



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-112187

54. TÍTULO

FOSFOLIPASA Y METODO PARA PRODUCIRLA.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C12N 3/20

71. SOLICITANTE

NOVOZYMES A/S

DOMICILIO

BAGSVAERD, DINAMARCA.

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

22. BOGOTÁ, D. C.,

Nov. 3-2005



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicación : 05112107 00000000 Folios: 117
Fecha (AMB): 2005-11-03 14:28:26
Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE INICI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1



Patente de Invención



Patente de Modelo de Utilidad



Capítulo I.



Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: NOVOZYMES A/S

Dirección: Krogshøjvej 36, DK-2880
Bagsvaerd, Dinamarca.

Nacionalidad o Domicilio: Bagsvaerd,
Dinamarca

Lugar de Constitución: Dinamarca.

Teléfono: Fax:

E-mail

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: JIMENA ESCOBAR URIBE

Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305)

Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889

E-mail: tm-patent@escobaruribe.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Número 39.779.452 T.P.68.228

4

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER ANEXOS

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/DK2004/000279 Fecha 23 de abril de 2004

Publicación Internacional No. WO 2004/097012 A2 Fecha 11 de noviembre de 2004

6 TÍTULO (54)

FOSFOLIPASA Y METODO PARA PRODUCIRLA.

7 Clasificación Internacional (51)

C12N 9/20

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

DINAMARCA

DINAMARCA

(32) Fecha

28 de abril de 2003

14 de agosto de 2003

(31) Número de Solicitud

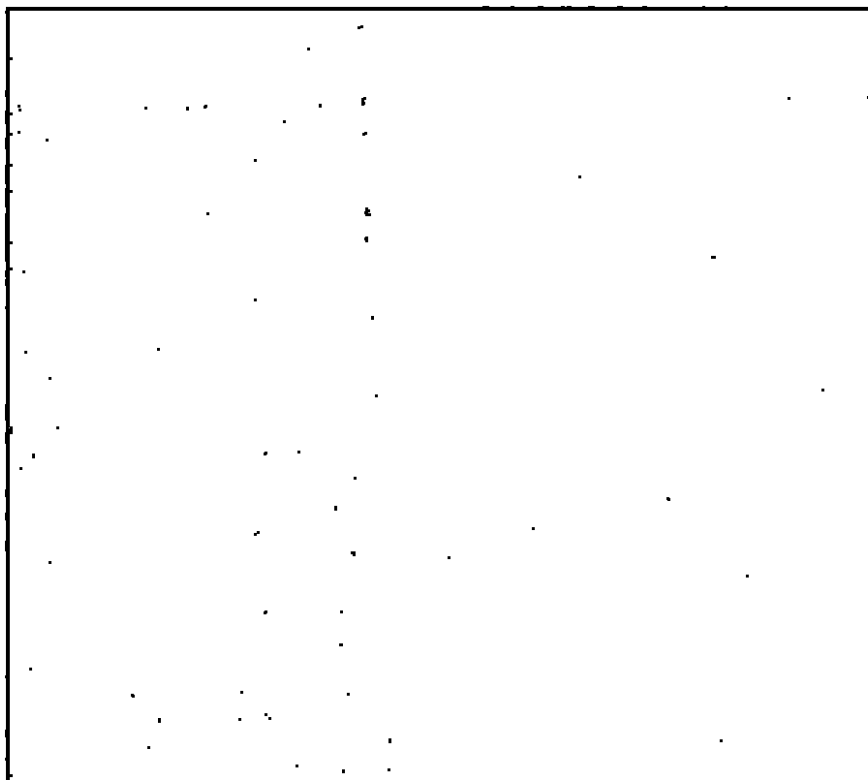
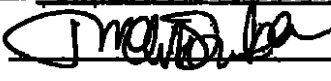
PA 2003 00634

PA 2003 01163

9 Comprobante de pago No. 05 - 80.673

Fecha 19 de octubre de 2005

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros " Opinión escrita.

11 FIGURA CARACTERÍSTICA**12 S licito la concesión de la patente**NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBEFIRMA: 

C.C. 39.779.452 de Usaquén T.P. 68.228

2884/PCT

2884

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radiacion : 05112107 00000000 Folios: 117
Fecha (AMB): 2005-11-03 14:28:26
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC
NIT : 00017600 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 00,673
FECHA : OCTUBRE 19 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	35410069	19/10/2005	5,754,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXOS

INVENTORES

- 1.) **STRINGER, Mary, Ann**
(Soeborg Hovedgade 39 C, 3.tv., DK-2860 Soeborg, Dinamarca);
- 2.) **FATUM, Tine, Muxoll**
(Soevangen 50, DK-3450 Alleroed, Dinamarca);
- 3.) **PATKAR, Shamkant, Anant**
(Christoffers Allé 91, DK-2800 Lyngby, Dinamarca).

Solicito expresamente a nombre de la sociedad **NOVOZYMES A/S.**, sociedad constituida de conformidad con las leyes de Dinamarca, domiciliada en Krogshoejvej 36, Dk-2880 Bagsvaerd, Dinamarca, el otorgamiento de Patente para la invención titulada **"FOSFOLIPASA Y METODO PARA PRODUCIRLA"**.

Clase: C12N 9/20


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen.
T.P. 68.228

5

POWER OF ATTORNEY DOCUMENTO DE PODER

The undersigned Steen Riisgaard

acting on behalf of and representing
NOVOZYMES A/S, a company organized
under the law of Denmark

domiciled at Krogshoejvej 36,
DK-2880 Bagsvaerd, Denmark

hereby appoints
**JIMENA ESCOBAR-URIBE and/or IGNACIO
ESCOBAR-URIBE**

domiciled at Bogota, Colombia
CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

as our true and legal attorneys with the necessary powers: 1. to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs, commercial emblems and names, trademarks, domain names, copyrights and neighbouring rights, plant varieties, health licenses as well as their assignments, extensions, renewals, changes of name and domicile; 2. to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3. to intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, such as: actions dealing with commercial emblems and names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to industrial property matters, copyrights and neighbouring rights and obtention of plant varieties' rights.

To this effect, we hereby authorize them to file applications, make descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general to take, before said authorities, pertinent steps to the above-mentioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect our interests, with all other necessary legal faculties, and we hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to our benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on our behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, conciliating, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extra-judicial attorneys.

Signed at Gladsaxe
on Monday 29/1-2001

El suscrito

obrando en nombre y representación de
NOVOZYMES A/S, constituida y organizada
según las leyes de Dinamarca

con domicilio en Krogshoejvej 36,
DK-2880 Bagsvaerd, Dinamarca

nombra a
**JIMENA ESCOBAR-URIBE y/o IGNACIO
ESCOBAR-URIBE**

domiciliados en Bogotá, Colombia
CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

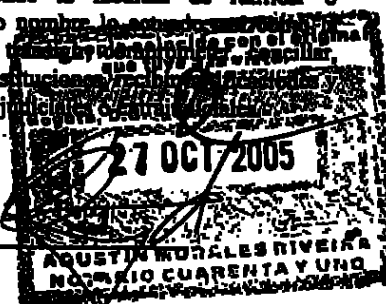
apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente: 1. para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, registro de marcas, nombres de dominio, registro de derechos de autor y derechos conexos, registro de variedades vegetales, depósito de nombres comerciales y emblemas, registros sanitarios, así como sus traspasos, prórrogas, renovaciones, cambios de nombre y de domicilio; 2. elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clase; 3. intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso, y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas del nombre o emblema comerciales; observaciones u oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad industrial; el ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad industrial, los derechos de autor y derechos conexos y los derechos de obtention de variedades vegetales.

A este efecto, los facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistirse a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses, con todas las demás facultades necesarias y por este documento desde ahora declaramos válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en nuestro beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en nuestro nombre lo actuado, sustituir, facultad de desistir, transigir, comprometer, conciliar, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extra-judiciales.

Firmado por
el





Mr. Steen Rlisgaard today signed the document hereinbefore set out in my presence at the office.

There were no conspicuous amendments or additions.

He proved his identity to me by presentation of his passport.

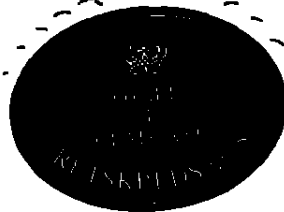
In witness whereof:

THE COURT OF GLADSAXE, DENMARK
2001 - 01 - 29

Lizzie Herbye
Lizzie Herbye
Notary

365906 01 0001.2105
60100-00097/01

01.02.01 RA
300.00 K

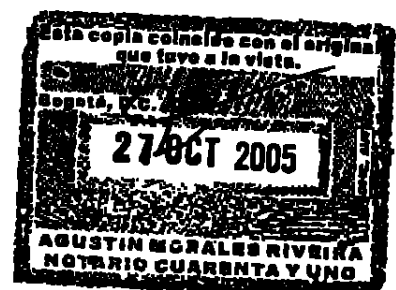


SE LEGALIZA LA FIRMA QUE ANTECEDE DE

Lizzie Herbye
2 FEB. 2001
COPENHAGUE, EL
POR EL MINISTRO DE RELACIONES EXTERIORES

Birgitte Thorell

BIRGITTE THORELL





CONSULADO DE COLOMBIA

No. 05/2001

El suscrito, Encargado de Funciones Consulares en Copenhague, Dinamarca,
vistos los documentos presentados por los interesados,

C E R T I F I C A

Que la Sra. **BIRGITTE THORELL** quien autoriza el documento adjunto, ejercía legalmente, en la fecha allí expresada, sus funciones como **FUNCIONARIO DE AUTENTICACIONES DEL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE DINAMARCA**, cuya firma y sellos corresponden a los registrados en este Consulado.

Que la firma **NOVOZYMES A/S.** existe legalmente y que ejerce su objeto social de acuerdo a las leyes, tal como lo expresa lo escrito por **EL NOTARIO PUBLICO DE GLADSAXE, Sra. Lizzie Herbye.**

Que el Sr. **Steen Riisgaard**, está autorizado para firmar el documento de acuerdo a lo expresado en el documento por el mismo Notario Público de Gladsaxe.

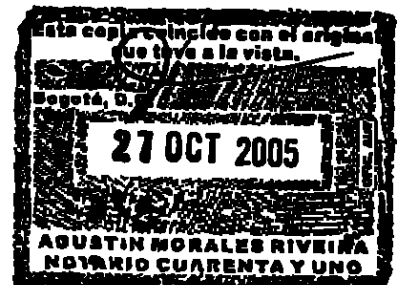
- El Encargado de Funciones Consulares de Colombia no asume responsabilidad por el contenido del documento.

"Se pagarán en Colombia los impuestos de Timbre que se ocasionen al ejecutar en Colombia las obligaciones emanadas del presente documento de conformidad con el artículo 519 del Estatuto tributario."

Copenhague, Febrero 06 del 2001.

JOSE NOÉ RÍOS
Encargado de Funciones Consulares

Pagado : Impuesto de Timbre USD. 7.00
Derechos consulares USD. 100.00



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TFVTO
2008 MAR -6 12
1882
JEFE DE LEGALIZACION
S. HATE

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

113709
Jose Jose Ruiz
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

Esta copia coincide con el original
que tuvo a la vista
Bogotá, D.C.
27 OCT 2005
ABUETIN MORALES RIVERA
NOTARIO CUARENTA Y UNO

Traducción oficial hecha por Jimena Escobar Uribe, traductora e intérprete oficial según resolución No. 0369 del Ministerio de Justicia, del documento que lleva el sello de legalización No. 113709 de marzo 6 de 2001 y firmado por el Jefe de Legalizaciones en Santafé de Bogotá D.C. (firma ilegible), el cual corresponde a un documento de poder en inglés con su correspondiente traducción al español (razón por la cual no se hace traducción del mismo texto), otorgado por la sociedad NOVOZYMES A/S, constituida y organizada bajo las leyes de Dinamarca, domiciliada en Bagsvaerd, Dinamarca, a Jimena Escobar-Uribe y/o Ignacio Escobar-Uribe y firmado por Steen Riisgaard en Gladsaxe, el lunes 29/1-2001

El señor Steen Riisgaard hoy firmó el documento anterior exhibido en mi presencia en mi oficina.
No se hicieron correcciones a adiciones manifiestas.
El probó su identidad a mí por medio de la presentación de su pasaporte.

En testimonio de lo cual:

LA CORTE DE GLADSAXE, DINAMARCA
2000-01-29
(firmado) Lizzie Horbye, Notario
Sello Notarial

Sello en español del Ministerio de Relaciones Exteriores en Copenhague, por medio del cual se legaliza, el 2 de febrero de 2001, la firma de la anterior notaria.
(fdo) Birgitte Thorell

El documento anterior fue debidamente legalizado por el Consulado General de Colombia en Copenhague, Dinamarca bajo el No. 05/2001 el 6 de febrero de 2001, firmado por José Noé Ríos, Encargado de Funciones Consulares.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2001 AUG 28 P 12:37

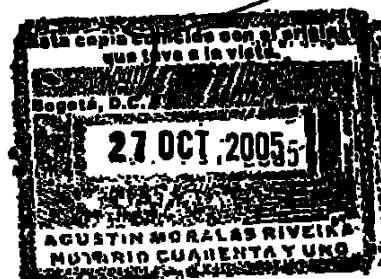
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

164319

Jimena Escobar
UYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESPACHADO
LAS FUNCIONES CONSULARES

Jimena Escobar Uribe
JIMENA ESCOBAR URIBE
Traductor e Intérprete Oficial
Resolución No. 0369 Min. Justicia 1995



Extracto de publicación Folio 9.

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para producir una fosfolipasa procesando un péptido fúngico expresado y a ciertas fosfolipasas especificadas. Además, la invención proporciona un método para producir queso con una fosfolipasa.

FOSFOLIPASA Y METODO PARA PRODUCIRLA

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a un método para hidrolizar un fosfolípido, un método para producir una fosfolipasa, un método para elaborar queso y a una fosfolipasa.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Soragni, et al. (2001) EMBO J. 20: 5079-5090, describe una fosfolipasa (TbSP1) a partir de *Tuber borchii* y la secuencia de nucleótido de ADNc de un gen que la codifica. Las siguientes secuencias peptídicas son publicadas en fuentes indicadas, derivadas del organismo de fuente indicado:

- COGEME Base de datos EST Hongo Fitopatogénico y Oomiceto, Unisequencia ID:

VD0100C34, *Verticillium dahliae*

- Base de datos de Proteína NCBI, gi:18307435, *Neurospora crassa*

- Base de datos de Proteína NCBI, gi:16519372, *Helicosporum* sp. HN1

- WO 0056762, SEC ID NO:5954, *Aspergillus oryzae*

- Base de datos de Proteína TREMBL, EAA28927, *Neurospora crassa*

El documento US 6399121 describe el uso de fosfolipasa en la elaboración de queso.

SUMARIO DE LA INVENCION

Los inventores han analizado los datos de secuencia conocida para fosfolipasas A2 del Grupo XIII fúngico, y han identificado secuencias adicionales, ya sea a partir de los datos de secuencia publicada o seleccionadas para determinar secuencias relevantes a partir de fuentes naturales. Expresando genes que codifican fosfolipasas A2 del Grupo XIII fúngico en un organismo hospedero adecuado, se ha encontrado que las secuencias expresadas consisten de un péptido nuclear acoplado a una secuencia peptídica en el lado N o C-terminal o en ambos, y que tal expresión del gen en un organismo adecuado puede conducir al desdoblamiento del péptido expresado para obtener el péptido nuclear sin alguna extensión peptídica en el N- o C-terminal. Además, se encuentra que el péptido nuclear sin alguna(s) extensión(es) peptídicas, tiene una actividad de fosfolipasa significativamente superior que el péptido nuclear ligado a la(s) extensión(es) peptídicas. Finalmente, se encuentra que el péptido nuclear descubierto por este método es similar en longitud y secuencia a un péptido maduro conocido a partir de *Helicosporium* sp. (Wakatsuki, S. et al. (2001) Biochim. Biophys. Acta 1522:74-81) de función desconocida, y a fosfolipasas A2 del Grupo XIII bacteriano, las cuales carecen de extensiones peptídicas distintas de las señales de secreción (Sugiyama, M. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:20051-20058).

Los inventores adicionalmente encuentran que las fosfolipasas que portan la similitud de secuencia de sitio activo y conservación de residuo cisteína de fosfolipasa A2 de Grupo XIII fúngico, son útiles en la elaboración de queso.

Adicionalmente, los inventores descubrieron y aislaron un gen que codifica una nueva fosfolipasa a partir de *Fusarium venenatum* A3/5, la cual fue originalmente depositada como *Fusarium graminearum* ATCC 20334 y recientemente reclasificada como *Fusarium venenatum* por Yoder and Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23:62-80; y O'Donnell et al., 1998, Fungal Genetics and Biology 23:57-67. Las fosfolipasas pertenecen al grupo fúngico/bacteriano XIII PLA2 como se define por Soragni et al., The EMBO Journal, 20 (2001), 5079-5090. Los inventores también clonaron la nueva fosfolipasa que codifica el gen en una cepa *E. coli*, y usaron el gen clonado para hacer un constructo para expresar el gen de fosfolipasa de *Fusarium* en *Aspergillus oryzae*. Los inventores *Aspergillus oryzae* son transformados con este constructo, y aislada la fosfolipasa a partir de células *Aspergillus* transformadas.

Por consiguiente, la invención proporciona un método para producir una fosfolipasa, el cual comprende procesar un péptido fúngico expresado para desdoblar un péptido a partir del extremo C-terminal y/o un péptido a partir del extremo N-terminal para obtener un péptido nuclear, en donde el péptido

nuclear comprende:

- a) la secuencia de aminoácido dada por los aminoácidos 146-153 de la SEC ID NO:1, aminoácidos 87-94 de la SEC ID NO:3, o aminoácidos 79-86 de la SEC ID NO:12, o una secuencia idéntica a cualquiera de estas secuencias de aminoácido, excepto por la sustitución de un aminoácido único con otro aminoácido; y
- b) al menos dos residuos de cisteína ubicados en el extremo N-terminal de la secuencia dada en a); y
- c) al menos dos residuos de cisteína ubicados en el extremo C-terminal de la secuencia dada en a).

La invención también proporciona un método para hidrolizar un fosfolípido con una fosfolipasa de la invención. Además, la invención proporciona un método para producir queso, poniendo en contacto la leche de quesería o una fracción de leche de quesería con una fosfolipasa y producir queso a partir de la leche de quesería.

Finalmente, la invención proporciona fosfolipasa la cual es un péptido que tiene una secuencia de aminoácido la cual es al menos, 80% idéntica con ciertas secuencias especificadas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra una alineación de secuencias de

aminoácido de fosfolipasas A2 del Grupo XIII fúngico, que muestra sitios de procesamiento (|) en donde se conocen. El sitio activo consenso está subrayado. Los residuos de cisteína conservada están indicados con | bajo el consenso. La alineación se hizo con el programa AlignX del programa Vector NTI suite 8. El algoritmo usado es ClustalW con la matriz blosum62mt6 y ajustes por defecto AlignX.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Péptido expresado

La invención usa un péptido fúngico expresado que pertenece a un grupo definido por la similitud de secuencia de sitio activo y conservación de residuo de cisteína usado en la definición del grupo "fosfolipasa A2 del Grupo XIII fúngico/bacteriano" dado por Soragni, E., et al. (2001) EMBO J. 20:5079-5090. El péptido es fúngico, por ejemplo, derivado de *Tuber*, *Verticillium*, *Neurospora*, *Helicosporium* o *Aspergillus*, particularmente *T. borchii*, *T. albidum*, *V. dahliae*, *V. tenerum*, *N.crassa*, *Helicosporium* sp. HN1 o *A. oryzae*.

El péptido puede tener actividad de fosfolipasa, por ejemplo, actividad de fosfolipasa A, tal como fosfolipasa A1 y/o actividad de fosfolipasa A2.

Algunos ejemplos particulares son péptidos conocidos que tienen secuencias de aminoácido listadas en el listado de secuencia como sigue. Los organismos de la fuente y las

referencias de literatura están también indicados:

- SEC ID NO:1. *Tuber borchii*. Soragni, E., et al. (2001) EMBO J. 20:5079-5090
- SEC ID NO:3 *Verticillium dahliae*. COGEME Base de datos EST Hongo Fitopatogénico y Oomiceto, Unisecuencia ID: VD0100C34
- SEC ID NO:4 *Neurospora crassa*. Base de datos de Proteína NCBI, gi:18307435.
- SEC ID NO:5 *Helicosporum sp* HN1. Base de datos de Proteína NCBI, gi:16519372.
- SEC ID NO:7 *Aspergillus oryzae*. WO 0056762, SEC ID NO:5954.
- SEC ID NO:8. *Neurospora crassa*. Base de datos de Proteína TREMBL, EAA28927.

Además, las siguientes fosfolipasas fúngicas que tienen las secuencias indicadas fueron aisladas por los inventores a partir de fuentes naturales adquiridas de colecciones públicas o colectadas en los países y años indicados:

- SEC ID NO: 10. *Tuber albidum*. Adquirida de Centraalbureau voor Schimmel-cultures, Utrecht, Holanda, aislado CBS272.72.

- SEC ID NO:12. *Verticillium tenerum*. Irlanda, 1996.

Los inventores insertaron el gen a partir de *T. albidum* (SEC ID NO:9) en *E. coli* y depositaron el clon bajo

los términos del Tratado de Budapest el 12 de Febrero de 2003. El depósito se hizo en el Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Alemania, y fue de conformidad con el número de depósito DSM 15441.

En una modalidad, la invención proporciona una fosfolipasa la cual es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido la cual es al menos, 80%, tal como al menos 85%, preferiblemente 90%, más preferiblemente al menos 95%, idéntica con los aminoácidos 91-210 en la SEC ID NO:10 (*T. albidum*), aminoácidos 92-211 en la SEC ID NO:1 (*T. borchii*), aminoácidos 30-137 en la SEC ID NO:12 (*V. tenerum*), aminoácidos 38-145 en la SEC ID NO:3 (*V. dahliae*), aminoácidos 44-151 en la SEC ID NO:4 (*N. crassa*), amino ácidos 37-157 en la SEC ID NO:7 (*A. oryzae*), o aminoácidos 58-168 en la SEC ID NO:8 (*N. crassa*).

Procesamiento peptídico

Analizando las secuencias de fosfolipasa en el listado de secuencia, los inventores encontraron que cada secuencia de aminoácido expresada consiste de un péptido señal, un péptido nuclear, y adicionalmente una secuencia peptídica con función desconocida unida al C o N-terminal, o ambos, del péptido nuclear.

Péptido nuclear

Los péptidos nucleares están caracterizados por la

misma similitud de secuencia de sitio activo y conservación de residuo de cisteína observada por Soragni, E., et al. (2001) EMBO J. 20:5079-5090 para la fosfolipasa A2 del grupo XIII fúngico/bacteriano.

En una modalidad preferida de la invención, los péptidos nucleares comprenden: a) la secuencia dada por los aminoácidos 146-153 de la SEC ID NO:1, aminoácidos 87-94 de la SEC ID NO:3, o aminoácidos 79-86 de la SEC ID NO:12, o una secuencia idéntica a cualquiera de estas secuencias de aminoácido, excepto para la sustitución de un aminoácido único con otro aminoácido; y b) dos residuos de cisteína ubicados en el extremo N-terminal de la secuencia dada en a); y c) dos residuos de cisteína ubicados en el extremo C-terminal de la secuencia dada en a).

Uno de los residuos de cisteína ubicado en el extremo N-terminal de la secuencia dada en a), puede por ejemplo, ser separado de la secuencia dada en a) por aminoácidos 0-5, tales como aminoácidos 0-3, preferiblemente aminoácidos 0-2, y aún más preferiblemente 1 aminoácido. Otro de los residuos de cisteína ubicado en el extremo N-terminal de la secuencia dada en a), puede ser por ejemplo, separado de la secuencia dada en a) por 14-20 aminoácidos, tales como aminoácidos 15-19, preferiblemente aminoácidos 16-18, y aún más preferiblemente aminoácidos 17.

Uno de los residuos de cisteína ubicado en el

extremo C-terminal de la secuencia dada en a), puede ser por ejemplo, separado de la secuencia dada en a) por aminoácidos 22-29, tal como aminoácidos 23-28, preferiblemente aminoácidos 24-27, y aún más preferiblemente, aminoácidos 25-26. Otro de los residuos de cisteína ubicados en el extremo C-terminal de la secuencia dada en a) puede por ejemplo, ser separado de la secuencia dada en a) por los aminoácidos 27-49, tal como aminoácidos 29-46, preferiblemente aminoácidos 30-43, aún más preferiblemente aminoácidos 32-42, y más preferiblemente aminoácidos 35-40.

En una modalidad preferida, el péptido nuclear comprende cuatro residuos de cisteína alineados con los residuos de cisteína de la SEC ID NO:1 con los números de aminoácidos 128, 144, 180, y 194, respectivamente, cuando la secuencia de fosfolipasa es expresada completa, es alineada simultáneamente con las secuencias dadas en las SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:10 y SEC ID NO:12.

De conformidad con la invención, el polipéptido expresado es desdoblado para separar el péptido nuclear a partir del(los) péptido(s) unidos. El desdoblamiento se puede hacer *in vivo* expresándolo en un hospedero fúngico filamentoso o *in vitro*, por ejemplo, por un tratamiento con una proteasa soluble tal como por ejemplo, Kex2.

Los puntos de desdoblamiento se pueden encontrar

dentro de los 11 aminoácidos de una secuencia la cual es FG o con 10 aminoácidos de una secuencia la cual es un sitio Kex2. Los sitios Kex2 son por ejemplo, RR, KR, KK, o RK. En una modalidad, el péptido nuclear tiene una longitud de 100-150 aminoácidos, tal como 110-140 aminoácidos, 115-133 aminoácidos, 118-129 aminoácidos, o 118-126 aminoácidos.

En una modalidad de la invención, la fosfolipasa expresada es desdoblada dentro de aminoácidos 0-18, tal como aminoácidos 3-16, preferiblemente aminoácidos 5-14 en el extremo N-terminal de la secuencia de alineación con los aminoácidos 97-101 de la SEC ID NO:1, cuando la secuencia de fosfolipasa es expresada completa, es alineada simultáneamente con las secuencias dadas en las SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:10 y SEC ID NO:12.

En una modalidad preferida, la fosfolipasa expresada es desdoblada dentro de los aminoácidos 0-11, tal como aminoácidos 0-9, preferiblemente aminoácidos 0-7, en el extremo C-terminal de la secuencia de alineación con los aminoácidos 204-209 de la SEC ID NO:1, cuando la secuencia de fosfolipasa expresada es completa, es alineada simultáneamente con las secuencias dadas en las SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:10 y SEC ID NO:12.

En una modalidad preferida, la fosfolipasa procesada

tiene una actividad fosfolipasa específica, la cual es superior que la actividad del péptido expresado antes del procesamiento, por ejemplo, en una modalidad, la actividad de fosfolipasa específica es al menos, 2 veces, más preferiblemente, al menos 5 veces, más preferiblemente, al menos 10 veces, la actividad de fosfolipasa específica del péptido expresada antes del procesamiento. En una modalidad de la invención, el péptido expresado no tiene actividad de fosfolipasa medible antes del procesamiento.

La actividad de fosfolipasa puede por ejemplo, ser medida en el ensayo LEU hidrolizando lecitina de soya (L-alfa-fosfatidil-colina) a pH 8.0 y 40°C por 2 minutos. La actividad de fosfolipasa es expresada como la velocidad de consumo valorador (0.1 M de NaOH) necesario para mantener el pH constante, con relación a un estándar.

Expresión en células hospederas fúngicas filamentosas

Las células hospederas fúngicas filamentosas pueden por ejemplo, ser una célula de *Acremonium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Humicola*, *Myceliophthora*, *Neurospora*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Thermomyces*, *Thielavia*, *Tolypocladium*, o *Trichoderma*, particularmente *A. awamori*, *A. foetidus*, *A. japonicus*, *A. nidulans*, *A. niger*, *A. oryzae*, *F. bactridioides*, *F. cereals*, *F. crookwellense*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. graminum*, *F. heterosporum*, *F. negundi*, *F. oxysporum*, *F. reticulatum*, *F. roseum*, *F. sambucinum*, *F. sarcochroum*, *F.*

sporotrichioides, *F. sulphureum*, *F. torulosum*, *F. trichothecioides*, *F. venenatum*, *H. insolens*, *M. thermophila*, *N. crassa*, *P. purpurogenum*, *R. miehei*, *Thermomyces lanuginosus*, *Thielavia terrestris*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei*, o *Trichoderma viride*.

En una modalidad preferida, el organismo hospedero es una cepa de *Aspergillus*, *Fusarium*, o *Trichoderma*, particularmente *A. niger*, *A. oryzae*, *F. venenatum*, *F. samlDucinum* o *F. cereals*.

La transformación, cultivación, expresión, recuperación, se pueden realizar por métodos convencionales, por ejemplo, por los métodos generales descritos en los documentos EP 238023, EP 305216, WO 9600787, EP 244234 o T. Christensen et al., BioTechnology, vol. 6, Dec. 1988, 1419-22.

Polipéptido de fosfolipasa y ADN

En una modalidad, la presente invención se refiere a polipéptidos que tienen actividad de fosfolipasa y en donde los polipéptidos comprendidos, preferiblemente consisten de, una secuencia de aminoácido la cual tiene un grado de identidad a aminoácidos 29 a 149 de la SEC ID NO:16 (es decir, el polipéptido maduro) de al menos 80%, tal como al menos 85%, aún más preferiblemente al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, por ejemplo, al menos 96%, tal como al menos 97% y aún más preferiblemente, al menos 98%, tal como al menos 99%.

Preferiblemente, los polipéptidos comprenden la secuencia de aminoácido de la SEC ID NO:16; una variante alélica del mismo; o un fragmento del mismo que tiene la actividad de fosfolipasa. En otra modalidad preferida, el polipéptido de la presente invención comprende los aminoácidos 29 a 149 de la SEC ID NO:16. En una modalidad preferida adicional, el polipéptido consiste de aminoácidos 29 a 149 de la SEC ID NO:16.

La presente invención también se refiere a un polinucleótido comprendido, preferiblemente que consiste de una secuencia de nucleótido, la cual tiene al menos, 80% de identidad con los nucleótidos 133 a 495 de la SEC ID NO:15. Preferiblemente, la secuencia de nucleótido tiene al menos, 85% de identidad, tal como al menos, 90% de identidad, más preferiblemente al menos, 95% de identidad, tal como al menos, 96% de identidad, por ejemplo, al menos 97% de identidad, aún más preferiblemente al menos, 98% de identidad, tal como al menos 99% con nucleótidos 133 a 495 de la SEC ID NO.15. Preferiblemente, la secuencia de nucleótido codifica un polipéptido que tiene actividad de fosfolipasa.

La fosfolipasa se puede derivar de una cepa de *Fusarium*, particularmente, *F. venenatum*, usando sondas designadas en base a las secuencias de ADN en esta especificación. En una modalidad, la fosfolipasa tiene actividad de fosfolipasa A.

Las fosfolipasas pueden ser producidas transformando una célula hospedera adecuada con una secuencia de ADN que codifica la fosfolipasa, cultivando el organismo transformado bajo condiciones que permiten la producción de la enzima, y recuperando la enzima del cultivo.

El organismo hospedero es preferiblemente una célula eucariótica, en particular una célula fúngica, tal como una célula de levadura o una célula fúngica filamentosa, tal como una cepa de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma* o *Saccharomyces*, particularmente *A. niger*, *A. oryzae*, *F. venenatum*, *F. sambucinum*, *F. cereals* o *S. cerevisiae*, por ejemplo, una cepa que produce glucoamilasa de *A. niger*, tal como aquella descrita en el documento US 3677902 o un mutante del mismo. La producción de la fosfolipasa en tales organismos hospederos se puede hacer por los métodos generales descritos en los documentos EP 238,0283 (Novo Nordisk), WO 96/00787 (Novo Nordisk) o EP 244,234 (Alko).

El vector de expresión de la invención, típicamente incluye secuencias de control que funcionan como un promotor, una señal de iniciación de traducción y, opcionalmente, un marcador seleccionable, un terminador de transcripción, un gen represor o varios genes activadores. El vector puede ser un vector de replicación autónomo, o puede ser integrado en el genoma de la célula hospedera.

Alineación e identificación de secuencia

Las secuencias de nucleótido se pueden alinear con la aplicación de AlignX del Programa Vector NTI Suite 7.0, usando los ajustes por defecto, los cuales emplean un algoritmo ClustalW modificado (Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson T. J. (1994) Nuc. Acid Res. 22: 4673-4680), la matriz de registro swgapdnarnt, una penalización por apertura en hendidura de 15 y una penalización por extensión en hendidura de 6.66.

Las secuencias de aminoácido pueden ser alineadas con la aplicación de AlignX del Programa Vector NTI Suite v8 usando ajustes por defecto, los cuales emplean un algoritmo ClustalW modificado (Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson T. J. 1994), la matriz de registro blosum62mt2, una penalización por apertura en hendidura de 10 y una penalización por extensión en hendidura de 0.1.

En una modalidad de la invención, las alineaciones de secuencia y cálculo de los registros de homología se hacen usando el Método Lipman-Pearson (Lipman, D. J. and W. R. Pearson (1985) Rapid and sensitive protein similarity searches. Science 227: 1435-1441), usando una tabla de peso de residuo PAM250 (Dayhoff, M. O., R. M. Schwartz, and B. C. Orcutt (1978) A model of evolutionary change in proteins. In Dayhoff, M. O. (ed.), Atlas of Protein Sequence and Structure. National Biomedical Research Foundation. Washington, D. C. Vol

5. Suppl. 3: pp 345-358) y los ajustes por defecto del programa MegAlign, v4.03, en el paquete de software Lasergene (DNASTAR Inc., 1228 South Park Street, Madison, Wisconsin 53715). Los ajustes por defecto son un K-tupla de 2, penalización en hendidura de 4, y una penalización por longitud en hendidura de 12.

Hidrólisis de fosfolípidos

La invención puede ser usada en la hidrólisis de cualquier fosfolípido tal como una lecitina, una cefalina o un inositido.

La invención puede ser usada en analogía con procesos de la técnica anterior reemplazando la fosfolipasa por ejemplo, en la producción de productos horneados (documentos WO 0032758, WO 9953769), salsa de mayonesa (documentos GB 1525929, US 4034124) o tratamiento de aceite vegetal (documento US 5264367).

Uso de fosfolipasa

La fosfolipasa de la invención puede ser usada en varias aplicaciones industriales de fosfolipasas, por ejemplo, como se describe abajo.

Uso en Horneado

La fosfolipasa de la invención puede ser usada en la preparación de pastas, panes y pasteles, por ejemplo, para mejorar la elasticidad del pan o pastel. De este modo, la fosfolipasa puede ser usada en un proceso para hacer pan, que

comprende agregar la fosfolipasa a los ingredientes en una pasta, amasando la pasta y hornear la pasta para hacer el pan. Esto se puede hacer en analogía con los documentos 4567056 o WO 99/53769.

Uso en detergentes

La variante puede ser usada como un aditivo de detergente, por ejemplo, a una concentración (expresada como proteína de enzima pura) de 0.001-10 (por ejemplo, 0.01-1) mg por gramo de detergente o 0.001-100 (por ejemplo, 0.010-10) mg por litro de licor de lavado.

La composición de detergente de la invención puede por ejemplo, ser formulada como una composición de detergente para lavandería a mano o en máquina que incluye, una composición aditiva de lavandería adecuada para el pre-tratamiento de telas teñidas y una composición suavizante de telas agregada al enjuague, o ser formulada como una composición detergente para uso en las operaciones de limpieza de superficies duras domésticas en general. En un detergente de lavandería, la variante puede ser efectiva para la remoción de manchas de grasa, o mantenimiento de la blancura o para limpieza sordida. Una composición de detergente para lavandería puede ser formulada como se describe en los documentos GB 2247025, WO 9901531 o WO 9903962.

La composición detergente de la invención puede ser particularmente formulada para operaciones de lavado de platos

a mano o a máquina, por ejemplo, como se describe en los documentos GB 2,247,025 (Unilever) o WO 99/01531 (Procter & Gamble). En una composición para lavavajillas, la variante puede ser efectiva para eliminación de manchas grasosas/aceitosas, para prevención del manchado/decoloración de los componentes plásticos y desgaste de trastes de la lavavajillas por componentes altamente coloreados y la evitación de depósitos de jabón de cal en el desgaste de trastes.

Otros usos

La fosfolipasa de la invención puede ser usada para mejorar la capacidad de filtración de una solución o suspensión acuosa de origen carbohidrato, tratándola con la fosfolipasa. Esto es particularmente aplicable a una solución de suspensión que contiene hidrolizado de almidón, especialmente un hidrolizado de almidón de trigo, puesto que tiende a ser difícil filtrar y dar filtrados grumosos. El tratamiento se puede hacer en analogía con el documento EP 219,269 (CPC International).

Además, la fosfolipasa de la invención puede ser usada para hidrólisis parcial de fosfolípidos, preferiblemente lecitina, para obtener emulsificadores de fosfolípidos mejorados. Esta aplicación es además descrita en Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry (Publisher: VCH Weinheim (1996)), patente JP 2794574, y JP-B 6-087751.

Además, las fosfolipasas de la invención pueden ser usadas en un proceso para la producción de un alimento para animales, el cual comprende mezclar la fosfolipasa con sustancias alimenticias y al menos, un fosfolípido. Esto se puede hacer en analogía con el documento EP 743 017.

Aún además, la fosfolipasa de la invención se puede usar en un proceso para reducir el contenido de fosfolípidos en un aceite comestible, que comprende tratar el aceite con la fosfolipasa para hidrolizar una parte principal del fosfolípido, y separar una fase acuosa que contiene el fosfolípido hidrolizado a partir del aceite. Este proceso es aplicable a la purificación de cualquier aceite comestible el cual contiene fosfolípidos, por ejemplo, aceite vegetal tal como aceite de soya, aceite de nabo y aceite de girasol. La fosfolipasa puede por ejemplo, ser usada en el proceso descrito en el documento JP-A-2-133997 y US 5264367.

Método para producir queso

La fosfolipasa de la invención puede además ser usada para producir queso en analogía con el proceso dado en el documento US 6399121.

En una modalidad preferida de la invención, el queso es producido poniendo en contacto la leche de quesería o una fracción de la leche de quesería con una fosfolipasa de la invención, y producir queso a partir de la leche de quesería.

En una modalidad más preferida, el queso es

producido poniendo en contacto la leche de quesería o una fracción de la leche de quesería con una fosfolipasa, en donde la fosfolipasa comprende:

- a) la secuencia dada por los aminoácidos 146-153 de la SEC ID NO:1, aminoácidos 87-94 de la SEC ID NO:3; o aminoácidos 79-86 de la SEC ID NO:12; o una secuencia idéntica a cualquiera de estas secuencias de aminoácido excepto por la sustitución de un aminoácido único con otro aminoácido; y
- b) dos residuos de cisteína ubicados en el extremo N-terminal de la secuencia dada en a); y
- c) dos residuos de cisteína ubicados en el extremo C-terminal de la secuencia dada en a).

En el presente contexto, el término leche de quesería significa cubrir cualquiera de las composiciones a base de leche usadas para la producción de queso. Una fracción de la leche de quesería puede ser cualquier fracción de leche de quesería tal como por ejemplo, leche desnatada, leche, suero de mantequilla, mantequilla o grasa de leche.

En una modalidad preferida, la leche de quesería o una fracción de la leche de quesería se ponen en contacto con una fosfolipasa de la invención, en una cantidad suficiente para disminuir el efecto de engrase en el queso y/o incremento del rendimiento del queso. El efecto de engrase es la

tendencia del queso para formar aceite libre después del almacenamiento y/o fusión.

En un aspecto, la invención se refiere a un proceso para producir queso que comprende, tratar una composición láctea con una fosfolipasa de la invención y producir queso a partir de la composición láctea.

Otro aspecto de la invención se refiere a un proceso para producir queso que comprende, tratar una composición láctea con fosfolipasa y producir queso a partir de la composición láctea, en donde la fosfolipasa se selecciona del grupo de fosfolipasas PLA2 del grupo XIII fúngico/bacteriano. En una modalidad preferida de la invención, la PLA2 del grupo XIII fúngica/bacteriana es de un hongo, más preferiblemente de un hongo que pertenece a los *Ascomycetes*. Una fosfolipasa que pertenece a PLA2 del grupo XIII fúngico/bacteriano, puede ser cualquier fosfolipasa que pertenece a este grupo como se define por Soragni et al., *The EMBO Journal*, 20 (2001), 5079-5090, y puede ser por ejemplo, de especies *Tuber*, por ejemplo, *T. borchii*, *Streptomyces*, por ejemplo, *S. coelicor*, *Verticillium*, por ejemplo, *V. dahliae*, *Aspergillus*, por ejemplo, *A. oryzae*, *Neurospora*, por ejemplo, *N. crassa*, o *Helicosporum*.

Una composición láctea de conformidad con la invención, puede ser cualquier composición que comprende constituyentes de leche. Los constituyentes de la leche pueden

ser cualquier constituyente de leche tal como grasa de leche, proteína de leche, caseína, proteína de lactosuero, y lactosa. Una fracción de leche puede ser cualquier fracción de leche tal como por ejemplo, leche desnatada, suero de mantequilla, lactosuero, crema, polvo de leche, polvo de leche entera, polvo de leche desnatada. En una modalidad preferida de la invención, la composición láctea comprende, leche, leche desnatada, suero de mantequilla, leche entera, lactosuero, crema o cualquier combinación de los mismos. En una modalidad más preferida, la composición láctea consiste de leche, tal como leche desnatada, leche entera, crema, suero de mantequilla o cualquier combinación de los mismos.

El tratamiento enzimático en el proceso de la invención puede ser conducido dispersando la fosfolipasa en la composición láctea, y permitiendo que tome lugar la reacción enzimática a un tiempo de mantenimiento apropiado a una temperatura apropiada. El tratamiento con fosfolipasa se puede llevar a cabo en condiciones elegidas para adecuar la(s) enzima(s) seleccionadas de conformidad con los principios bien conocidos en la técnica.

El tratamiento enzimático puede ser conducido en cualquier pH adecuado, tal como por ejemplo, en el intervalo de 2-10, tal como a un pH de 4-9, ó 5-7. En una modalidad, el tratamiento de fosfolipasa se conduce a 3-60°C, tal como a 25-45°C (por ejemplo, por al menos 5 minutos, tal como por

ejemplo, por al menos 10 minutos o al menos 30 minutos, por ejemplo, por 5-120 minutos). La fosfolipasa se agrega en una cantidad adecuada para producir queso que tiene las propiedades deseadas. Preferiblemente, la fosfolipasa se agrega en una cantidad efectiva para disminuir el efecto desgrasante en queso y/o incrementar el rendimiento del queso. Una dosificación adecuada de fosfolipasa usualmente estará en el intervalo de 0.001-0.5 mg de proteína enzimática por g de grasa de leche, preferiblemente, 0.01-0.3 mg de proteína enzimática por g de grasa de leche, más preferiblemente, 0.02-0.1 mg de proteína enzimática por g de grasa de leche.

Los quesos producidos por el proceso de la presente invención comprenden todas las variedades de queso, tales como por ejemplo, Campesino, Chester, Danbo, Drabant, Herregard, Manchego, Provolone, Saint Paulin, queso Soft, Svecia, Taleggio, queso White, que incluye queso de cuajo de requesón producido por la coagulación del cuajo del requesón del queso; quesos madurados tales como Cheddar, Colby, Edam, Muenster, Gruyere, Emmenthal, Camembert, Parmesano y Romano; quesos azules, tales como queso azul Danés; quesos frescos tales como Feta; quesos ácidos coagulados tales como, queso crema, Neufchatel, Quarg, queso Cottage y Queso Blanco. En una modalidad preferida, la invención se refiere a un proceso para producir un queso pasta filata, tal como por ejemplo, queso Mozzarella y para Pizza. Los quesos pasta filata o quesillo,

están normalmente distinguidos por un tratamiento de plastificado y amasado único del requesón en agua caliente, lo cual imparte al queso acabado, su estructura fibrosa característica y propiedades de fusión y estiramiento, cotéjese por ejemplo, "Mozzarella and Pizza cheese por Paul S. Kindstedt, Cheese: Chemistry, physics and microbiology, Volume 2: Major Cheese groups, segunda edición, página 337-341, Chapman & Hall.

Listado de Secuencia y Microorganismos Depositados

La presente solicitud contiene información en la forma de un listado de secuencia, el cual es adjunto a la solicitud y también está proporcionado en un portador de datos que acompaña esta solicitud. Además, la presente invención se refiere a microorganismos depositados. Los contenidos del portador de datos y los microorganismos depositados están completamente incorporados en este documento por referencia.

Depósito de Material Biológico

El siguiente material biológico ha sido depositado bajo los términos del Tratado de Budapest con el Deutsche Sammiung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1 B, D-38124 Braunschweig, Alemania, y dando el siguiente número de acceso:

Depósito	Número de Acceso	Fecha de Depósito
<i>E. coli</i>	DSM 15441	12 Febrero de 2003
<i>E. coli</i>	DSM 15442	12 Febrero de 2003

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios y sustratos

Medio YP+2%G

10 g de extracto de levadura
20 g de peptona
agua a 1L
autoclave a 121°C, 20 minutos
agregar 100 ml al 20% de solución de glucosa estéril

Medio de esporulación RA:

50 g de ácido succínico
12.1 g de nitrato de sodio
1 g de glucosa
20 ml de sales Vogel 50x (Davis, R.H. y F. J. de Serres (1970), Meth. Enzymol. 17A:79-143).

los componentes son mezclados en un litro de agua destilada y esterilizados por filtración.

Amortiguador Britton Robinson

0.023 M de ácido fosfórico
0.023 M de ácido acético
0.023 M de ácido bórico
Titulado con NaOH o HCl a pH deseado

Métodos

Actividad de fosfolipasa (LEU)

La lecitina es hidrolizada bajo pH y temperatura constante, y la actividad de fosfolipasa es determinada como

la velocidad de consumo de valoración (0.1N de NaOH) durante la neutralización del ácido graso liberado.

El sustrato es lecitina de soya (L- α -fosfatidilcolina), y las condiciones son pH 8.00, 40.0°C, tiempo de reacción 2 minutos. La unidad es definida con relación a un estándar.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Expresión de fosfolipasa A2 a partir de *Tuber albidum* en *Aspergillus oryzae*

La secuencia de ADN descrita en Soragni et al. (supra), se usó para diseñar cebadores para amplificación de RCP de TbSP1 a partir de ADN genómico, con sitios de restricción apropiados agregados a los extremos cebadores para facilitar la clonación del producto de PCR (SEC ID NO:12 y 14). Se obtuvo una cepa *Tuber albidum*, CBS 272.72 a partir de CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utecht, Holanda), y se cultivó en agar X a 20°C, como se recomienda por la CBS en la Lista de Cultivos, 1996. Se removió el micelio de la superficie de la placa y se aisló el ADN total usando un Kit de Rotación FastDNA (BIO101, Inc., Vista, CA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó la amplificación por RCP usando Extensor de Mezcla Principal de RCP de Alta Fidelidad (ABgene, Surrey, U.K), siguiendo las instrucciones del fabricante y usando una temperatura de templado de 52°C por los primeros 5 ciclos y 62°C por los últimos 25 ciclos. Se

obtuvo un producto de RCP único, y la secuencia se determinó y se presentó como la SEC ID NO 9 que excluye los sitios de restricción sintéticos agregados. La comparación de esta secuencia genómica a la secuencia de ADNc presentada por E. Soragni et al., reveló un intrón único. Cuando el intrón se removió, la secuencia de nucleótido a partir de *T. albidum* CBS272.72 es 92.5% idéntica a aquella de *T. borchii* ATCC 96540, la cepa se usó por E. Soeagni et al. El péptido correspondiente predicho de la secuencia del gen *T. albidum* CBS272.72, es 93.8% idéntico a la secuencia peptídica reportada por Soragni et al.

El fragmento de PCR fue restringido con *Bam*HI y *Xho*I y clonado en el vector de expresión de *Aspergillus* pMStr57, usando técnicas estándares. El vector de expresión pMStr57 contiene los mismos elementos como pCaHj483 (documento WO 98/00529), con modificaciones menores hechas al promotor NA2 de *Aspergillus*, y tiene las secuencias para la selección y propagación en *E. coli*, y la selección y expresión en *Aspergillus*. Específicamente, la selección en *Aspergillus* es facilitada por el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans*, el cual permite el uso de acetamida como una fuente de nitrógeno sola. La expresión en *Aspergillus* es mediada por un promotor de amilasa II neutral modificada (NA2) a partir de *Aspergillus niger*, el cual es fusionado a la secuencia líder al 5' del gen que codifica a fosfato isomerasa (*tpi*) a partir de *Aspergillus*

nidulans, y el terminador a partir del gen que codifica a amiloglucosidasa a partir de *Aspergillus niger*. El gen que codifica a fosfolipasa A2 del constructo de expresión de *Aspergillus* resultante, pMStr70, fue secuenciado y la secuencia se comparó con aquella determinada previamente por el fragmento de PCR no clonado, la SEC ID NO.9. Una mutación única T a C se encontró 52 pb corriente abajo del codon de detención.

Se transformó *Aspergillus oryzae* con pMStr70 usando técnicas estándares descritas en Christensen, T. et al., (1988), *Biotechnology* 6, 1419-1422. Los transformantes fueron cultivados en medio YP+2%G sacudido a 275 RPM a 30°C y la expresión de la fosfolipasa A2 de *Tuber*, TbPLA2, fue monitoreada por SDS-PAGE.

Caracterización de Proteína

La SDS-PAGE reveló dos bandas, con aproximadamente Pm de 25 y 16 kDa. El sobrenadante se purificó por cromatografía de intercambio iónico en una columna de Sefarosa SP equilibrada con 50 mM de amortiguador de acetato, y se eluyó con 1 M de NaCl, pH 5.0. Las dos proteínas eluyeron en dos fracciones separadas. La concentración de proteína se determinó usando el Ensayo de Proteína ESL de Roche. La actividad se determinó en el ensayo LEU.

	Pm kDa	Concentración mg/ml	Actividad LEU/ml	Actividad específica LEU/mg
Combinación 1	23-25	1.32	61	46
Combinación 2	16	0.42	272	648

Las proteínas fueron sometidas a secuenciamiento N-terminal. La secuencia N-terminal de la combinación 1 (banda de 23-25 kDa), se encontró corresponder a los aminoácidos 32-50 de la SEC ID NO:10. El manchado de la combinación 2 (banda de 16 kDa), reveló dos bandas con secuencias N-terminal que corresponden a los aminoácidos 86-98 y 91-103, respectivamente. El análisis espectral de las dos bandas mostró masas de 13934 y 14348 Da respectivamente, igualando con 5 Da de volúmenes calculados de las secuencias de aminoácidos 86-210 y 91-210 de la SEC ID NO:10, respectivamente.

Ejemplo 2: Procedimiento de purificación para dos formas de PLA2 de *T. albidum* expresada en *Aspergillus oryzae*

En la mayoría de las fermentaciones del transformante *Aspergillus oryzae* descrito en el Ejemplo 1 que produce PLA2 de *T. albidum*, se detectaron dos formas de la enzima durante la purificación. Una forma funcionó a 22-23 kDa en SDS-PAGE y que corresponde al péptido reportado por Soragni et al. (supra). Adicionalmente, se detectó una nueva forma la cual funcionó a 16-17 kDa en SDS-PAGE y la cual tiene una alta actividad específica y un alto punto isoeléctrico.

Purificación del péptido de 22-23 kDa

El sobrenadante de fermentación que contiene fosfolipasa de *T. albidium* expresado en *A. oryzae* (preparado en el Ejemplo 1), se filtró estéril usando filtro EKS adquirido de Seitz Schenk Bad Kreunzsch, Bettringerstrasse 42, Alemania D-73550, Waldstetten.

El sobrenadante filtrado estéril entonces se ajustó a pH 8 y a fuerza iónica bajo 4 mSi.

Cromatografía de Intercambio Aniónico

Se llevó a cabo la primera etapa de purificación en cromatografía de intercambio aniónico usando 50 ml de columna sefarosa de Flujo Rápido QTM, adquirida de Amersham Pharmacia. La columna se equilibró con 50 mM de amortiguador de acetato Tris pH 8. El caldo de fermentación filtrado estéril entonces se aplicó en la columna y la columna se lavó con el mismo amortiguador hasta que todo el material no unido se lavó.

Las proteínas unidas fueron eluidas con el mismo amortiguador que contiene 1M de cloruro de sodio a pH 8 con velocidad de flujo de 5 ml/minutos y a un volumen final de 500 ml de amortiguador total. Las fracciones de 5 ml cada una, fueron colectadas usando un colector de fracción y la actividad de fosfolipasa de todas las que contienen las fracciones fue ensayada usando Lecitina como sustrato usando L- α -fosfatidil colina adquirida de Sigma Producto P-5638 y la actividad se sometió a ensayo usando un kit NEFA C adquirido

de Wako Chemicals GmbH, Nissan Strasse 2, 41468 Neuss, Alemania. El ensayo exacto es descrito a continuación.

Las soluciones del sustrato que contienen 10 mg/ml de sustrato de Lecitina fueron preparadas en amortiguadores diferentes tales como 50 mM de acetato a pH 5 ó 50 mM de Hepes a pH 7 ó 50 mM de acetato Tris a pH 9 como amortiguadores que contienen 2 mM de CaCl₂ y 0.1% Triton X-100 adquirido de Fluka chemicals. El sustrato fue entonces emulsificado por agitación y calentamiento a 50°C y después enfriado a 40°C y se usó como sustrato.

El ensayo de actividad se llevó a cabo usando 300 µl de la emulsión del sustrato incubada con 25 µl de las fracciones enzimáticas por 20 minutos a 40°C, después 30 µl de la mezcla de ensayo se transfirieron a 300 µl del reactivo de color NEFA C A, preparado como se describe por el fabricante e incubado por 10 minutos a 37°C y se agregó 600 µl de solución del reactivo de color FECA C B a la mezcla y después se incubó por 10 minutos. El color azul formado fue entonces medido en un espectrofotómetro a 505 nm.

Caracterización de Proteína

Las fracciones que contienen la actividad fueron entonces combinadas y caracterizadas por el peso molecular usando electrofóresis SDS-PAGE usando geles pre teñidos Novex 4 a 20% de geles Tris-Glicina adquiridos de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA 92008, USA.

La proteína de 22-23 kDa se detectó y se analizó mediante blot y se llevó a cabo el análisis N-terminal usando un secuenciador Applied Biosystem.

Los primeros 19 residuos de aminoácidos a partir de N-terminal, fueron determinados y se encontraron tener la secuencia de aminoácidos 32-50 de la SEC ID NO:10.

Purificación del péptido de 16-17 kDa

La fermentación filtrada estéril del sobrenadante de la fosfolipasa de *T. albidum* expresada en *A. oryzae*, se ajustó a pH 4.7 y se ajustó la resistencia iónica por debajo de 4 mSi.

Cromatografía de intercambio catiónico

El flujo rápido SP-sepharose™, se adquirió de Amersham Pharmacia. Se envasaron 50 ml de columna y se equilibraron con 50 mM de amortiguador de acetato a pH 4.7, el sobrenadante de fermentación entonces se aplicó en la columna y el material no unido se lavó usando el mismo amortiguador.

La proteína unida con pl alta, entonces se eluyó con un gradiente lineal de sal usando 50 mM de amortiguador de acetato a pH 4.7 que contiene 1 M de cloruro de sodio. Las fracciones y velocidades de flujo fueron similares a aquellas usadas para el pl bajo a partir de la fosfolipasa. La actividad de fosfolipasa en las fracciones se sometió a ensayo cualitativamente usando un kit NEFA como anteriormente. Las fracciones que contienen la actividad de fosfolipasa fueron combinadas y se llevó a cabo SDS-PAGE como

se describe anteriormente.

Se observó la proteína de 16-17 kDa, la cual tiene un punto isoeléctrico alto, arriba de 9.

El análisis N-terminal de la proteína se llevó a cabo después del análisis de blot de la proteína y usando secuenciador de Applied biosystem, el cual mostró un N-terminal el cual fue completamente diferente de un publicado en Soragni et al. (supra). De este modo, se encontró la PLA2 de *T. albidum*, por tener dos formas que derivan del procesamiento N-terminal diferencial con secuencias N-terminal que corresponden a los aminoácidos 86-105 y 91-110 de la SEC ID NO:10, respectivamente.

Ejemplo 3: Elaboración de queso con fosfolipasa de *T. albidum*

Se usó crema no homogenizada, pasteurizada (North Carolina State University Dairy Plant), para estandarizar quinientos gramos de leche desnatada no homogenizada, pasteurizada (North Carolina State University Dairy Plant), a 3.5% de grasa, produciendo de este modo, queso mozzarella de pura crema. La leche de quesería para cada experimento se trató con ya sea fosfolipasa de *T. albidum* de 16-17 kD, preparada de conformidad con el ejemplo 2, o la Lecitase® de fosfolipasa comercial 10L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), y se colocó en baño maría a 35°C hasta equilibrar a tal temperatura. Se tomó el pH inicial de esta leche de quesería y se agregaron 0.01% (p/p) del cultivo iniciador. El

pH se monitoreó hasta que se alcanzó un pH de 6.4. Se diluyeron 250 µl de cuajo (Novozym 89L) a 9 ml de solución total con agua desionizada, un ml de esta solución se agregó a la leche de quesería y la leche de quesería se agitó vigorosamente por 3 minutos. La barra de agitación se removió y la leche recuajada se dejó asentarse a 35°C.

Después de los tratamientos anteriores, el requesón está listo para cortarse cuando la espátula es insertada y se observan los bordes agudos. El queso se cortó empujando el cortador hacia abajo y mientras se mantiene el vaso de precipitado rápidamente, cambiar el cortador y finalmente poniendo el cortador encima. El requesón se dejó reposar 5 minutos, después se agitó suavemente con la cuchara. La temperatura se elevó a 41°C con agitación suave intermitente por ~45 minutos o hasta que el pH cayó a 6.0-5.9. El requesón se drenó usando una gasa, después se reemplazó en el vaso de precipitado y se mantuvo a 41°C en baño maría mientras se vertía el lactosuero como sea necesario.

Cuando el requesón alcanzó pH 5.3, el tazón de acero inoxidable con el requesón se inundó en un baño maría a 69°C por 5 minutos, después que se ha estirado. El requesón se templó en agua helada con hielo por 30 minutos. El requesón del queso se secó con papel secante, se pesó y refrigeró durante la noche.

Los experimentos de control para elaborar queso fueron

elaborados a partir del mismo lote de leche, siguiendo los mismos procedimientos, excepto que no se agregó fosfolipasa.

El rendimiento actual del queso se calculó como el peso del queso después del estiramiento, con relación al peso total de la leche de quesería.

El rendimiento del queso de humedad ajustada se expresa como el rendimiento actual ajustado a un nivel estándar constante de humedad. El rendimiento de humedad ajustada se calculó multiplicando el rendimiento actual y la relación de contenido de humedad actual a la humedad estándar, de conformidad con la siguiente fórmula:

$$Y_{ajus} = (Y_{act} \times 1 - M_{act}) / (1 - M_{est})$$

en donde Y_{ajus} = rendimiento del queso de humedad ajustada, Y_{act} = rendimiento del queso actual, M_{act} = fracción de humedad actual y M_{est} = fracción de humedad estándar (0.48).

El rendimiento del queso de humedad ajustada de todos los experimentos y controles se muestra en la tabla 1.

Tabla 1

Tecnicario	Fosfolipasa mg de proteína en 100 g de queso	Rendimiento del queso ajustado a la humedad	Incremento de rendimiento comparado con el control
Control PLA2 de <i>T. albidum</i>	0 0.055	10.72 11.04	29%
Control PLA2 de <i>T. albidum</i>	0 0.055	11.25 11.57	28%
Control 10L de Lactosa®	0 0.18	9.22 9.48	27%
Control 10L de Lactosa®	0 0.18	9.82 9.90	28%

Ejemplo 4: Clonación y expresión de una fosfolipasa (FvPLA2) a partir de *Fusarium venenatum* en *Aspergillus oryzae*

Células de *Fusarium venenatum* A3/5 (originalmente depositadas como *Fusarium graminearum* ATCC 20334 y recientemente reclasificadas como *Fusarium venenatum* por Yoder and Christianson, 1998, Fungal Genetics and Biology 23:62-80; y O'Donnell et al., 1998, Fungal Genetics and Biology 23:57-67), se hicieron crecer por dos días en medio mínimo de Vogel (Davis, R. H. and F. J. de Serres (1970), Meth. Enzymol. 17A:79-143) a 28°C en cultivo sacudido, filtrado en tela Miracloth estéril (Calbiochem, San Diego, California, USA), y se transfirieron a "medio de esporulación RA", en el cual fueron incubadas en cultivo sacudido por unas 24 horas adicionales a 28°C. Las células y esporas fueron colectadas por centrifugación y lisado, se extrajo ARN y se transcribió en ADNc que fue clonado en pZErO-2 por los métodos descritos en el documento WO 00/56762. El número de clones independientes en esta biblioteca antes de la amplificación fue 2.5×10^5 , del cual, 92% contiene insertos que varían en tamaño desde 550-2500 pb. Se determinaron las secuencias de ADN parciales por aproximadamente 1000 clones elegidos aleatoriamente y las secuencias fueron almacenadas en una base de datos por ordenador, por métodos descritos en el documento WO 00/56762.

La secuencia de nucleótido de un ADNc que codifica TbSP1, una fosforilasa A2 de *Tuber borchii*, y la traducción

del péptido correspondiente, fueron reportador por E. Soragni et al., 2001. Esta secuencia peptídica traducida se comparó con las traducciones de las secuencias de ADNc parciales de *Fusarium venenatum*, usando el programa TFASTXY, versión 3.3t08 (Pearson et al., 1997). Una secuencia traducida de *F. venenatum* se identificó por tener 42% de identidad a TbSP1 a través de un traspale de 125 aminoácidos. La secuencia completa del inserto de ADNc del clon correspondiente, FM0700 se determinó y está presente como la SEC ID NO:15, y el péptido traducido de esta secuencia, FvPLA2, se presenta como SEC ID NO:16. Esta secuencia se usó para diseñar los cebadores FvPLA1, y FvPLA2.2 por amplificación de RCP del gen que codifica a FvPLA2 a partir de FM0700, con sitios de restricción apropiados agregados a los extremos cebadores para facilitar la sub-clonación del producto de RCP.

FvPLA1:CTGGGATCCTCAAGATGAAGTTCAGCG

FvPLA2.2:GACCTCGAGACCCGCCATTTAAGATT

Se realizó amplificación de RCP usando Extensor de Mezcla Principal de RCP de Alta Fidelidad (ABgene, Surrey, U.K), siguiendo las instrucciones del fabricante y usando una temperatura de templado de 52°C y una temperatura de extensión de 60°C por 20 ciclos.

El fragmento de PCR fue restringido con *Bam*HI y *Xho*I y clonado en el vector de expresión de *Aspergillus* pMStr57, usando técnicas estándares. El vector de expresión pMStr57

contiene los mismos elementos como pCaHj483 (documento WO 98/00529), con modificaciones menores hechas al promotor NA2 de *Aspergillus*, como se describe para el vector pMT2188 en el documento WO 01/12794, y tiene secuencias para selección y propagación en *E. coli*, y la selección y expresión en *Aspergillus*. Específicamente, la selección en *Aspergillus* es facilitada por el gen *amdS* de *Aspergillus nidulans*, el cual permite el uso de acetamida como una fuente de nitrógeno sola. La expresión en *Aspergillus* es mediada por un promotor de amilasa II neutral modificada (NA2) a partir de *Aspergillus niger*, el cual es fusionado a la secuencia líder al 5' del gen que codifica a fosfato isomerasa (*tpi*) a partir de *Aspergillus nidulans*, y el terminador a partir del gen que codifica a amiloglucosidasa a partir de *Aspergillus niger*. El gen que codifica a fosfolipasa del constructo de expresión de *Aspergillus* resultante, pMStr77, fue secuenciado y la secuencia agregada completamente con aquella determinada previamente por el inserto de FM0700.

Se transformó la cepa *Aspergillus oryzae* BECh2 (documento WO 00/39322) con pMStr77 usando técnicas estándares (Christensen, T. et al., 1988). Los transformantes fueron cultivados en medio YP+2%G sacudido a 275 RPM a 30°C y la expresión de FvPLA2, fue monitoreada por SDS-PAGE.

Una cepa de *Escherichia coli* que contiene un gen que codifica la fosfolipasa a partir de *F. venenatum*, fue

depositada por los inventores bajo los términos del Tratado de Budapest con Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH, MascheroderWeg 1b, D- 38124 Braunschweig, Alemania. La fecha del depósito fue 12 de febrero de 2003, y el número de acceso fue DSM 15442.

Ejemplo 5: Purificación y comparación de secuencia de FvPLA2

FvPLA2 a partir de la fermentación del ejemplo 4, se purificó por cromatografía de intercambio iónico en una columna SP-sepharose equilibrada con 50 mM de amortiguador de acetato a pH 4.7 y eluida con 1M de NaCl a pH 4.7. Las fracciones fueron analizadas en SDS-PAGE, y las fracciones que contienen una proteína de 14 kDa fueron combinadas. La identidad de la proteína pura se confirmó determinando la secuencia N-terminal, la cual fue idéntica a la secuencia del aminoácido (aa) 29-40 de la SEC ID NO:16. Adicionalmente, la masa del péptido se determinó por análisis de espectro de masas, debido a que el tamaño aparente estimado de SDS-PAGE, 14 kDa, es más pequeño que aquél del péptido predicho por el procesamiento del péptido teórico en la SEC ID NO:16. La masa de la FvPLA2 activa, purificada, se encontró por ser de 13336 Da. Esta masa molecular indica procesamiento terminal en el C-término y es consistente con un desdoblamiento entre los aminoácidos 149 y 150 en la SEC ID NO:16, como el péptido de la secuencia de un aminoácido 29 a 149 tiene una masa teórica de 13335,66 Da.

Una comparación del péptido procesado maduro (aminoácidos 29-149 de la SEC ID NO:16), con las secuencias conocidas, muestra que la secuencia de la técnica anterior más cercana, fue una fosfolipasa a partir de *Verticillium dahliae*, traducida de la Unisequencia ID:VD0100C34 de la COGEME Base de datos EST Hongo Fitopatogénico y Oomiceto, Versión 1.2 (<http://cogeme.ex.ac.uk/>) (Soanes et al. (2002) Genomics of phytopathogenic fungi and the development of bioinformatic resources. Mol Plant Microbe Interact. 15 (5): 421-7). El procesamiento del péptido parcial predicho de la secuencia de *V. dahliae* fue estimado por comparación al procesamiento encontrado para FvPLA2. La identidad entre los aminoácidos 29 a 149 de la SEC ID NO:16 y la secuencia estimada del péptido maduro de la fosfolipasa *V. dahliae*, se calculó por ser 77%.

Ejemplo 6: Propiedades físicas de FvPLA2

Actividad catalítica

La actividad de fosfolipasa como una función de la concentración enzimática, se determinó en el ensayo LEU para FvPLA2 del ejemplo 4. Los resultados se muestran en la tabla 1.

Tabla 1

Concentración enzimática (µg/ml)	LEU (µeq de NaOH/min)
71.1	14.0
53.3	12.7
21.3	10.6
10.7	7.4
5.3	5.6
2.7	4.1

Perfil de Temperatura

La actividad enzimática como una función de la temperatura, se determinó por una solución enzimática con una concentración de 5.3 µg/ml. Otras condiciones como en el ensayo LEU. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Temperatura (°C)	LEU (µeq de NaOH/min)
25	3.10
35	4.87
40	5.41
45	6.97
50	7.86
55	9.03
60	8.27
65	6.90

Estabilidad de pH

La enzima se diluyó en amortiguador Britton Robinson a el pH especificado por 30 minutos a 30°C. Después de la dilución en agua, se midió la actividad catalítica en el ensayo LEU. Los resultados se muestran en la tabla 3.

Tabla 3.

pH	LEU (µeq NaOH/min)
2	3.78
3	5.11
4	5.60
5	5.49
6	5.37
7	5.61
8	5.52
9	5.64
10	5.50
11	5.21

Termoestabilidad

La enzima se diluyó en amortiguador Britton Robinson a pH 3 y 10 respectivamente, y a pH 7 con sorbitol al 30%. Después de la incubación a la temperatura especificada por 30 minutos, la solución se enfrió a la temperatura de reacción y se analizó en el ensayo LEU. Los resultados se muestran en la tabla 4; las actividades se dan relativas a la actividad de medición más alta.

Tabla 4. Actividad relativa (%) como una función de pH y temperatura

Temperatura (°C)	pH 3	pH 10	pH7/sorbitol al 30%
30	100%	100%	87%
40	95%	92%	100%
50	16%	14%	68%
60	1%	0%	2%

Ejemplo 7: Elaboración de queso con FvPLA2

Se usó crema no homogenizada, pasteurizada (Planta de Lácteos de la Universidad Estatal de Carolina del Norte) para estandarizar quinientos gramos de leche desnatada no homogenizada, pasteurizada (Planta Láctea de la Universidad Estatal de Carolina del Norte) con 3.5% de grasa, así para producir queso mozzarella de pura crema.

La leche de quesería para cada experimento se trató con ya sea con la fosfolipasa (FvPLA2) de *F. venenatum* preparada de conformidad con el ejemplo 5, o de la fosfolipasa

comercial Lecitase® 10L (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca), y se colocó en un baño maría a 35°C hasta que la temperatura se equilibró. El pH inicial de la leche de quesería se tomó y se agregó 0.01% (p/p) del cultivo de partida.

El pH se monitoreo hasta que se alcanzó un pH de 6.4. Se diluyó 250 µl de cuajo (Novozym 89L) en 9 ml de solución total con agua desionizada; se agregó un ml de esta solución a la leche de quesería y la leche de quesería se agitó vigorosamente por 3 minutos. La barra de agitación se movió y la leche recuajada se dejó asentarse a 35°C.

Después de los tratamientos anteriores, el requesón se cortó fácilmente cuando se insertó una espátula y se observaron los bordes agudos. El queso se cortó empujando el cortador de forma descendente mientras se sostiene rápidamente el vaso volteando el cortador y finalmente sacando el cortador. El requesón se dejó reposar 5 minutos después se agitó suavemente con una cuchara. La temperatura se elevó a 41°C con agitación suave intermitente por ~45 minutos o hasta que el pH bajo a 6.0-5.9. El requesón se filtró usando una gasa después se reemplazó en el vaso y se mantuvo a 41°C en agua mientras se vertió fuera del suero como se necesite.

Cuando el requesón alcanzó pH 5.3, el tazón de acero inoxidable con el requesón se sumergió en un baño de agua a 69°C por 5 minutos, después se estiró con la mano. El requesón se templó en agua helada por 30 minutos. El requesón del queso

se secó con papel absorbente, se pesó y refrigeró durante la noche.

Se hicieron experimentos control de elaboración de queso a partir del mismo lote de leche siguiendo los mismos procedimientos excepto que no se agregó fosfolipasa.

Se calculó el rendimiento de queso actual como el peso de queso después del estiramiento relativo al peso total de la leche de quesería.

Se expresó el rendimiento de queso de humedad ajustada como el rendimiento actual ajustado al nivel constante estándar de humedad. Se calculó el rendimiento de humedad ajustada multiplicando el rendimiento actual y la relación de contenido de humedad actual para la humedad estándar, de conformidad con la siguiente fórmula:

$$Y_{adj} = Y_{act} \times (1 - M_{act}) / (1 - M_{std})$$

en donde Y_{adj} = rendimiento de queso de humedad ajustada, Y_{act} = rendimiento de queso actual, M_{act} = fracción de humedad actual y M_{std} = fracción de humedad estándar (0.48).

El rendimiento de queso de humedad ajustada de todos los experimentos y controles se muestra en la tabla 5.

Tabla 5

Tratamiento	Proteína de la enzima de fosfolipasa mg/grasa g	Rendimiento de queso de humedad ajustada	Incremento del rendimiento comparado al control
FvPLA2 Control	0 0.071	11.70 11.95	2.1%
FvPLA2 Control	0 0.071	11.50 11.83	2.8%
Lecitase®10L control	0 0.18	9.22 9.48	2.7%
Lecitase®10L control	0 0.18	9.62 9.90	2.8%

Ejemplo 8: Elaboración de queso con FvPLA2

La leche se pasteurizó a 72°C por 15 segundos y después se enfrió por debajo de 10°C. La leche se estandarizó a 2.4% de grasa con crema. Después de la estandarización la leche se precalentó en un intercambiador de calor a una temperatura de pre-maduración de 34.5°C. Se vertieron 150 mg de leche en cada tanque de queso y se agregaron 15 g del cultivo (F-DVS ST-M6). La fosfolipasa del ejemplo 5 se agregó en una dosificación de 5 LEU/g de grasa y la leche se incubó por 1 hora a 34.5°C. Se agregó el cuajo (Chy-Max Plus, 200 IMCU) y la agitación se continuó por no más de 4 minutos.

Después de aproximadamente 60 minutos cuando el coágulo se juzgó preparado, se cortó usando un cuchillo de 10

mm. El agitador se regresó al vaso y después de 10 minutos, se hierve incrementando la temperatura a 41°C dentro de 30 minutos. Después de alcanzar 41°C, tomó lugar una agitación adicional por aproximadamente 20 minutos, hasta que una acidez valorable de 0.15-0.16% se alcanzó. El requesón se dejó asentar en el vaso, y el suero se drenó. El requesón se cortó en bloques uniformes y los bloques se voltearon y apilaron en dos. Subsecuentemente, en intervalos de 10 minutos, los bloques se voltearon y mantuvieron en pilas de dos. A un pH de aproximadamente 5.15-5.20, el requesón se molió en una máquina de molienda. Se agregaron dos por ciento de sal a las piezas de requesón (peso/peso). Después de la molienda, todo el requesón, se agregó en el estirador, el cual contiene 70 l de agua precalentada a 74°C. Alrededor de 20 l de agua caliente se transfirieron a la cámara superior y se agregó el queso. Cuando el requesón alcanzó una temperatura de 62°C, el estiramiento se detuvo y el requesón se movió al extrusor. Los quesos se sometieron a extrusión en barras de 8-9 quesos, cada uno de 2.3 kg, y se enfriaron en agua a 5-7°C. Después de 20 minutos de enfriamiento, los quesos se movieron a la salmuera saturada y se agregó salmuera por 1.5 horas a 5-6°C. La salmuera se realizó mezclando 120 kg de agua, agregando sal a 22Be, 750 g de CaCl₂ (solución al 34%) y ajustando a pH 5.1. Después de curar en salmuera cada queso se secó por alrededor de 30 minutos y se pesó antes del envasado a vacío. Las

57
Sp

muestras se tomaron por pH y análisis composicional (humedad, sal, grasa y proteína) después de aproximadamente almacenaje por 1 semana a temperatura fría.

Rendimiento actual (RA) se ajustó a humedad al 48% en el queso:

Rendimiento Adj = $\frac{RA \times (100 - \% \text{ de humedad})}{100 - 48}$

100 - 48

Tabla 6

	Rendimiento ajustado (Kg) control	Rendimiento ajustado (Kg) experimental	Incremento de rendimiento promedio (kg)	Incremento de rendimiento (%)
Día 1	10.62	10.81		
	10.70	10.90	0.195	1.8
Día 2	9.90	10.16		
	9.95	10.14	0.225	2.3
Día 3	10.00	10.15		
	10.01	10.16	0.15	1.5

Ejemplo 9: Sobre-expresión de PLA2 de *Aspergillus oryzae* (AoPLA2) en *Aspergillus oryzae*

Medio

DAP2C-1

- 11 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$
- 1 g de KH_2PO_4
- 2 g de Monohidrato de ácido cítrico
- 30 g de maltodextrina
- 6 g de $K_3PO_4 \cdot 3H_2O$
- 0.5 g de extracto de levadura

56
57

0.5 ml de rastros de solución de metales

1 ml de Pluronic PE 6100 (BASF, Ludwigshafen, Alemania)

Los componentes se mezclaron en un litro de agua destilada y se dividieron en matraces, se agregó 250 mg de CaCO_3 a cada uno en 150 ml por porción.

El medio se esterilizó en una autoclave. Después del enfriamiento, lo siguiente se agregó a 1 litro del medio:

23 ml $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ al 50% p/v, filtro esterilizado

33 ml de ácido láctico al 20%, filtro esterilizado

Restos de solución de metales

6.8 g de ZnCl_2

2.5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

0.24 g de $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

13.9 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

8.45 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

3 g de Monohidrato de ácido clorhídrico

Los componentes se mezclaron en un litro de agua destilada.

La clonación y secuencia parcial de ADNc que codifica una fosfolipasa A2 de *Aspergillus oryzae* se describe en el documento WO 00/56762. La secuencia completa del clon AS3812, se da en la SEC ID NO: 6.

Esta secuencia se usó para designar el cebador AoPLA1 para uso con el cebador vector pYESrev en amplificación de RCP del gen que codifica PLA2 de AS3812 con la adición de

un sitio de restricción para sub-clonar el producto RCP:

AoPLA1: TGAGGATCCATCATGAAGAACATCTTCG

pYESrev: gggcgtgaatgtaagcgtgac

La amplificación de RCP se acompañó usando Extensor de Mezcla Principal de RCP de Alta Fidelidad (ABgene, Surrey, U.K.) siguiendo las instrucciones del fabricante y usando una temperatura de recocido de 52°C para los primeros 5 ciclos y 62°C para los últimos 25 ciclos, y un tiempo de extensión de 1.5 minutos.

El fragmento RCP se restringió con BamHI y XhoI y se clonó en el vector de expresión pMStr57 de *Aspergillus* (descrito en el Ejemplo 1) usando técnicas estándares. El gen que codifica la fosfolipasa del constructo de expresión de *Aspergillus* resultante pMStr71, se secuenció y la secuencia fue completamente contradictoria con aquella determinada previamente para el inserto de AS3812.

La cepa BECh2 de *Aspergillus oryzae* (documento WO 00/39322) se transformó con pMStr71 usando técnicas estándares (T. Christensen et al., 1988). Se cultivaron los transformantes en medio DAP2C-1 agitado a 270 RPM a 37°C por 4 días y la expresión de fosfolipasa se monitoreó por SDS-PAGE.

Ejemplo 10: Purificación y determinación del procesamiento del péptido

La fosfolipasa de *Aspergillus oryzae* de la fermentación del ejemplo 9 se filtró a través de filtro

estéril Seitz-EKS de 20 μ obtenido de Pall Corporation (Pall SeitzSchenk Filter Systems GmbH Pianiger Str. 137 D-55543 Bad Kreuznach, Alemania). La solución filtrada estéril después se ajustó a pH 4.7 usando ácido acético diluido. La fuerza iónica del sobrenadante de la fermentación después se ajustó de manera que la concentración de sal fue baja y la fuerza iónica está bajo 4 mSi. La purificación de la proteína PLA2 deseada se obtuvo por cromatografía de intercambio catiónico usando matriz de Flujo rápido de sefarosa SP obtenida de Amersham-Pharmacia (Suecia). La matriz de intercambio catiónico fue pre-equilibrada y lavada envasada con 50 mM de amortiguador de acetato de sodio, pH 4.7 (Amortiguador A) en columna XK26 obtenida de Amersham Pharmacia. La fermentación del sobrenadante que contiene el PLA2 deseado se ajustó a pH y después se aplicó fuerza iónica en la columna. El material no unido después se lavó con el amortiguador A hasta que todo el material absorbente de UV se lavó, lo cual se monitoreó por detector UV unido al equipo colector de fracción. Las proteínas enlazadas después se eluyeron con un gradiente de sal lineal usando el Amortiguador B, el cual contiene 1M de cloruro de sodio como sal en 50 mM de amortiguador de acetato de sodio, pH 4.7. El volumen total del gradiente lineal que alcanzó una concentración de sal de 1M es de aproximadamente 500 ml (10 volúmenes en columna). Las fracciones de 10 ml cada una se colectaron durante la elución. Todas las fracciones se

sometieron a ensayo para determinar la actividad de fosfolipasa usando Lecitina como sustrato obtenido de Sigma chemicals. Los ácidos grasos liberados de Lecitina en incubación con la fosfolipasa se detectaron usando el kit NEFA C obtenido de Waco chemicals. Las fracciones que contienen actividad de fosfolipasa fueron entonces verificadas por pureza de la proteína usando la técnica SDS-PAGE estándar. Las fracciones se combinadas conteniendo una banda sencilla del PLA2 deseada que muestra el peso molecular de aproximadamente 16 kDa, como se determinó por comparación a estándares de peso molecular de Amersham-Pharmacia.

La identidad de la proteína pura se confirmó determinando la secuencia N-terminal, la cual fue idéntica a la secuencia del aminoácido (aa) 37-47 de la SEC ID NO: 7. De manera adicional, la masa del péptido se determinó por análisis espectral de masa. La PLA2 de *Aspergillus* activo, purificada, dio dos masas, 14114 y 14242 Da. Estas masas moleculares indican procesamiento adicional en el C-término, consistente con el desdoblamiento entre los aminoácidos 121 y 122 en la SEC ID NO:7, como la secuencia peptídica del aminoácido 37 a 121 tiene una masa teórica de 14114.11 Da y un desdoblamiento entre los aminoácidos 122 y 123, que predicen la secuencia peptídica a partir de un aminoácido 37 a 123 con una masa teórica de 14242.29 Da.

Ejemplo 11: Expresión de fosfolipasa incompletamente procesada a partir de *Aspergillus oryzae* y *Fusarium venenatum*

El procesamiento de PLA2 de *Aspergillus oryzae* (AoPLA2) y el PLA de *Fusarium venenatum* (FvPLA2), ambas en el N- y C-término, ocurren en residuos básicos únicos o múltiples (lys o arg), típicos de los sitios de desdoblamiento de maturasas como Kexina, las cuales a menudo son responsables de los procesamientos peptídicos (Jalving, R., et al. (2000) Appl. Environ. Microbiol. 66:363-368). Para determinar el efecto de procesamiento en la actividad de AoPLA2 y FvPLA2, las enzimas fueron expresadas en una cepa deficiente en Kexina de *Aspergillus oryzae*. El procesamiento entonces fue procesado por SDS-PAGE, y la actividad de fosforilasa se midió por los cultivos de cepas que expresan AoPLA2 y FvPLA2 en tanto antecedentes deficientes de Kexina como de tipo nativo.

Una cepa deficiente de Kexina de *Aspergillus oryzae* (*kexB*⁻) se construyó por una interrupción del gen *kexB* de *A. oryzae* (EMBL:AB056727) por métodos establecidos en la técnica, tales como aquellos descritos en los documentos WO 98/12300 y US6013452. El rompimiento de *kexB* se confirmó por el análisis de manchado Southern y monitoreando la expresión de péptidos en donde KexB se conoce por ser el responsable de la maduración. La cepa *kexB*⁻ se transformó con el constructo de expresión AoPLA2 descrito en el Ejemplo 9, y con el constructo de expresión FvPLA2 descrito en el Ejemplo 4. Estas cepas

fueron fermentadas en YP+2%G a 30°C, junto con las cepas de expresión *kexB*⁺ para tanto AoPAL2 como FvPLA2 descritos en los Ejemplos 9 y 4, y cepas no transformadas como controles. Las cepas que expresan AoPLA2 fueron sacudidas a 200RPM por 4 días, mientras las cepas que expresan FvPLA2 fueron sacudidas a 275RPM por 3 días. La expresión de fosfolipasa y procesamientos fueron ensayados por SDS-PAGE.

En análisis SDS-PAGE, se resolvió ApPLA2 como una banda distinta única en tanto cepas *kexB*⁺ como *kexB*⁻. Cuando se expresa en la cepa *kexB*⁺, AoPLA2 corre a aproximadamente 16 kDa, consistente con la migración observada primeramente por la AoPLA2 completamente procesada (Ejemplo 10), mientras en la cepa *kexB*⁻, AoPLA2 corre a aproximadamente 27-28 kDa, consistente con una carencia de procesamiento o procesamiento incompleto. Cuando se expresa en la cepa *kexB*⁺, FvPLA2 se resuelve como dos bandas con pesos moleculares aparentes de 17 kDa y 14 kDa. La banda de 14kDa corresponde al péptido completamente procesado (Ejemplo 5), mientras el péptido de 17kDa es una forma parcialmente procesada.

Cuando se expresa en la cepa *kexB*⁻, FvPLA2 corre como una banda única a aproximadamente 18-19 kDa, un tamaño consistente con el procesamiento incompleto. No se observaron bandas similares en cualquiera de las muestras de control a partir de las cepas no transformadas. Las intensidades de bandas relativas sugieren que la expresión de AoPLA2 en la

cepa *kexB⁻* fue 1/5 a 1/10 el nivel de aquel en la cepa *kexB⁺*, mientras la expresión de FvPLA2 en la cepa *kexB⁻* fue la misma a 1/2 el nivel de aquella en la cepa *kexB⁺*.

La actividad de las fosfolipasas producidas por cada cepa se determinó en el ensayo LEU y se muestra en la tabla 7.

Tabla 7

Genotipo de cepa			Actividad LEU/ml
KexB	FvPLA	AoPLA2	
+	-	-	0
-	-	-	0
+	+	-	38
-	+	-	0
+	-	+	56
-	-	+	0

REIVINDICACIONES

1. Método para producir una fosfolipasa el cual comprende procesar un péptido fúngico expresado, para desdoblar un péptido a partir del extremo C-terminal y/o un péptido a partir del extremo N-terminal para obtener un péptido nuclear con la actividad fosfolipasa, caracterizado porque el péptido nuclear comprende

- a) la secuencia de aminoácido dada por los aminoácidos 146-153 de la SEC ID NO:1, aminoácidos 87-94 de la SEC ID NO:3, o aminoácidos 79-86 de la SEC ID NO:12, o una secuencia idéntica a cualquiera de estas secuencias de aminoácido, excepto para la sustitución de un aminoácido único con otro aminoácido; y
- d) al menos dos residuos de cisteína ubicados en el extremo N-terminal de la secuencia dada en a); y
- e) al menos dos residuos de cisteína ubicados en el extremo C-terminal de la secuencia dada en a).

2. Método de conformidad con la reivindicación 1, caracterizado porque el péptido expresado es expresado en una célula hospedera fúngica filamentosa transformada con el ADN que codifica el péptido expresado.

3. Método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque la célula hospedera es una de

Aspergillus, *Fusarium* o *Trichoderma*, particularmente *A. oryzae*, *A. niger*, *F. venenatum* o *T. reesei*.

4. Método de conformidad con la reivindicación 2, caracterizado porque el péptido expresado es procesado *in vivo* por la célula hospedera.

5. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque el péptido nuclear tiene una longitud de 100-150 aminoácidos.

6. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, caracterizado porque la fosfolipasa tiene una actividad de fosfolipasa específica, la cual es al menos 2 veces la actividad del polipéptido expresado antes del procesamiento.

7. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-6, caracterizado porque el péptido expresado se deriva de *Tuber*, *Verticillium*, *Neurospora*, *Aspergillus*, o *Helicosporium*, particularmente *T. borchii*, *T. albidum*, *V. dahliae*, *V. tenerum*, *N. crassa*, *A. oryzae*, o *Helicosporium* sp. HN1.

8. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, caracterizado porque el péptido expresado es desdoblado dentro de 0-18 aminoácidos en el extremo N-terminal del alineamiento de secuencia con los aminoácidos 97-101 de la SEC ID NO:1, cuando la secuencia peptídica expresada completa es alineada simultáneamente con

las secuencias dadas en las SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:10 y SEC ID NO:12.

9. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-8, caracterizado porque el péptido expresado es desdoblado dentro de los aminoácidos 0-11 en el extremo C-terminal del alineamiento de secuencia con los aminoácidos 204-209 de la SEC ID NO:1, cuando la secuencia peptídica expresada completa es alineada simultáneamente con las secuencias dadas en las SEC ID NO:1, SEC ID NO:3, SEC ID NO:4, SEC ID NO:5, SEC ID NO:7, SEC ID NO:8, SEC ID NO:10 y SEC ID NO:12.

10. Método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, caracterizado porque el péptido expresado es desdoblado dentro de los 10 aminoácidos de un sitio de procesamiento Kex2 o dentro de 11 aminoácidos de una secuencia FG o ambas.

11. Método para hidrolizar un fosfolípido, caracterizado porque comprende poner en contacto el fosfolípido con una fosfolipasa producida por el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

12. Método para producir queso, que comprende poner en contacto leche de quesería o una fracción de leche de quesería con una fosfolipasa, caracterizado porque la fosfolipasa comprende:

- a) la secuencia de aminoácido dada por los aminoácidos 146-153 de la SEC ID NO:1, aminoácidos 87-94 de la SEC ID NO:3, o aminoácidos 79-86 de la SEC ID NO:12, o una secuencia idéntica a cualquiera de estas secuencias de aminoácido, excepto por la sustitución de un aminoácido único con otro aminoácido; y
- b) al menos dos residuos de cisteína ubicados en el extremo N-terminal de la secuencia dada en a); y
- c) al menos dos residuos de cisteína ubicados en el extremo C-terminal de la secuencia dada en a).

13. Método para producir queso, caracterizado porque comprende poner en contacto leche de quesería o una fracción de leche de quesería con una fosfolipasa producida por el método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

14. Fosfolipasa, caracterizada porque es un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácido la cual es al menos 80% idéntica con los aminoácidos 91-210 en la SEC ID NO:10 (*T. albidum*), aminoácidos 92-211 en la SEC ID NO:1 (*T. borchii*), aminoácidos 30-137 en la SEC ID NO:12 (*V. tenerum*), aminoácidos 38-145 en la SEC ID NO:3 (*V. dahliae*), aminoácidos 44-151 en la SEC ID NO:4 (*N. crassa*), amino ácidos 37-157 en la SEC ID NO:7 (*A. oryzae*), o aminoácidos 58-168 en la SEC ID NO:8 (*N. crassa*).

15. Fosfolipasa, caracterizada porque comprende:

- a) un polipéptido codificado por una fosfolipasa que codifica parte de la secuencia de ADN clonada en un plásmido presente en el depósito número DSM 15442 de *Escherichia coli*; o
- b) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácido de los aminoácidos 29 a 149 de la SEC ID NO:19, o una secuencia de aminoácido la cual se puede obtener a partir de esta por sustitución, supresión y/o inserción de uno o más aminoácidos; o
- c) un análogo del polipéptido definido en (a) o (b) el cual:
 - i) tiene al menos 80% de homología con dicho polipéptido, o
 - ii) es inmunológicamente reactivo con un anticuerpo originado contra dicho polipéptido en la forma purificada, o
 - iii) es una variante alélica de dicho polipéptido; o
- d) un polipéptido el cual es codificado por una secuencia de ácido nucleico la cual hibridiza bajo condiciones de baja rigurosidad con una hebra complementaria de la secuencia de ácido nucleico de los ácidos nucleicos 133 a 495 de la SEC ID NO:15 que codifica el polipéptido maduro o una

secuencia del mismo que tiene al menos, 100 nucleótidos.

16. Fosfolipasa de conformidad con la reivindicación 15, caracterizada porque es nativa a una cepa de *Fusarium*, particularmente *F. venenatum*.

17. Secuencia de ácido nucleico caracterizada porque comprende una secuencia de ácido nucleico la cual codifica la fosfolipasa de conformidad con las reivindicaciones 15 o 16.

18. Secuencia de ácido nucleico caracterizada porque comprende:

a) la secuencia de ADN parcial que codifica una fosfolipasa madura clonada en un plásmido presente en DSM 15442 de *Escherichia coli*.

b) la secuencia de ADN parcial que codifica una fosfolipasa madura de ácidos nucleicos 133 a 495 de la SEC ID NO:15,

c) un análogo de la secuencia definida en a) o b), el cual codifica una fosfolipasa y

i) tiene al menos 80% de homología con dicha secuencia de ADN, o

ii) hibridiza a alta rigurosidad con una hebra complementaria de dicha secuencia de ADN o una subsecuencia de la misma que tiene al menos, 100 nucleótidos,

iii) es una variante alélica del mismo, o

e) una hebra complementaria de a), b) o c).

19. Constructo de ácido nucleico caracterizado porque comprende la secuencia de ácido nucleico de conformidad con las reivindicaciones 17 o 18, operablemente ligadas a una o más secuencias de control capaces de dirigir la expresión de la fosfolipasa en un hospedero de expresión adecuado.

20. Vector de expresión recombinante, caracterizado porque comprende el constructo de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 19, un promotor, y señales de detención transcripcionales y traduccionales.

21. Célula hospedera recombinante, caracterizada porque comprende el constructo de ácido nucleico de conformidad con la reivindicación 20.

22. Método para producir una fosfolipasa, caracterizado porque comprende cultivar la célula hospedera de conformidad con la reivindicación 21, bajo condiciones que conducen a la producción de fosfolipasa y la recuperación de la fosfolipasa.

23. Método para preparar una pasta o un producto horneado elaborado a partir de la pasta, caracterizado porque comprende agregar la fosfolipasa de conformidad con la reivindicación 15 a la pasta.

24. Composición de pasta, caracterizada porque comprende la fosfolipasa de conformidad con la reivindicación 15.

25. Composición detergente, caracterizada porque comprende un tensioactivo y la fosfolipasa de conformidad con la reivindicación 15.

26. Proceso para reducir el contenido de fósforo en un aceite vegetal, caracterizado porque comprende poner en contacto el aceite con la fosfolipasa de conformidad con la reivindicación 15 en la presencia de agua, y después separar una fase acuosa del aceite.

27. Proceso para producir queso, caracterizado porque comprende tratar una composición láctea con una fosfolipasa y producir queso a partir de la composición láctea, en donde la fosfolipasa es la fosfolipasa de conformidad con la reivindicación 15.

28. Proceso para producir queso, caracterizado porque comprende tratar una composición láctea con una fosfolipasa y producir queso a partir de la composición láctea, en donde la fosfolipasa se selecciona del grupo que consiste de fosfolipasas PLA2 del grupo XIII fúngico/bacteriano.

73
72

01 Listado SQ ST25 23 de abril-2004
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Novozymes A/S

<120> Expresión de fosfolipasa

<130> 10342.504-wo

<160> 16

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 211

<212> PRT

<213> Tuber borchii

<400> 1

Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Ile Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn
1 5 10 15

Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Asn Lys Arg Gly
20 25 30

Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn
35 40 45

Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Ala
50 55 60

Asp Glu Thr Asn Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala
65 70 75 80

Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Leu Ser Pro Val Ser Asp
85 90 95

Thr Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ala Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala
100 105 110

Lys Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys
115 120 125

Ser Lys Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser Cys
130 135 140

Lys Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln His Arg Phe
145 150 155 160

Thr Glu Ala Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu
165 170 175

Tyr Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Glu Ser Trp Lys Gly Val
180 185 190

Ala Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Ala Val Arg Thr Phe

24
73

01 Listado SQ ST25 23 de abril-2004

195

200

205

Gly Trp Leu
210

<210> 2
<211> 588
<212> DNA
<213> Verticillium dahliae

<220> Características_misc
<221>
<222> (25)..(26)
<223> n is a, c, g, or t

<220>
<221> CDS
<222> (72)..(587)

<400> 2'
cagtttgaaag tcccagcccc tgctnntcct cctgcttctc cccgtccagt ctttgggatt 60
ttcctctcat c atg aag ttc aac gca att ctc ctg gcc ctc gtg cct gcc 110
Met Lys Phe Asn Ala Ile Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala
1 5 10
gcc ctg gct ctg ccc acc acc gac gag gcg cag acc ccc aag ctc gcc 158
Ala Leu Ala Leu Pro Thr Thr Asp Glu Ala Gln Thr Pro Lys Leu Ala
15 20 25
gcg cgc cag agc atc acg gcc gtc acc gac agc ctg tcc ttc tcc ctg 206
Ala Arg Gln Ser Ile Thr Ala Val Thr Asp Ser Leu Ser Phe Ser Leu
30 35 40 45
acg ctg cct cag ttc acc acg cgc cgc aac aac cgc aac ccc gcc aac 254
Thr Leu Pro Gln Phe Thr Thr Arg Arg Asn Asn Arg Asn Pro Ala Asn
50 55 60
ctc gac tgg agc tcc gac ggc tgc aca acg tct cct gac aac cca ttc 302
Leu Asp Trp Ser Ser Asp Gly Cys Thr Thr Ser Pro Asp Asn Pro Phe
65 70 75
gga ttc ccc ttt gtg ccg gcc tgc cac cgc cac gac ttt ggc tac cac 350
Gly Phe Pro Phe Val Pro Ala Cys His Arg His Asp Phe Gly Tyr His
80 85 90
aac ttc cgc gcc cag acc cgc ttc acc gag agc aac aag ctc cgc atc 398
Asn Phe Arg Ala Gln Thr Arg Phe Thr Glu Ser Asn Lys Leu Arg Ile
95 100 105
gac aac cag ttc agg acc gat ctg agg ttc cag tgc cag tct tcc agc 446
Asp Asn Gln Phe Arg Thr Asp Leu Arg Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser
110 115 120 125
gtg cgc ggc gtg tgc aac gcc ctg gcg gac gtc tac tac tct gcc gtc 494
Val Arg Gly Val Cys Asn Ala Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Ser Ala Val
130 135 140
cgg gcg ttc ggc ggt gac gac gcc acc ccc ggc aag agg gac gag cac 542
Arg Ala Phe Gly Gly Asp Asp Ala Thr Pro Gly Lys Arg Asp Glu His
145 150 155
tcg gaa ctc gtc ggc atc tac gac gag aag gtc ggc atc tac gat a 588
Ser Glu Leu Val Gly Ile Tyr Asp Glu Lys Val Gly Ile Tyr Asp
160 165 170

76
74

01 Listado SQ ST25 23 de abril-2004

<210> 3
 <211> 172
 <212> PRT
 <213> Verticillium dahliae

<400> 3

Met Lys Phe Asn Ala Ile Leu Leu Ala Leu Val Pro Ala Ala Leu Ala
 1 5 10 15

Leu Pro Thr Thr Asp Glu Ala Gln Thr Pro Lys Leu Ala Ala Arg Gln
 20 25 30

Ser Ile Thr Ala Val Thr Asp Ser Leu Ser Phe Ser Leu Thr Leu Pro
 35 40 45

Gln Phe Thr Thr Arg Arg Asn Asn Arg Asn Pro Ala Asn Leu Asp Trp
 50 55 60

Ser Ser Asp Gly Cys Thr Thr Ser Pro Asp Asn Pro Phe Gly Phe Pro
 65 70 75 80

Phe Val Pro Ala Cys His Arg His Asp Phe Gly Tyr His Asn Phe Arg
 85 90 95

Ala Gln Thr Arg Phe Thr Glu Ser Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asn Gln
 100 105 110

Phe Arg Thr Asp Leu Arg Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser Val Arg Gly
 115 120 125

Val Cys Asn Ala Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Ser Ala Val Arg Ala Phe
 130 135 140

Gly Gly Asp Asp Ala Thr Pro Gly Lys Arg Asp Glu His Ser Glu Leu
 145 150 155 160

Val Gly Ile Tyr Asp Glu Lys Val Gly Ile Tyr Asp
 165 170

<210> 4
 <211> 185
 <212> PRT
 <213> Neurospora crassa

<400> 4

Met Lys Phe Phe Ser Ala Leu Ala Leu Ser Ser Leu Leu Pro Thr Ala
 1 5 10 15

Ala Trp Ala Trp Thr Gly Ser Glu Ser Asp Ser Thr Gly Ala Asp Ser
 20 25 30

75
75

77
76

01 Listado SQ ST25 23 de abril-2004
85 90 95

Lys Gln Asn Arg Phe Thr Ala Pro Asn Lys Ala Arg Ile Asp Thr Asn
100 105 110

Phe Lys Thr Asp Met Tyr Asn Gln Cys Asn Thr Glu Ser Asn Ile Phe
115 120 125

Thr Arg Ala Ala Cys Lys Ala Val Ala Asp Ile Tyr Tyr Glu Ala Val
130 135 140

Lys Thr Phe Gly Ser Lys Lys Arg Ala Ala Glu Ala Leu Ala Ala Arg
145 150 155 160

Gln Met Glu Glu Asn Val Ala Lys Ala
165

<210> 6
<211> 942
<212> DNA
<213> Aspergillus oryzae

<220>
<221> CDS
<222> (61)..(726)

<400> 6
cgcaagcatc acatctactt cttattgcct attctgtccg agtgctagcc acttatcatc 60

atg aag aac atc ttc gtt gcc act ttg ggc ctg ttc gcc gca gtt tcg 108
Met Lys Asn Ile Phe Val Ala Thr Leu Gly Leu Phe Ala Ala Val Ser
1 5 10 15

tct gcc ttg ccc tac aca acc cct gtc aat gac aat ccc atc tct gct 156
Ser Ala Leu Pro Tyr Thr Thr Pro Val Asn Asp Asn Pro Ile Ser Ala
20 25 30

tta caa gca cgc gcg aca aca tgc tcg gcc aag gcc acg gat aac ctc 204
Leu Gln Ala Arg Ala Thr Thr Cys Ser Ala Lys Ala Thr Asp Asn Leu
35 40 45

atc ttc aag gtc tcc atg aag acc ttc cag aag gcc cgc aag gcc aag 252
Ile Phe Lys Val Ser Met Lys Thr Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ala Lys
50 55 60

aac ccc tcc aag tgc aac tgg tca tcg gac aac tgc tcc aag tca ccc 300
Asn Pro Ser Lys Cys Asn Trp Ser Ser Asp Asn Cys Ser Lys Ser Pro
65 70 75 80

gat aag ccc gat gga tac aac ttc atc ccc agc tgc caa aga cac gat 348
Asp Lys Pro Asp Gly Tyr Asn Phe Ile Pro Ser Cys Gln Arg His Asp
85 90 95

ttc ggc tac cgg aac acg aag aag cag aag cgc ttc aca aag gcc atg 396
Phe Gly Tyr Arg Asn Thr Lys Lys Gln Lys Arg Phe Thr Lys Ala Met
100 105 110

aag aag cgc att gac gac aac ttc aag aag gat ctc tac aag tac tgc 444
Lys Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr Lys Tyr Cys
115 120 125

78
77

01 Listado SQ ST25 23 de abril-2004

agc caa ttc tcg ggc tgg agc tca tgg aag gga gtg gag tgc cgt cgc 492
 Ser Gln Phe Ser Gly Trp Ser Ser Trp Lys Gly Val Glu Cys Arg Arg
 130 135 140

ctt gcg gat gtc tac tat act gct gtc cgc cac ttt ggc aag cgt gat 540
 Leu Ala Asp Val Tyr Thr Ala Val Arg His Phe Gly Lys Arg Asp
 145 150 155 160

gaa gcg ctt gag ttt gac cct gag gtt gag ttc gag aag cgt gat gag 588
 Glu Ala Leu Glu Phe Asp Pro Glu Val Glu Phe Glu Lys Arg Asp Glu
 165 170 175

gtg gcc gat gtc cag cct gac gaa ttt gat aac ttt gac ggt tct gaa 636
 Val Ala Asp Val Gln Pro Asp Glu Phe Asp Asn Phe Asp Gly Ser Glu
 180 185 190

gtt gac cct gat atc gag ggc cag gtc att ccc gaa gtt ctt gaa gat 684
 Val Asp Pro Asp Ile Glu Gly Gln Val Ile Pro Glu Val Leu Glu Asp
 195 200 205

gat gga gtg gat gtg gag aac ctc gac gat att gaa aac ctg 726
 Asp Gly Val Asp Val Glu Asn Leu Asp Asp Ile Glu Asn Leu
 210 215 220

taggttttcg gcattggctc tacactttgc aaatgggtcg tcataatcca ttggaagccg 786

gaggaggagg gaaatcaagg catcttttgg ttgtcagtaa ctttgagtgc ctagtttgtg 846

aattgttttt tgaggttcta tttgaattct gcttttgttc aatcttatag cttcctacgt 906

tgtgttcatt taaaaatgga caggagtatc tgtgag 942

<210> 7
 <211> 222
 <212> PRT
 <213> Aspergillus oryzae

<400> 7

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

Ser Ala Leu Pro Tyr Thr Thr Pro Val Asn Asp Asn Pro Ile Ser Ala
 20 25 30

Leu Gln Ala Arg Ala Thr Thr Cys Ser Ala Lys Ala Thr Asp Asn Leu
 35 40 45

Ile Phe Lys Val Ser Met Lys Thr Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ala Lys
 50 55 60

Asn Pro Ser Lys Cys Asn Trp Ser Ser Asp Asn Cys Ser Lys Ser Pro
 65 70 75 80

Asp Lys Pro Asp Gly Tyr Asn Phe Ile Pro Ser Cys Gln Arg His Asp
 85 90 95

Phe Gly Tyr Arg Asn Thr Lys Lys Gln Lys Arg Phe Thr Lys Ala Met
 100 105 110

79
78

01 Listado SQ ST25 23 de abril-2004
 Lys Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr Lys Tyr Cys
 115 120 125
 Ser Gln Phe Ser Gly Trp Ser Ser Trp Lys Gly Val Glu Cys Arg Arg
 130 135 140
 Leu Ala Asp Val Tyr Tyr Thr Ala Val Arg His Phe Gly Lys Arg Asp
 145 150 155 160
 Glu Ala Leu Glu Phe Asp Pro Glu Val Glu Phe Glu Lys Arg Asp Glu
 165 170 175
 Val Ala Asp Val Gln Pro Asp Glu Phe Asp Asn Phe Asp Gly Ser Glu
 180 185 190
 Val Asp Pro Asp Ile Glu Gly Gln Val Ile Pro Glu Val Leu Glu Asp
 195 200 205
 Asp Gly Val Asp Val Glu Asn Leu Asp Asp Ile Glu Asn Leu
 210 215 220

<210> 8
 <211> 249
 <212> PRT
 <213> Neurospora crassa

<400> 8

Met Lys Pro Phe Phe Leu Ile Ser Leu Leu Val Thr Val Phe Met Ser
 1 5 10 15
 Leu Met Leu Ala Thr Thr Ala Gln Pro Ser Leu Pro Leu Asn Asn Arg
 20 25 30
 Arg Glu Leu Ala Glu His Pro Pro Val Lys Gly Asn Pro Pro Asn Thr
 35 40 45
 Gly Tyr Ala Leu Asp Trp Cys Lys Tyr Thr Ala Gly Met Leu Phe Gln
 50 55 60
 Trp Asp Leu Pro Thr Phe Ile Lys His Arg Glu Ala Asn Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Gly Arg Leu Thr Trp Asp Trp Ser Ser Asp Gly Cys Thr His Val Pro
 85 90 95
 Asp Asn Pro Val Gly Phe Pro Phe Lys Pro Ala Cys Gln Arg His Asp
 100 105 110
 Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Gln Val Gln Phe His Phe Thr Pro Arg Ala
 115 120 125
 Arg Trp Lys Ile Asp Glu Asn Phe Leu Lys Glu Met Lys Phe Gln Cys

80
-79

01 Listado 8Q 8T25 23 de abril-2004

130

135

140

Ile Gly His Asn Ile Phe Asn Ala Cys His Phe Met Ala His Val Tyr
145 150 155 160

His Trp Gly Val Arg Thr Phe Tyr Lys Gly His Glu Gln Tyr Arg Glu
165 170 175

Ser Glu Pro Ser His Lys Met Met Asp Thr Met Val Ala Ser Glu Ser
180 185 190

Ser Asp Val Phe Asp Gly Met Asp Ala Asp Glu Ala Arg Asp Ala Leu
195 200 205

Asn Pro Tyr Leu Ser Glu Glu Lys Thr Lys Glu Tyr Tyr Asp Arg Ala
210 215 220

Leu Ala Arg Tyr Asn Lys Cys Val Glu Glu Ala Met Ala Gln Gly Ile
225 230 235 240

Asp Leu Gln Lys Tyr Trp Ala Ala Phe
245

<210> 9
<211> 832
<212> DNA
<213> Tuber albidum

<220>
<221> CDS
<222> (2)..(426)

<220>
<221> CDS
<222> (476)..(680)

<400> 9
a atg gtc aag att gct gcc att gtc ctc cta atg gga att cta gcc aat 49
Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Val Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn
1 5 10 15
gct gcc gcc atc cct gtc agc gag cca gca gcc ctg gcg aag cgt gga 97
Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Arg Gly
20 25 30
aac gct gag gtc att gct gaa caa act ggt gat gtc ccg gat ttc aac 145
Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn
35 40 45
act caa att aca gag cca act ggg gag gga gac cgt ggg gat gtg gtc 193
Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Val
50 55 60
gac gaa acc gat ttg tcc acg gat att gtc cca gag acc gag gct gct 241
Asp Glu Thr Asp Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala
65 70 75 80
tcc ttc gcc gct agt tca gta tct gca gcc tca cca gca tct gac acc 289
Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ser Asp Thr

81
80

85 01 Listado SQ 8T25 23 de abril-2004 95

gac agg ctt ctc tac tca acc tcc atg ccc gcc ttc ttg act gct aag 337
Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ser Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala Lys
100 105 110

cgc aat aag aac ccc ggc aac ttg gac tgg agc gat gat gga tgc agc 385
Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys Ser
115 120 125

aac tcc ccg gac agg cct gca ggg ttt aac ttc ctt gac tc 426
Asn Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser
130 135 140

gtaagtccctc cttcatttat gctatctaca ttactaata ttcgaacag c tgc aag 482
Cys Lys

cgt cac gac ttc ggg tac cgc aac tac aag aag cag cgc cgc ttc aca 530
Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln Arg Arg Phe Thr
145 150 155 160

gag cct aat cgc aag cgc att gat gac aat ttc aag aag gac cta tat 578
Glu Pro Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr
165 170 175

aat gag tgc gcc aag tac tct ggc ctc caa tcc tgg aaa ggt gtt gcc 626
Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Gln Ser Trp Lys Gly Val Ala
180 185 190

tgc cgc aaa atc gcg aac act tac tac gat gct gta cgc tcc ttc ggt 674
Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Ala Val Arg Ser Phe Gly
195 200 205

tgg ttg taaatgtgcg gaagagatat caagtgggat cgaggaagag gatgggtgaaa 730
Trp Leu
210

gagctgagag gtggatttct ttacattccg caatggctac tacagaagaa ctgtgctcct 790

caaatttaat ctcatttttg tgtctatcta tccactctag aa 832

<210> 10
<211> 210
<212> PRT
<213> Tuber albidum

<400> 10

Met Val Lys Ile Ala Ala Ile Val Leu Leu Met Gly Ile Leu Ala Asn
1 5 10 15

Ala Ala Ala Ile Pro Val Ser Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Arg Gly
20 25 30

Asn Ala Glu Val Ile Ala Glu Gln Thr Gly Asp Val Pro Asp Phe Asn
35 40 45

Thr Gln Ile Thr Glu Pro Thr Gly Glu Gly Asp Arg Gly Asp Val Val
50 55 60

Asp Glu Thr Asp Leu Ser Thr Asp Ile Val Pro Glu Thr Glu Ala Ala
65 70 75 80

82
81

01 Listado 8Q 8T25 23 de abril-2004

Ser Phe Ala Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Ser Pro Ala Ser Asp Thr
85 90 95

Asp Arg Leu Leu Tyr Ser Thr Ser Met Pro Ala Phe Leu Thr Ala Lys
100 105 110

Arg Asn Lys Asn Pro Gly Asn Leu Asp Trp Ser Asp Asp Gly Cys Ser
115 120 125

Asn Ser Pro Asp Arg Pro Ala Gly Phe Asn Phe Leu Asp Ser Cys Lys
130 135 140

Arg His Asp Phe Gly Tyr Arg Asn Tyr Lys Lys Gln Arg Arg Phe Thr
145 150 155 160

Glu Pro Asn Arg Lys Arg Ile Asp Asp Asn Phe Lys Lys Asp Leu Tyr
165 170 175

Asn Glu Cys Ala Lys Tyr Ser Gly Leu Gln Ser Trp Lys Gly Val Ala
180 185 190

Cys Arg Lys Ile Ala Asn Thr Tyr Tyr Asp Ala Val Arg Ser Phe Gly
195 200 205

Trp Leu
210

<210> 11
<211> 961
<212> DNA
<213> Verticillium tenerum

<220>
<221> cds
<222> (5)..(628)

<400> 11
caac atg aag acc acc gct gtt ctc tcc ctc gcc atg ctc cag gcc acc 49
Met Lys Thr Thr Ala Val Leu Ser Leu Ala Met Leu Gln Ala Thr
1 5 10 15

tgg gcc tcg ccc gtg gcc aag cgc cag aac gac gtc tcc ctc gtc gac 97
Trp Ala Ser Pro Val Ala Lys Arg Gln Asn Asp Val Ser Leu Val Asp
20 25 30

aac tac atg ttc ggc atc tcg ctg ccc acc ttc tcc aac cac cac tcc 145
Asn Tyr Met Phe Gly Ile Ser Leu Pro Thr Phe Ser Asn His His Ser
35 40 45

aac agg aac ccc cct cgc ctg gac tgg acc acc gac ggc tgc acc tcg 193
Asn Arg Asn Pro Pro Arg Leu Asp Trp Thr Thr Asp Gly Cys Thr Ser
50 55 60

tcg ccc aac aac ccg ctc ggc ttc ccc ttc ctg ccc gcc tgc cac cgc 241
Ser Pro Asn Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Leu Pro Ala Cys His Arg
65 70 75

82
82

01 Listado SQ ST25 23 de abril-2004

cac gac ttt ggc tac cag aac ttc cgc atc cag agc cgc ttc acc cag His Asp Phe Gly Tyr Gln Asn Phe Arg Ile Gln Ser Arg Phe Thr Gln 80 85 90 95	289
agc aac aag ctc cgc atc gac gac aag ttc aag gag gac ctc tac cac Ser Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asp Lys Phe Lys Glu Asp Leu Tyr His 100 105 110	337
cag tgc gac ggc cac tgg gcc tgg gtt gcc tgc gct gcc ctc gcc gag Gln Cys Asp Gly His Trp Ala Trp Val Ala Cys Ala Ala Leu Ala Glu 115 120 125	385
gtc tac tac gcc gcc gtc cgc gcc ttc gcc ggt ggt gac gcc acc ccg Val Tyr Tyr Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Gly Asp Ala Thr Pro 130 135 140	433
gga cgc atg cac gtc gcc gtc ttc gcc cag acc cag gcc gag cac gac Gly Arg Met His Val Ala Val Phe Gly Gln Thr Gln Ala Glu His Asp 145 150 155	481
gcc ctc gtc tcc atc tac gag gag aag ctc gcg gcc tac gag gct gcc Ala Leu Val Ser Ile Tyr Glu Glu Lys Leu Ala Ala Tyr Glu Ala Ala 160 165 170 175	529
gtc gcc gag gcc gag gcc cgc gcc gag atc ccc cac gtc gag gag acc Val Ala Glu Ala Glu Ala Arg Gly Glu Ile Pro His Val Glu Glu Thr 180 185 190	577
ctc ccc gag gag cct gcc gcc gag gag ccc gcc gcc gag gag gag cag Leu Pro Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Glu Gln 195 200 205	625
aag taaacacgag ccccttttag gaccgactag ctcggtgtcg ctgggctagg Lys	678
ctgagctgag tgacgggggag gcacgaaaga gagcaatgca tcagacaggc tggaacatgc	738
ctttgtctga gtgatggatg gacttgatgg acttgatgga cttggatgca tttatgatac	798
cgccagtgtt gactggcaga gcgagcgact tgattttgga tttcttgaaa ggacggatgt	858
cccgaggtgg ataagggatg cttatcacc aacttcttca tgtatatatt gtactgcgca	918
gagaagcgcg ccccgaaaaa tggattgatt cttgatgaga cgt	961

<210> 12
<211> 208
<212> PRT
<213> Verticillium tenerum
<400> 12

Met Lys Thr Thr Ala Val Leu Ser Leu Ala Met Leu Gln Ala Thr Trp
1 5 10 15
Ala Ser Pro Val Ala Lys Arg Gln Asn Asp Val Ser Leu Val Asp Asn
20 25 30
Tyr Met Phe Gly Ile Ser Leu Pro Thr Phe Ser Asn His His Ser Asn
35 40 45
Arg Asn Pro Pro Arg Leu Asp Trp Thr Thr Asp Gly Cys Thr Ser Ser

84
83

50

01 Listado SQ ST25 23 de abril-2004
55 60Pro Asn Asn Pro Leu Gly Phe Pro Phe Leu Pro Ala Cys His Arg His
65 70 75 80Asp Phe Gly Tyr Gln Asn Phe Arg Ile Gln Ser Arg Phe Thr Gln Ser
85 90 95Asn Lys Leu Arg Ile Asp Asp Lys Phe Lys Glu Asp Leu Tyr His Gln
100 105 110Cys Asp Gly His Trp Ala Trp Val Ala Cys Ala Ala Leu Ala Glu Val
115 120 125Tyr Tyr Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Gly Asp Ala Thr Pro Gly
130 135 140Arg Met His Val Ala Val Phe Gly Gln Thr Gln Ala Glu His Asp Ala
145 150 155 160Leu Val Ser Ile Tyr Glu Glu Lys Leu Ala Ala Tyr Glu Ala Ala Val
165 170 175Ala Glu Ala Glu Ala Arg Gly Glu Ile Pro His Val Glu Glu Thr Leu
180 185 190Pro Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Pro Ala Ala Glu Glu Glu Gln Lys
195 200 205<210> 13
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial<220>
<223> TbPLA1 primer<220>
<221> misc_feature
<222> (4)..(9)
<223> BamHI site<400> 13
caaggatcca aaatggtcaa gattgctgc

29

<210> 14
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial<220>
<223> TbPLA2 primer<220>
<221> misc_feature

25
24

01 Listado SQ ST25 23 de abril-2004

<222> (4)..(9)

<223> XhoI site

<400> 14

tgcctcgagt tttttctaga gtggatagat agac

34

<210> 15

<211> 690

<212> DNA

<213> Fusarium venenatum

<220>

<221> cns

<222> (49)..(597)

<400> 15

cagttttggt tcttttccttc cttatccatc actttctagta tcttcaag atg aag ttc
Met Lys Phe
1

57

agc gct acc att ctt tca ctc ctc ccg gca gtt ctc gcc ctg ccc aca 105
Ser Ala Thr Ile Leu Ser Leu Leu Pro Ala Val Leu Ala Leu Pro Thr
5 10 15ggc gaa gat gca tct gtc tca aag cgc cag agc gtg aac aca gtg aca 153
Gly Glu Asp Ala Ser Val Ser Lys Arg Gln Ser Val Asn Thr Val Thr
20 25 30 35gat cag ctc ctc ttc agc gtc aca ctc cca caa ttc act gct cgt cgt 201
Asp Gln Leu Leu Phe Ser Val Thr Leu Pro Gln Phe Thr Ala Arg Arg
40 45 50aac gcc cgt gat cct ccc act gtc gac tgg acc tct gac ggt tgc act 249
Asn Ala Arg Asp Pro Pro Thr Val Asp Trp Thr Ser Asp Gly Cys Thr
55 60 65tcc tcg ccc gac aac cct ttc ggc ttc cct ttt atc cct gcc tgc aac 297
Ser Ser Pro Asp Asn Pro Phe Gly Phe Pro Phe Ile Pro Ala Cys Asn
70 75 80cgt cac gac ttt ggc tac cac aac tac cgc gcc cag agc cgc ttc acc 345
Arg His Asp Phe Gly Tyr His Asn Tyr Arg Ala Gln Ser Arg Phe Thr
85 90 95gtg agc gcc aag tcc cgc atc gac aac aac ttc aag acc gat ttg tac 393
Val Ser Ala Lys Ser Arg Ile Asp Asn Asn Phe Lys Thr Asp Leu Tyr
100 105 110 115ttc caa tgc caa tcc tcc agt gtt tct ggt gtc tgc aga gca ctt gcc 441
Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser Val Ser Gly Val Cys Arg Ala Leu Ala
120 125 130gac gtc tac ttc gcc gcg gtt aga gct ttt ggc ggg gat gat gct act 489
Asp Val Tyr Phe Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Asp Asp Ala Thr
135 140 145cct ggc aag aga gat gag gcc ctt gta aag gag tac gaa aag aag gta 537
Pro Gly Lys Arg Asp Glu Ala Leu Val Lys Glu Tyr Glu Lys Lys Val
150 155 160gaa gtc tac aac aag ctt gtt gaa gag gct cag aag aag ggt gat ctc 585
Glu Val Tyr Asn Lys Leu Val Glu Glu Ala Gln Lys Lys Gly Asp Leu
165 170 175cct cgc ctt gac tagagtgggt caaaaagcat tctttgggtt cattgtacat 637
Pro Arg Leu Asp

96
85

01 Listado SQ ST25 23 de abril-2004

180

aaatccttac gatacatgag ttatgataaa tcttaaatgg cgggtgacga gct

690

<210> 16
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> *Fusarium venenatum*

<400> 16

Met Lys Phe Ser Ala Thr Ile Leu Ser Leu Leu Pro Ala Val Leu Ala
1 5 10 15Leu Pro Thr Gly Glu Asp Ala Ser Val Ser Lys Arg Gln Ser Val Asn
20 25 30Thr Val Thr Asp Gln Leu Leu Phe Ser Val Thr Leu Pro Gln Phe Thr
35 40 45Ala Arg Arg Asn Ala Arg Asp Pro Pro Thr Val Asp Trp Thr Ser Asp
50 55 60Gly Cys Thr Ser Ser Pro Asp Asn Pro Phe Gly Phe Pro Phe Ile Pro
65 70 75 80Ala Cys Asn Arg His Asp Phe Gly Tyr His Asn Tyr Arg Ala Gln Ser
85 90 95Arg Phe Thr Val Ser Ala Lys Ser Arg Ile Asp Asn Asn Phe Lys Thr
100 105 110Asp Leu Tyr Phe Gln Cys Gln Ser Ser Ser Val Ser Gly Val Cys Arg
115 120 125Ala Leu Ala Asp Val Tyr Phe Ala Ala Val Arg Ala Phe Gly Gly Asp
130 135 140Asp Ala Thr Pro Gly Lys Arg Asp Glu Ala Leu Val Lys Glu Tyr Glu
145 150 155 160Lys Lys Val Glu Val Tyr Asn Lys Leu Val Glu Glu Ala Gln Lys Lys
165 170 175Gly Asp Leu Pro Arg Leu Asp
180

287
86

10342.504-WO

1/5

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

8	For receiving Office use only	
8-1	International Application No.	
8-2	International Filing Date	
8-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
8-4	Form - PCT/RQM01 PCT Request	
8-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.162)
8-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
8-6	Receiving Office (specified by the applicant)	Danish Patent and Trademark Office (RO/DK)
8-7	Applicant's or agent's file reference	10342.504-WO
I	Title of invention	PHOSPHOLIPASE AND METHOD OF PRODUCING IT
II	Applicant	
II-1	This person is:	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States
II-4	Name:	NOVOZYMES A/S
II-5	Address:	Krogshøjvej 36 2880 Bagavaerd Denmark
II-6	State of nationality	DK
II-7	State of residence	DK
II-8	Telephone No.	+45 8824 9999
II-9	Facsimile No.	+45 4442 6080
II-1	Applicant and/or inventor	
II-1-1	This person is:	applicant only
II-1-2	Applicant for	all designated States
II-1-4	Name:	CHR. HANSEN A/S
II-1-5	Address:	Boege Alle 10-12 2970 Hoersholm Denmark
II-1-6	State of nationality	DK
II-1-7	State of residence	DK

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

II-2	Applicant and/or inventor	
II-2-1	This person is:	inventor only
II-2-4	Name (LAST, First)	STRINGER, Mary, Ann,
II-2-5	Address:	Soeborg Hovedgade 39 C, 3.tv. 2860 Soeborg Denmark
II-3	Applicant and/or inventor	
II-3-1	This person is:	inventor only
II-3-4	Name (LAST, First)	FATUM, Tine, Muxoll,
II-3-5	Address:	Soevangen 50 3450 Allerød Denmark
II-4	Applicant and/or inventor	
II-4-1	This person is:	inventor only
II-4-4	Name (LAST, First)	FATKAR, Shankant, Anant,
II-4-5	Address:	Christoffers Allé 91 2800 Lyngby Denmark
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	common representative
IV-1-1	Name:	NOVOZYMES A/S
IV-1-2	Address:	Patents Krogshøjvej 36 2880 Bagsvaerd Denmark
IV-1-3	Telephone No.	+45 8824 9999
IV-1-4	Facsimile No.	+45 4442 6080
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	
VI-1	Priority claim of earlier national application	
VI-1-1	Filing date	28 April 2003 (28.04.2003)
VI-1-2	Number	PA 2003 00634
VI-1-3	Country	DK

886
87

49
88

10342.504-WO

3/5

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VI-2	Priority claim of earlier national application		
VI-2-1	Filing date	14 August 2003 (14.08.2003)	
VI-2-2	Number	PA 2003 01163	
VI-2-3	Country	DK	
VI-3	Priority document request The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-2	
VI-1	International Searching Authority Chosen	European Patent Office (EPO) (ISA/EP)	
VI-3	Request to use results of earlier search; reference to that search		
VI-3-1	Date	27 October 2003 (27.10.2003)	
VI-3-2	Number	RS 109747 DK	
VI-3-3	Country (or regional Office)	EP	
VII-3	Request to use results of earlier search; reference to that search		
VII-3-1	Date	13 February 2004 (13.02.2004)	
VII-3-2	Number	RS 110133 DK	
VII-3-3	Country (or regional Office)	EP	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

10342.504-WO

4/5

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	5	✓
IX-2	Description (excluding sequence listing part)	29	-
IX-3	Claims	4	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	0	-
IX-7a	Sub-total number of sheets	39	
IX-8a	Sequence listing part of description	14	-
IX-7	TOTAL	53	
	Accompanying items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-6	Fee calculation sheet	✓	-
IX-13	Priority document(s)	Item(s) VI-1	-
IX-15	Separate indications concerning deposited microorganism or other biological material	✓	-
IX-16(A)	Sequence listing in computer readable form:		
IX-16(A) - (i)	additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter	-	1 Diskette
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-18	other:	Statement of Sequence listing	
IX-18	other:	Copy of Search Report RS 109747	
IX-18	other:	Copy of Search Report RS 110133	
IX-18	other:	Letter re. withdrawal of US designation	
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract		
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative		
X-1-1	Name:	Gertrud Sonne Kofod	
X-1-2	Name of signatory	GERVOZYMES A/S	
X-1-3	Capacity	Gertrud Sonne Kofod Patent Counsel	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

X-1	Signature of applicant, agent or common representative	
X-2-1	Name:	CHR. HANSEN A/S
X-2-2	Name of signatory	Carsten Midskov
X-2-3	Capacity	Patent Counsel

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/EP
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

22
91

10342.504-WO

1/1

PCT (ANNEX - FEE CALCULATION SHEET)

Original (for SUBMISSION)

(This sheet is not part of and does not count as a sheet of the international application)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	Date stamp of the receiving Office	
0-4	Form PCT/RO/101 (Annex)	
0-4-1	PCT Fee Calculation Sheet Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.162)
0-8	Applicant's or agent's file reference	10342.504-WO
2	Applicant	NOVOZYMES A/S
12	Calculation of prescribed fees	fee amount/multiplier
12-1	Transmittal fee	⇒ 1500
12-2-1	Search fee	⇒ 11520
12-2-2	International search to be carried out by	EP
12-3	International filing fee (first 30 sheets)	6700
12-4	Remaining sheets	23
12-5	Additional amount	70
12-6	Total additional amount	1610
12-7	11 + 12 =	8310
12-12	EASY Filing reduction	-480
12-13	Total international filing fee (1-12)	⇒ 7830
12-14	Fee for priority document	
	Number of priority documents requested	1
12-15	Fee per document	0
12-16	Total priority document fee:	⇒
12-17	TOTAL FEES PAYABLE (T+S+1+P)	⇒ 20850
12-19	Mode of payment	authorization to charge deposit account
12-20	Deposit account instructions	
	The receiving Office	Danish Patent and Trademark Office (RO/DK)
12-20-1	Authorization to charge the total fees indicated above.	✓
12-20-2	Authorization to charge any deficiency or credit any overpayment in the total fees indicated above.	✓
12-21	Deposit account No.	PVB1
12-22	Date	23 April 2004 (23.04.2004)
12-23	Name and signature	NOVOZYMES A/S <i>Gitte & Søren Rysør</i>

93
92

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
11 November 2004 (11.11.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/097012 A2

(51) International Patent Classification: C12N 9/20, A23C 19/032

(21) International Application Number: PCT/DK2004/000279

(22) International Filing Date: 23 April 2004 (23.04.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
PA 2003 00634 28 April 2003 (28.04.2003) DK
PA 2003 01163 14 August 2003 (14.08.2003) DK

(71) Applicants: NOVOZYMES A/S (DK/DK); Krogshøjvej 36, DK-2880 Bagsvaerd (DK). CHR. HANSEN A/S (DK/DK); Boege Alle 10-12, DK-3970 Hoersholm (DK).

(72) Inventors: STRINGER, Mary, Ann.; Soeborg Hovedgade 39 C, 3.tv., DK-2860 Soeborg (DK). FATUM, Tina, Muzell; Soevangen 50, DK-3450 Allerød (DK). PATKAR, Shamkant, Anant; Christoffers Allé 91, DK-2800 Lyngby (DK).

(74) Common Representative: NOVOZYMES A/S; Patents, Krogshøjvej 36, DK-2880 Bagsvaerd (DK).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AI, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CZ, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, GU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, IJ, MC, NL, PL, PT, RO, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2004/097012 A2

(54) Title: PHOSPHOLIPASE AND METHOD OF PRODUCING IT

(57) Abstract: The present invention is related to a method for producing a phospholipase by processing an expressed fungal peptide and to certain specified phospholipases. Furthermore the invention provides a method for producing cheese with a phospholipase.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 10342.504 - NO	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/DK2004/000279	International filing date (day/month/year) 23/04/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 28/04/2003
Applicant NOVOZYMES A/S		

This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This International Search Report consists of a total of 11 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. *Basis of the report*

- a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.

☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)).

- b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box II).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box III).

4. With regard to the title,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

☒ the text is approved as submitted by the applicant.

☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regards to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____

☐ as suggested by the applicant.

☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DK2004/000279

95
94

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
 - a. type of material
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☒ contained in the international application as filed
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DK2004/000279

95

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☒ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-14 (partially), 15-27 (entirely)
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 91-210 of SEQ ID NO: 10, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 2: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 92-211 of SEQ ID NO: 1, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 3: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 30-137 of SEQ ID NO: 12, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 4: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 38-145 of SEQ ID NO: 3, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 5: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 44-151 of SEQ ID NO: 4, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 6: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 37-157 of SEQ ID NO: 7, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 7: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 58-168 of SEQ ID NO: 8, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 8: Claims 1-13 (partially), 15-27 (entirely)

98
97

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTASA/ 210

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 29-149 of SEQ ID NO: 16, nucleic acid coding therefor, products containing said nucleic acid, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 9: Claims 1-13 (partially)

Method of producing a phospholipase (except the phospholipases of inventions 1-8) which comprises processing an expressed fungal peptide so as to cleave off a peptide to obtain a core peptide comprising the amino acid sequence RHDFGY'R/Q/H!N or a sequence differing from said amino acid sequence by a single amino acid substitution, and having additionally at least two cysteines both on the N-terminus and C-terminus of said amino acid sequence, and uses of said phospholipase.

Invention 10: Claim 28

Process for producing cheese using any fungal/bacterial group XIII PLA2 phospholipase (except the phospholipases of inventions 1-9).

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N9/20 A23C19/032

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, CHEM ABS Data, EMBL, MEDLINE, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SORAGNI ELISABETTA ET AL: "A nutrient-regulated, dual localization phospholipase A2 in the symbiotic fungus <i>Tuber borchii</i> " EMBO (EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY ORGANIZATION) JOURNAL, vol. 20, no. 18, 17 September 2001 (2001-09-17), pages 5079-5090, XP002269320 ISSN: 0261-4189	1,5-7, 9-11, 15-22
Y	*the whole document*figures 2,4B -/-	2-4, 12-14, 23-27

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reasons (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "B" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 October 2004

Date of mailing of the international search report

29.10.04

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5518 Patentstr. 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Heder, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/DK2004/000279100
99

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Class of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	—& DATABASE EMBL 'Online! 1 October 2000 (2000-10-01), XP002269322 retrieved from EMBL Database accession no. Q9P4F6 abstract	
Y	WAKATSUKI S ET AL: "Molecular cloning, functional expression and characterization of p15, a novel fungal protein with potent neurite-inducing activity in PC12 cells." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA. NETHERLANDS 3 DEC 2001, vol. 1522, no. 2, 3 December 2001 (2001-12-03), pages 74-81, XP002269440 ISSN: 0006-3002 the whole document —& DATABASE EMBL 'Online! 30 October 2001 (2001-10-30), XP002269442 retrieved from EMBL Database accession no. AB071215 abstract —& DATABASE EMBL 'Online! 1 December 2001 (2001-12-01), XP002269453 retrieved from EMBL Database accession no. Q96TU1 abstract	1-14
Y	CHRISTENSEN T ET AL: "HIGH LEVEL EXPRESSION OF RECOMBINANT GENES IN ASPERGILLUS ORYZAE" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 6, no. 12, 1 December 1988 (1988-12-01), pages 1419-1422, XP000003462 ISSN: 0733-222X the whole document	1-14
Y	DATABASE REGISTRY Registry No. 502827-51-2 13 Apr11 2003 (2003-04-13), XP002269443 abstract & LI, WEI-LIN: "Cloning and sequencing of phospholipase A2 gene from Streptomyces violaceoruber 2917" WUHAN DAXUE XUEBAO, LIXUEBAN, vol. 48, no. 4, 2002, pages 500-506,	1-6, 11-14
Y	US 6 399 121 B1 (NIELSEN PER MUNK) 4 June 2002 (2002-06-04) the whole document	12,13
	—/—	

6

Form PCT/ISAR/10 (continuation of second sheet) (January 2004)

page 2 of 4

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
T	NAKASHIMA SATORU ET AL: "Secretory phospholipases A2 induce neurite outgrowth in PC12 cells." BIOCHEMICAL JOURNAL, vol. 376, no. 3, 15 December 2003 (2003-12-15), pages 655-666, XP002269441 ISSN: 0264-6021	
T	DATABASE EMBL 'Online! 13 November 2003 (2003-11-13), XP002269444 retrieved from EMBL Database accession no. AB126039 abstract	
X	NEUMANN M J ET AL: "VD0100C34 VD01 Verticillium dahliae cDNA, mRNA sequence" EMBL, 2 April 2003 (2003-04-02), XP002259297 cited in the application * EMBL accession no. BQ109870 *	15,17-21
X	SCHULTE U ET AL: "Neurospora crassa DNA linkage group V cosmid contig 18A7" EMBL, 23 January 2002 (2002-01-23), XP002259298	15-22
Y	database accession no. AL670542; Q8X0U7	23-27
X	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1995, no. 02, & JP 06 327468 A (ASAHI CHEM IND CO LTD), 29 November 1994 (1994-11-29)	15-22
Y	abstract -& JP 06 327468 A (ASAHI CHEM IND CO LTD) 29 November 1994 (1994-11-29) abstract	23-27
Y	WO 99/53769 A (NOVONORDISK AS) 28 October 1999 (1999-10-28) cited in the application page 2, line 29 - page 3, line 26; claims 1-18; example 1	23,24
Y	WO 99/03962 A (BAECK ANDRE CESAR ; RAI SAROJ (US); BARNABAS MARY VIJAYARANI (US); PRO) 28 January 1999 (1999-01-28) cited in the application page 4 - page 5; claims 1-12	25
Y	WO 98/26057 A (NOVONORDISK AS) 18 June 1998 (1998-06-18) cited in the application claims 1-70	26
	-/-	

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/54601 A (NOVONORDISK AS) 21 September 2000 (2000-09-21) cited in the application page 12, line 4 - page 13, line 29; claims 1-38	27
A	WO 02/00852 A (SPENDLER TINA ; VIND JESPER (DK); NOVOZYMES AS (DK); SASAKI YUKIKO (JP) 3 January 2002 (2002-01-03)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/DK2004/000279

102 103

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6399121	B1	04-06-2002	US 2002136799 A1	26-09-2002
			US 2003215544 A1	20-11-2003
			AU 766617 B2	23-10-2003
			AU 3272800 A	04-10-2000
			BR 0009001 A	02-01-2002
			CN 1343094 T	03-04-2002
			WO 0054601 A1	21-09-2000
			EP 1162889 A1	19-12-2001
			JP 2002538796 T	19-11-2002
			NZ 513959 A	29-08-2003
JP 06327468	A	29-11-1994	NONE	
WO 9953769	A	28-10-1999	AT 228307 T	15-12-2002
			AU 754470 B2	14-11-2002
			AU 3025399 A	08-11-1999
			CA 2326412 A1	28-10-1999
			DE 69904161 D1	09-01-2003
			DE 69904161 T2	17-07-2003
			WO 9953769 A1	28-10-1999
			DK 1073339 T3	27-01-2003
			EP 1073339 A1	07-02-2001
			ES 2188143 T3	16-06-2003
			US 6365204 B1	02-04-2002
			US 2001055635 A1	27-12-2001
WO 9903962	A	28-01-1999	WO 9903962 A1	28-01-1999
			AU 3884597 A	10-02-1999
			BR 9714808 A	11-12-2001
			CA 2297482 A1	28-01-1999
			EP 1005520 A1	07-06-2000
			JP 2001510233 T	31-07-2001
WO 9826057	A	18-06-1998	AT 226974 T	15-11-2002
			AU 5187898 A	03-07-1998
			CN 1245532 A	23-02-2000
			DE 69716711 D1	05-12-2002
			DE 69716711 T2	18-09-2003
			WO 9826057 A1	18-06-1998
			DK 869167 T3	27-01-2003
			EP 0869167 A2	07-10-1998
			ES 2183113 T3	16-03-2003
			JP 2000507458 T	20-06-2000
			US 6143545 A	07-11-2000
			US 6103505 A	15-08-2000
WO 0054601	A	21-09-2000	AU 766617 B2	23-10-2003
			AU 3272800 A	04-10-2000
			BR 0009001 A	02-01-2002
			CN 1343094 T	03-04-2002
			WO 0054601 A1	21-09-2000
			EP 1162889 A1	19-12-2001
			JP 2002538796 T	19-11-2002
			NZ 513959 A	29-08-2003
			US 2002136799 A1	26-09-2002
			US 2003215544 A1	20-11-2003
			US 6399121 B1	04-06-2002

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/DK2004/000279

104

103

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0200852 A	03-01-2002	US 6432898 B1	13-08-2002
		US 6558715 B1	06-05-2003
		AU 6733301 A	08-01-2002
		WO 0200852 A2	03-01-2002
		EP 1383881 A2	28-01-2004
		US 2002168746 A1	14-11-2002
		US 2002142434 A1	03-10-2002
		US 2002110854 A1	15-08-2002
		US 2003003561 A1	02-01-2003
		US 2003040450 A1	27-02-2003
		US 2003180418 A1	25-09-2003

PATENT COOPERATION TREATY

105
104

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:		WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)	
see form PCT/ISA/220			
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220		Date of mailing (day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)	
International application No. PCT/DK2004/000279		International filing date (day/month/year) 23.04.2004	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC C12N9/20, A23C19/032		Priority date (day/month/year) 28.04.2003	
Applicant NOVOZYMES AS			

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 68.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:  European Patent Office D-80299 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tx: 523658 epmu d Fax: +49 89 2369 - 4465	Authorized Officer Heder, A Telephone No. +49 89 2369-7102
---	--



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/DK2004/000279

106
105

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
 - ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☒ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☒ in written format
 - ☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☒ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in computer readable form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

109
106

Box No. II Priority

1. ☒ The following document has not been furnished:

- ☒ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(a)).
- ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43bis.1 and 66.7(b)).

Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA206) to pay additional fees, the applicant has:

- ☒ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ not paid additional fees.

2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.

3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is

- ☐ complied with
- ☒ not complied with for the following reasons:

see separate sheet

4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:

- ☐ all parts.
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1, and 8: Claims 1-14 (partially), 15-27 (entirely)

LOS
07

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	1-27
	No: Claims	
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-27
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-27
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item IV.

The separate inventions/groups of inventions are:

Invention 1: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 91-210 of SEQ ID NO: 10, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 2: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 92-211 of SEQ ID NO: 1, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 3: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 30-137 of SEQ ID NO: 12, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 4: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 38-145 of SEQ ID NO: 3, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 5: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 44-151 of SEQ ID NO: 4, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 6: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 37-157 of SEQ ID NO: 7, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 7: Claims 1-14 (partially)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 58-168 of SEQ ID NO: 8, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 8: Claims 1-13 (partially), 15-27 (entirely)

Phospholipase having an amino acid sequence which is at least 80% identical with amino acids 29-149 of SEQ ID NO: 16, nucleic acid coding therefor, products containing said nucleic acid, method for the production thereof, uses thereof.

Invention 9: Claims 1-13 (partially)

Method of producing a phospholipase (except the phospholipases of inventions 1-8) which comprises processing an expressed fungal peptide so as to cleave off a peptide to obtain a core peptide comprising the amino acid sequence RHDFGY[R/Q/H]N or a sequence differing from said amino acid sequence by a single amino acid substitution,

and having additionally at least two cysteines both on the N-terminus and C-terminus of said amino acid sequence, and uses of said phospholipase.

Invention 10: Claim 28

Process for producing cheese using any fungal/bacterial group XIII PLA2 phospholipase (except the phospholipases of inventions 1-9).

They are not so linked as to form a single general inventive concept (Rule 13.1 PCT) for the following reasons:

Rule 13.1 PCT stipulates that when an international application relates to a group of inventions, said groups of inventions have to be so linked as to form a general inventive concept. Rule 13.2 PCT specifies that the requirement of unity is fulfilled only when the separate inventions involve one or more of the same or corresponding special technical features. "Special technical features" are those technical features that define a contribution which EACH OF THE CLAIMED INVENTIONS makes of the prior art. The only technical feature linking potential inventions 1-10 is that they all relate to group XIII PLA2 phospholipases. Group XIII PLA2 phospholipases are not new. Therefore, the feature "group XIII PLA2 phospholipases" is not a special technical feature in the sense of Rule 13.2 PCT. Consequently, the international application lacks unity, and the separate groups of potential inventions have been divided as indicated.

Article 17(3)(a) PCT stipulates that the ISA shall establish the International Search Report on those parts of the international application which relate to the invention first mentioned in the claims ("main invention") and for those parts which relate to inventions in respect of which the additional fees were paid. An additional search fee has been paid, and the search has been carried out, for INVENTION 8. Hence, the present opinion relates to INVENTIONS 1 and 8. Neither the PCT nor the PCT guidelines provide a legal basis for further invitations to pay further additional search fees (W17/00, point 11 and W1/97, points 11-16).

Re item V.

1. The following document is referred to in this communication:
D1 : SORAGNI E ET AL: EMBO J 20:5079-5090, 2001

D9: Database EMBL accession no. AL670542; Q8X0U7, 2002

2. INVENTION 1:

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claim 1 is not inventive in the sense of Article 33(3) PCT. Document D1 discloses the phospholipase A2, TbSP1 from *Tuber borchii* which shares 94% identity in a 120 amino acid overlap with amino acids 91-210 of SEQ ID NO: 10. Claim 1 differs from D1 in that it relates to A2 phospholipase from a different fungus, namely *Tuber albidum*. A homologue of a known gene from a different species, as in the present case is considered obvious. Since TbSP1 in D1 is produced by a method involving N-terminal proteolytic processing, the method of claim 1 is also obvious. The phospholipase A2 of claim 1 does not provide any unexpected technical effect that did not follow plainly and logically from the prior art. An inventive step is therefore lacking. Claims 2-14 refer to obvious modifications or uses of claim 1 and therefore lack an inventive step, as well (Article 33(3) PCT).

3. INVENTION 8:

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claim 1 is not inventive in the sense of Article 33(3) PCT. Document D9 discloses the phospholipase A2, from *Neurospora crassa* which shares 64% identity in a 114 amino acid overlap with amino acids 29-149 of SEQ ID NO: 16. Claim 1 differs from D9 in that it relates to A2 phospholipase from a different fungus, namely *Fusarium venenatum*. A homologue of a known gene from a different species, as in the present case is considered obvious. Note that amino acids 29-149 of SEQ ID NO: 16 also share 52% identity in a 114 amino acid overlap with phospholipase A2, TbSP1 from *Tuber borchii* (see D1). Since TbSP1 in D1 is produced by a method involving N-terminal proteolytic processing, the method of claim 1 is also obvious. The phospholipase A2 of claim 1 does not provide any unexpected technical effect that did not follow plainly and logically from the prior art. An inventive step is therefore lacking. Claims 2-13, and 15-27 refer to obvious modifications or uses of claim 1 and therefore lack an inventive step, as well (Article 33(3) PCT).

2003-08200-9

DSMZ

Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbHBUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Novasynas A/S

Krogshøjvej 36

DK-2880 Bagved

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM			
Name: <u>Novasynas A/S</u> Address: <u>Krogshøjvej 36</u> <u>DK-2880 Bagved</u>		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: <u>DSM 15441</u> Date of the deposit or the transfer: <u>2003-02-12</u>			
III. VIABILITY STATEMENT					
The viability of the microorganism identified under II above was tested on <u>2003-02-12</u> . On that date, the said microorganism was ☒ viable ☐ no longer viable					
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED¹					
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY					
Name: <u>DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</u> Address: <u>Menchinger Weg 1b</u> <u>D-38124 Braunschweig</u>		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <u>V. Weh</u> Date: <u>2003-02-13</u>			

- ¹ Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
² In the cases referred to in Rule 10.2(a) (II) and (III), refer to the most recent viability test.
³ Mark with a cross the applicable box.
⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

2003-08200-01

43
112BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDUREDSMZ
Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

INTERNATIONAL FORM

Novozymes A/S

Krogshøjvej 36

DK-2880 Bagsvaerd

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
Issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
Identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <u>NN049664</u>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: <u>DSM 15441</u>
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on <u>2003-02-12</u> (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depository Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Munchener Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): <u>V. Weils</u> Date: <u>2003-02-13</u>

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

Form DSMZ-BPM (sole page) 12/2001

2003-08205-01

DSMZ

113

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

Deutscher Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

INTERNATIONAL FORM

Novosyns A/S

Krogsholvej 36

DK-2880 Bagvaerd

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
Issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <u>NN049665</u>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: <u>DSM 15442</u>
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by: ☐ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on <u>2003-02-12</u> (Date of the original deposit).	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I. above was received by this International Depositary Authority on _____ (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: <u>DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MICROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</u> Address: <u>Marchander Weg 1b D-38124 Braunschweig</u>	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): <u>V. Weilo</u> Date: <u>2003-02-13</u>

¹ Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

Form DSMZ-BPM (sole page) 12/2001

2003-08205-01

DSMZ 119
Deutsche Sammlung von
Mikroorganismen und
Zellkulturen GmbH

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Novozymes A/S
Krogshøjvej 36
DK-2880 Bagvaerd

VIABILITY STATEMENT
Issued pursuant to Rule 16.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY
Indicated at the bottom of this page

I. DEPOSITOR		II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Name: Novozymes A/S Address: Krogshøjvej 36 DK-2880 Bagvaerd		Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY: DSM 15442 Date of the deposit or the transfer: 2003-02-12	
III. VIABILITY STATEMENT			
The viability of the microorganism identified under II above was tested on 2003-02-12 . On that date, the said microorganism was ☒ viable ☐ no longer viable			
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED			
V. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY			
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig		Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): V. Weh Date: 2003-02-13	

1 Indicate the date of original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
2 In the case referred to in Rule 16.2(a) (i) and (ii), refer to the most recent viability test.
3 Mark with a cross the applicable box.
4 Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

146
115

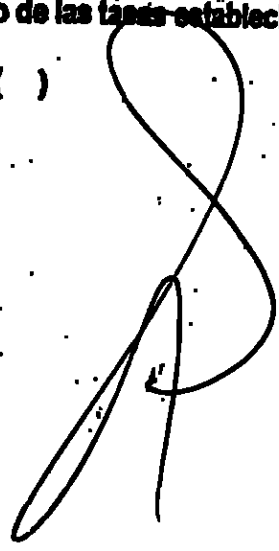
SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05112167 00000000 Folios: 117
Fecha (ADM): 2005-11-03 14:26:26
Tramite : 011 PCT-PATENT 3/3 FASE NRC1 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION <i>PCT</i> MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA <i>(✓)</i> INCOMPLETA	()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA	()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA	()	()

Firma Responsable:

Fecha:



#7
116

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
ESCOBAR URIBE JIMENA
Apoderado(a) y/o Representante de
NOVOZYMES A/S

REFERENCIA	Radicación No.	5 112187
	Solicitud internacional	DK2004/000279
	Fecha inicio fase nacional	28/11/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	13633

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


CLARA DE JAIMES
Jefe de la División de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 28 Dic 2005
adpa11