala Cys Thr Pro Ser Leu Trp Gln Gln
 275 280 285
 Gly Trp Asn Thr Glu Phe Ile Arg Thr Leu Arg Gly Gly Gly Gly Asp
 290 295 300
 Ser Ala Tyr Val Pro Thr Thr Thr Ile Tyr Ser Thr Phe Asp Glu Ile
 305 310 315 320
 Val Gln Pro Met Ser Gly Ser Gln Ala Ser Ala Ile Leu Ser Asp Ser
 325 330 335
 Arg Ala Val Gly Val Ser Asn Asn His Leu Gln Thr Ile Cys Gly Gly
 340 345 350
 Lys Pro Ala Gly Gly Val Tyr Thr His Glu Gly Val Leu Tyr Asn Pro
 355 360 365
 Leu Ala Trp Ala Leu Ala Val Asp Ala Leu Ser His Asp Gly Pro Gly
 370 375 380

Asp Pro Ser Arg Leu Asp Leu Asp Val Val Cys Gly Arg Val Leu Pro
385 390 395 400

Pro Gln Leu Gly Leu Asp Asp Leu Leu Gly Thr Glu Gly Leu Leu Leu
405 410 415

Ile Ala Leu Ala Glu Val Leu Ala Tyr Lys Pro Lys Thr Phe Gly Glu
420 425 430

Pro Ala Ile Ala Ser Tyr Ala His
435 440

<210> 7
<211> 401
<212> PRT
<213> *Aspergillus oryzae*

<400> 7

Leu Pro Ser Ser Ser Glu Thr Val Glu Ala Asn Cys Val Lys Pro Tyr
1 5 10 15

Leu Cys Cys Gly Glu Leu Lys Thr Pro Leu Asp Ser Thr Leu Asp Pro
20 25 30

Ile Leu Leu Asp Leu Gly Ile Asp Ala Ala Ser Ile Val Gly Ser Val
35 40 45

Gly Leu Leu Cys Leu Ile Pro Ser Lys Ala Leu Thr Cys Leu Asn Gly
50 55 60

Tyr Ala Ile Ile Asp Leu Asn Ser Ile His Arg His Asn Pro Ser Pro
65 70 75 80

Glu Asn Leu Ser Ile Tyr Pro Tyr Lys Ala Lys Ser Asp Ala Pro Tyr
85 90 95

Ser Ile Ala Glu Asn Thr Leu Arg Ala Ala Ile His Ile Pro Arg Ser
100 105 110

Phe Ser His Lys Arg Asp Lys Lys Ile Pro Val Leu Leu Val Pro Gly
115 120 125

Thr Ala Val Pro Ala Ala Ile Thr Phe Tyr Phe Asn Phe Gly Lys Leu
130 135 140

Arg Arg Ala Leu Pro Glu Ser Glu Leu Val Trp Ile Asp Leu Pro Gln
145 150 155 160

Ala Ser Leu Asp Asp Ile Gln Leu Ser Ala Glu Tyr Val Ala Tyr Ala
165 170 175

Leu Asn Tyr Val Ser Ala Leu Thr Ser Ser Lys Ile Ala Val Ile Ser

180 185 190
 Trp Ser Gln Gly Ala Leu Asp Ile Gln Trp Ala Leu Lys Tyr Trp Pro
 195 200 205
 Ser Thr Arg Ser Val Val Asn Asp Phe Ile Ala Ile Ser Pro Asp Phe
 210 215 220
 His Gly Thr Ile Val Lys Trp Leu Val Cys Pro Leu Leu Asn Asp Leu
 225 230 235 240
 Ala Cys Thr Pro Ser Ile Trp Gln Gln Gly Trp Asp Ala Asn Phe Ile
 245 250 255
 Gln Ala Leu Arg Ser Gln Gly Gly Asp Ser Ala Tyr Val Thr Thr Thr
 260 265 270
 Thr Ile Tyr Ser Ser Phe Asp Lys Ile Val Arg Pro Met Ser Gly Gu
 275 280 285
 Asn Ala Ser Ala Arg Leu Leu Asp Tyr Arg Gly Val Gly Val Ser Asn
 290 295 300
 Asn His Leu Gln Thr Ile Cys Ala Asn Asn Ala Ala Gly Gly Leu Tyr
 305 310 315 320
 Thr His Glu Gly Val Leu Tyr Asn Pro Leu Ala Trp Ala Leu Thr Val
 325 330 335
 Asp Ala Leu Leu His Asp Gly Pro Ser Asn Ile Thr Arg Ile Asp Thr
 340 345 350
 Gln Lys Ile Cys Glu Gln Val Leu Pro Pro Tyr Leu Glu Leu Thr Asp
 355 360 365
 Met Leu Gly Thr Glu Ala Leu Leu Leu Val Ala Leu Ala Lys Ile Leu
 370 375 380
 Thr Tyr Ser Pro Lys Val Ser Gly Glu Pro Asp Ile Ala Lys Tyr Ala
 385 390 395 400

Tyr

<210> 6
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> Neurospora crassa

<400> 8

Leu Pro Thr Thr Ser Glu Pro Val His His Glu Ser Val Arg Ala Ile
 1 5 10 15

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

Asn Val Glu Val Gln Thr Val Oys Gly Leu Ser Val Gly Gly Gly Gln
 290 295 300
 Tyr Gly His Ser Thr Leu Met Ala His Pro Leu Val Ala Ala Met Thr
 305 310 315 320
 Leu Asp Ala Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ala Ser Leu Ser Arg Ile Arg
 325 330 335
 Ser Gln Met Phe Arg Ala Oys Ser Asn Val Val Ala Pro Gly Leu Gln
 340 345 350
 Leu Thr Asp Arg Ala Lys Thr Glu Gly Leu Leu Ala Thr Ala Gly Ala
 355 360 365
 Arg Met Gly Ala Phe Pro Thr Lys Leu Leu Arg Glu Pro Ala Leu Arg
 370 375 380
 Gln Tyr Ala Ala
 385

REIVINDICAÇÕES

1. Método para preparar um polipeptídeo, caracterizado pelo fato de compreender:

a) selecionar um polipeptídeo originário que tem atividade de enzima lipolítica e tem uma sequência de aminoácidos com pelo menos 30% de identidade com SEQ ID NO: 1,

b) selecionar pelo menos um resíduo de aminoácido na sequência correspondendo a qualquer um dos resíduos 1, 13,25,38-51,53-55,58,69-79,91,92,96,97,99, 103, 104-110, 113, 132-168, 173, 187-193, 197-205, 215, 223-231, 242, 244, 256, 259, 261-298, 303, 305, 308-313, ou 315 de SEQ ID NO: 1,

c) alterar a sequência de aminoácidos sendo que a alteração compreende substituição ou deleção do resíduo selecionado ou inserção de pelo menos um resíduo adjacente ao resíduo selecionado,

d) preparar um polipeptídeo alterado tendo a sequência de aminoácidos alterada,

e) determinar a atividade de enzima lipolítica específica, a atividade lipolítica em pH alcalino e/ou a enancioseletividade do polipeptídeo alterado, e

f) selecionar um polipeptídeo alterado que tem uma atividade de enzima lipolítica específica maior, uma atividade mais alta em pH alcalino e/ou uma enancioseletividade aumentada do que o polipeptídeo originário.

2. Método de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o resíduo selecionado corresponde a qualquer um dos resíduos 1,13, 25, 38, 42, 74, 140, 143, 147, 164, 168, 190, 199, 215, 223, 242, 244, 256, 265, 277, 280, 281, 283, 284, 285, 292, 303, 315, 135-160 ou 267-295 de SEQ ID NO: 1.

3. Método de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que a alteração compreende substituição do resíduo selecionado

por um resíduo encontrado na posição correspondente de qualquer uma de SEQ ID NOS: 1-8.

4. Método de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que o polipeptídeo originário é selecionado dentre SEQ ID NOS: 1-8.

5. Polipeptídeo, caracterizado pelo fato de que:

a) tem atividade de enzima lipolítica, e

b) tem uma sequência de aminoácidos que tem pelo menos 80% de identidade com SEQ ID NO: 1 e comparada com SEQ ID NO: 1 compreende uma substituição, deleção ou inserção de aminoácido em uma posição correspondendo a qualquer um dos resíduos 1, 13, 25, 38, 42, 74, 140, 143, 147, 164, 168, 190, 199, 215, 223, 242, 244, 256, 265, 277, 280, 283, 284, 285, 292, 303, 315, 135-160 ou 267-295.

6. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que a diferença de SEQ ID NO: 1 compreende uma alteração correspondendo a N74Q, P143S, A281S, P38S, N292Q, L1QGPL, L1QL, I285E, L147F, L147N, N292C, L140E, P143L, A146T, P280V, A283K, A284N, T103G, A148P, W104H, A148P, N74Q, A281S, V190A, L199P, T256K, T42N, R242A, V215I, T164V, L163F, T164V, D265P, P303K, R168D, A25G, V315I, T244P, K13Q, L277I, Y91S, A92S, N96S, N97*, L99V, ou D223G.

7. Polipeptídeo de acordo com a reivindicação 5 ou 6, caracterizado pelo fato de compreender um conjunto de alterações de aminoácido em comparação com a SEQ ID NO: 1 que é:

a) V139I G142N P143I L144G D145G L147T A148G V149L S150IN A151T S153A W155V;

b) Y135F V139R L140M A141V G142P P143V D145C A146P L147S A148F V149P S150KLSCA151PW155L;

c) Y135F K136H V139M G142Y P143G D145C L147G

A148N V149F S150GKVAKAGAPCA151PW155L;

d) V139I G142N P143I L144G D145G L147T A148G V149L
S150IN A151T S153A W155VA281S, ou

e) Y135F K136H V139M G142Y P143G D145C L147G
5 A148N V149F S150GKVAKAGAPC A151P W155LA281S.

8. Polipeptídeo de acordo com qualquer uma das
reivindicações 5 a 7, caracterizado pelo fato de estar na forma imobilizada.

9. Método para realizar uma reação catalisada por lipase,
caracterizado pelo fato de compreender contatar reagentes com o polipeptídeo
10 como definido em qualquer uma das reivindicações precedentes sendo que a
reação é:

a) hidrólise com um éster de ácido carboxílico e água como
reagentes, e um ácido carboxílico livre e um álcool como produtos,

b) síntese de éster com um ácido carboxílico livre e um álcool
15 como reagentes, e um éster de ácido carboxílico como produto,

c) alcoólise com um éster de ácido carboxílico e um álcool
como reagentes, ou

d) acidólise com um éster de ácido carboxílico e um ácido
graxo livre como reagentes.

20 10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado
pelo fato de que a reação é hidrólise de um iso-propil-éster, ou síntese de éster
ou alcoólise com iso-propanol como um reagente.

1tca					
Hyphozyma					
Q4PEP1 Ustilago					
Q4HUY1 Fusarium	MRFPVH	IISLCVFSGL	GLAAPSYSDL	ESRQLIGGLL	KGVDGTLETV
Q6BVP4 Debaryomyces	MKVSLV	KIAFTALMVS	GISAHPTKEL	ERRDLISNID	DIVNSTIDNG
Q4WG73 Aspergillus	MRWSSLLKAA	VLRYAILSPL	VSGAVIPRGA	VPVASDLSLV	SILSSAANDS
Q2UE03 Aspergillus					MRFFTA
Q7RYD2 Neurospora					

1tca					
Hyphozyma					
Q4PEP1 Ustilago					
Q4HUY1 Fusarium	VGGLLGTLRK	AIDSGDRDKT	LDILHVLEPA	KKHKNVEEAF	AALEKISKSK
Q6BVP4 Debaryomyces	EAHKDNAKSA	ITDIFDKIND	GIKQDIDNLK	EVGKSIADLI	KSVVPTEDLS
Q4WG73 Aspergillus	SIESEARSIA	SLIASEIVSK	IGKTEFSRST	KDAKSVQEAF	DKIQSIFADG
Q2UE03 Aspergillus	LSLFISGAAI	ASALPSSSET	VEANCVKPYL	CCGELKTPLD	STLDPILLDL
Q7RYD2 Neurospora		MIFTS	SPAVLLSTIT	LFAQLALGLP	TTSEPVHHS

1tca					
Hyphozyma			MKLS	SALAGLL...	
Q4PEP1 Ustilago			MKTT	SVISALV...	
Q4HUY1 Fusarium	PKTIIDYSAQ	LIVNGLISGN	TLDLFAYAKG	LVSAQNG...	
Q6BVP4 Debaryomyces	TPEGVQAYLG	QLFENGEDLF	KNSIDMVGHG	LKPGSIAGNF	EGFSDEINTS
Q4WG73 Aspergillus	TPDFLKMTR	ILTVGLIPAD	IVSFLNGYLN	LDLNSIH...	
Q2UE03 Aspergillus	GIDAASIVGS	VGLLCLIPSK	ALTCLNGYAI	IDLNSIH...	
Q7RYD2 Neurospora	VRAIGELSHR	DELHDAGVVW	NKVVRQSPLV	APTDPD...	S

1tca		LPSGSD	PAFSQPKSVL	DAGLTCQGAS	PSSV..SKPI
Hyphozyma	AVAAVTALPA	PFTPFPTGAD	PAFTQSQATL	DAGLTCQSGS	PSSQ..KNPI
Q4PEP1 Ustilago	TLASIIIRAAP	LASSD	PAFSTPKATL	DAGLECQTGS	PSSQ..TKPI
Q4HUY1 Fusarium	SNNKNRNPCK	EVYPKVANCD	ASYTTSEAKL	RAAIHIPPTF	TYGE..KPPV
Q6BVP4 Debaryomyces	DNFNVKEPEG	SVYPQAESED	PSFSLSEEQL	RSAIQIPEEF	QYGNNGSKSPV
Q4WG73 Aspergillus	.NRNPSPKGQ	AIYPVKAPGD	ARYSVAENAL	RAAIHIPASF	GYGKNGKKPV
Q2UE03 Aspergillus	.RHNPSPENL	SIYPYKAKSD	APYSIAENTL	RAAIHIPRSF	SHKRDKKIPV
Q7RYD2 Neurospora	FNNQNPDVPG	VGYPRSSDAD	PAFTIPEAKL	RSAIYLPSPG	NSSTN.RQVV

1tca	LLVPGTGTTG	PQSFDNSWIP	LSTQLG.YTP	CWISPPPFML	NDTQVNTeyM
Hyphozyma	LLVPGTGNTG	PQSFDNSWIP	LSAQLG.YSP	CWVSPPPFML	NDSQINAEYI
Q4PEP1 Ustilago	LLVPGTGANG	TQTFDSSWIP	LSAKLG.FSP	CWISPPPFML	NDSQVNVYI
Q4HUY1 Fusarium	ILFPGTGSTG	FTTYRGNFIP	LLTDVEWADP	VWVNVVLLLL	EDAQVNAEYA
Q6BVP4 Debaryomyces	ILVPGTGSKG	GMTYASNYAK	LLKETDFADV	VWLVNVPGYLL	DDAQNNAEYV
Q4WG73 Aspergillus	ILVPGTATPA	GTYYFNFNGK	LGSAAD.ADV	VWLVNVPQASL	NDVQINSEYV
Q2UE03 Aspergillus	LLVPGTAVPA	AITFYFNFNGK	LRRALPESEL	VWIDLPQASL	DDIQLSAEYV
Q7RYD2 Neurospora	LFVPGTGAYG	HESFADNLLK	VITNAGAADA	VWVNVPNAML	DDVQSNAEYI

1tca	VNAITALYAG	SGNN.KLPVL	TWSQGGLVAQ	WGLTFFPSIR	SKVDRLMAFA
Hyphozyma	VNAIHTLSSG	SGS..KVPVL	TWSQGGLAAQ	WALTFFPSTR	NKVDRLMAFA
Q4PEP1 Ustilago	VNAVQTLYAG	SGSK.KVPVL	TWSQGGLATQ	WALTFFPSIR	NQVDRLMAFA
Q4HUY1 Fusarium	AYALNYIASL	TKR..NVSVI	AWSQGNIDVQ	WALKYWPSTR	KVTTDHVAIS
Q6BVP4 Debaryomyces	AYAINYISGI	SNNK.NVSII	SWSQGGLDTQ	WALKYWASTR	SKVSDFIPIS
Q4WG73 Aspergillus	AYAINYISAI	SES..NVAVL	SWSQGGLDTQ	WALKYWPSTR	KVVDDFIAIS
Q2UE03 Aspergillus	AYALNYVSAL	TSS..KIAVI	SWSQGALDIQ	WALKYWPSTR	SVVNDFIAIS
Q7RYD2 Neurospora	AYAISYVKAL	IGDDRDLNVI	GWSQGNLATQ	WVLTYPSTA	PKVRQLISVS

Fig.1 alinhamento de seqüências

1tca	PDYKGTVLG	PLDALAVS..	APS	VWQQTGSAL	TTALRNAGGL
Hyphozyma	PDYKGTVEAG	LLDAFGLS..	APS	VWQQTASAF	VTALDQAGGL
Q4PEP1 Ustilago	PDYKGTEAG	LLSTFGLA..	SQS	VWQQQAGSAF	VTALKNAGGL
Q4HUY1 Fusarium	ADYKGTILAN	IGGATGLIN.	TPA	VVQQEAGSTF	INTLRSNDGD
Q6BVP4 Debaryomyces	PDFKGTVMVP	VLCPSFPKLS	C.....PPS	VLQQEYNSTF	IETLRADGGD
Q4WG73 Aspergillus	PDFHGTVMRS	LVCPLAALA	C.....TPS	LWQQGWNTF	IRTLRGGGGD
Q2UE03 Aspergillus	PDFHGTIVKW	LVCPLNDLA	C.....TPS	IWQQGWDANF	IQALRSQGGD
Q7RYD2 Neurospora	PDFHGTMLAY	GLCAGNFGKV	AKAGAPCPPS	VLQQLYSSNL	INTLRAAGGG
1tca	TQIVPTTNLY	SATDEIVQPQ	VSNSPLDSSY	LFN....GKN	VQAQAVCGPL
Hyphozyma	NQIVPTTNLY	SATDEVVQPQ	FANGPPDSSY	LSN....GKN	IQAQSIQCGPL
Q4PEP1 Ustilago	TSFVPTTNLY	SFFDEIVQPQ	VFNSDADSSY	LGN....SKN	IQAQTVCGGF
Q4HUY1 Fusarium	SGYIPTTSLY	SSLFDEVVQP	QEGAGASAYL	LDARDVGVTN	AEVQKVCTGK
Q6BVP4 Debaryomyces	SAYVPTTSIY	SGFDEIVQPQ	.SGKGASGLI	NDNRNVGVTN	NEVQTICPDR
Q4WG73 Aspergillus	SAYVPTTTIY	STFDEIVQP.	MSGSQASAIL	SDSRAVGVS	NHLQTICGGK
Q2UE03 Aspergillus	SAYVTTTTIY	SSFDKIVRP.	MSGENASARL	LDYRGVGVSN	NHLQTICANN
Q7RYD2 Neurospora	DAQVPTTSFW	SRLTDEVVQP	QAGLTASARM	GDARNKGVTN	VEVQTVCGLS
1tca	F...VIDHAG	SLTSQFSYVV	GRSALRSTTG	QARSAD..YG	ITDCNPLPAN
Hyphozyma	F...IIGHAG	SLYSQFSYVV	GKSALASPTG	QAQSSD..YS	IKDCNPAPAN
Q4PEP1 Ustilago	F...VIDHAG	SLTSQFSYVV	GKSALTSSSG	VANSAD..YS	SKDCKASPAD
Q4HUY1 Fusarium	LGGSFYTHES	MLANPLTFAL	AKDALTHEGP	GTISRL..DL	ADVCNRS LAP
Q6BVP4 Debaryomyces	PAGKYITHEG	VLYNPGVYAL	AVDALTHEGP	GQLSRI..DL	DTECGRIVPD
Q4WG73 Aspergillus	PAGGVYTHEG	VLYNPLAWAL	AVDALSHDGP	GDPSRL..DL	DVVCGRVLPP
Q2UE03 Aspergillus	AAGGLYTHEG	VLYNPLAWAL	TVDALLHDGP	SNITRI..DT	QKICEQVLPP
Q7RYD2 Neurospora	VGGGQYGHST	LMAHPLVAM	TLDALKNGGP	ASLSRIRSQM	FRACSNVVAP
1tca	DL.TPEQKVA	AAALLAPAAA	AIVAGPKQNC	EPDLMPYARP	FAVGKRTCSG
Hyphozyma	PL.TAQQKLD	SAAIILVAGK	NIVTGPKQNC	EPDLMPYARK	YRIGKKTCSG
Q4PEP1 Ustilago	DL.SAKQKAD	ASALLFVAAG	NLLAGPKQNC	EPDLKPYARQ	FAVGKKTCSG
Q4HUY1 Fusarium	GLGLKDLLIT	ENAVVIAALS	LVLYLPKQID	EPAIKQYALE	ATGTC.....
Q6BVP4 Debaryomyces	GLTYTDLLAT	EALIPALVL	ILSYDDKTRD	EPEIRSYAQ.	
Q4WG73 Aspergillus	QLGLDDLLGT	EGLLLIALAE	VLAYKPKTFG	EPAIASYAH.	
Q2UE03 Aspergillus	YLELTDMLGT	EALLLVALAK	ILTYSPKVSG	EPDIKYAY.	
Q7RYD2 Neurospora	GLQLTDRAKT	EGLLATAGAR	MGAFTKLLR	EPALRQYAA.	
1tca	IVTP				
Hyphozyma	VITG				
Q4PEP1 Ustilago	TIN.				
Q4HUY1 Fusarium					
Q6BVP4 Debaryomyces					
Q4WG73 Aspergillus					
Q2UE03 Aspergillus					
Q7RYD2 Neurospora					

Fig.1 alinhamento de sequências (cont.)

RESUMO

“MÉTODO PARA PREPARAR UM POLIPEPTÍDEO, POLIPEPTÍDEO, E, MÉTODO PARA REALIZAR UMA REAÇÃO CATALISADA POR LIPASE”

- 5 Simulação de dinâmica molecular (MD) sobre a estrutura tridimensional de lipase B de *Candida antarctica* lipase revelou dois capuzes com uma mobilidade notável, e esta descoberta foi usada para projetar variantes de enzima lipolítica com atividade de enzima lipolítica aumentada.