

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 979**

51 Int. Cl.:

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.02.2009 PCT/EP2009/052246**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.09.2009 WO09109500**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.02.2009 E 09716837 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.08.2016 EP 2250259**

54 Título: **Polipéptidos con actividad lipásica y polinucleótidos que codifican los mismos**

30 Prioridad:

29.02.2008 EP 08152163
29.02.2008 US 32443 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.03.2017

73 Titular/es:

NOVOZYMES A/S (100.0%)
Krogshøjvej 36
2880 Bagsvaerd, DK

72 Inventor/es:

VIND, JESPER;
KNÖTZEL, JÜRGEN CARSTEN FRANZ;
BORCH, KIM;
SVENDSEN, ALLAN;
CALLISEN, THOMAS HOENGER;
YAYER, DEBBIE;
BJOERNVAD, MAD S ESKELUND y
HANSEN, PETER KAMP

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 603 979 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos con actividad lipásica y polinucleótidos que codifican los mismos

5 Campo de la invención

[0001] La presente invención se refiere a variantes de lipasa con un efecto de lavado mejorado para la generación de olor y a un método para prepararlas.

Particularmente se refiere a variantes de la lipasa *Thermomyces lanuginosus*.

10

Antecedentes de la invención

[0002] Las lipasas son útiles, por ejemplo, como enzimas de detergente para eliminar manchas de lípido o grasas de ropa y otros tejidos, y como aditivos para masa para pan y otros productos horneados.

15 Así, una lipasa derivada de *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo *Humicola lanuginosa*, EP 258068 y EP 305216) se vende para el detergente usado bajo el nombre de Lipolase® (producto de Novozymes A/S).

La WO 0060063 describe variantes de la lipasa *T. lanuginosus* con un rendimiento de primer lavado particularmente bueno en una solución de detergente.

Las WO 9704079, WO 9707202 y WO 0032758 también revelan variantes de la lipasa *T. lanuginosus*.

20

[0003] En algunas aplicaciones, es de interés minimizar la formación de ácidos grasos de cadena corta generadores de olor.

Así, se sabe que detergentes de lavandería con lipasas pueden dejar a veces olores residuales fijados en tela manchada de leche (EP 430315).

25 El documento WO 02062973 divulga variantes de lipasa donde la generación de olor ha sido reducida por la unión de una extensión C-terminal.

La recientemente publicada WO 07087508 divulga variantes de lipasa donde la generación de olor ha sido reducida por la introducción de mutaciones en una o más regiones identificadas en una lipasa madre.

La WO 07087503 describe polipéptidos con actividad lipásica y que además tienen un RP de al menos 0.8 y un BR de al menos 1.1 en las condiciones de prueba dadas en la especificación.

30

Resumen de la invención

[0004] En un primer aspecto, la invención se refiere a un polipéptido con actividad lipásica, que es al menos un 80 % idéntico a SEC ID n.º: 2 y es un polipéptido: (a) con al menos una de: (i) una actividad lipásica (LU) relativa a la

35

absorbancia a 280 nm (A280) inferior a 500 LU/A280, donde una unidad de LU (1 LU) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 micro mol de ácido butírico por minuto a 30°C a pH 7, y la absorbancia del polipéptido se mide a 280 nm (ii) un riesgo de rendimiento de olor (R) por debajo de 0.5, donde R se calcula como la proporción

40

entre la cantidad de ácido butírico liberado a partir de una muestra lavada de polipéptido y la cantidad de ácido butírico liberado a partir de una muestra lavada de polipéptido de referencia, después ambos valores han sido corregidos para la cantidad de ácido butírico liberado a partir de una muestra lavada no polipeptídica donde el

polipéptido de referencia es la parte madura de SEC ID n.º: 2 con las sustituciones T231 R+N233R o (iii) un factor riesgo beneficio (BR) de al menos 1.8, donde BR se define como la media de rendimiento de lavado (RP_{avg}) dividida con el riesgo de rendimiento de olor (R) donde RP_{avg} indica la media de rendimiento relativo en comparación con el

45

polipéptido de referencia de mediciones hechas a 0.5 mg ep/L; y (b) que comprende alteraciones de los aminoácidos en las posiciones T231 R +N233R +1255A +P256K y al menos uno de: (i) S58A +V60S +A150G +L227G; o (ii) E210V/G; cuyas posiciones son correspondientes a SEC ID n.º: 2.

[0005] En otros aspectos, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido con actividad lipásica, un constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido, un vector de expresión recombinante que

50

comprende el constructo de ácido nucleico, y una célula huésped transformada que comprende el constructo de ácido nucleico o el vector de expresión recombinante.

[0006] En otro aspecto, la invención se refiere a un método de preparación del polipéptido que incluye las etapas: (a) cultivo de la célula huésped transformada que comprende la construcción de ácido nucleico o el vector de expresión

55

recombinante que comprende el polipéptido bajo condiciones conductivas para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

[0007] En otro aspecto, la invención se refiere a una formulación que comprende el polipéptido.

60

[0008] En otro aspecto, la invención se refiere a un método de reducción de formación de ácidos grasos de cadena corta generadores de olor durante hidrólisis lipídica utilizando el polipéptido.

Breve descripción de las figuras

65

[0009] La Figura 1 muestra el alineamiento de lipasas.

Listados de secuencias

[0010]

- 5
 SEC ID n.º: 1 muestra la lipasa que codifica la secuencia de ADN de *Thermomyces lanoginosus*.
 SEC ID n.º: 2 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Thermomyces lanoginosus*.
 SEC ID n.º: 3 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Absidia reflexa*.
 SEC ID n.º: 4 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Absidia corimbifera*.
 10 SEC ID n.º: 5 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Rhizomucor miehei*.
 SEC ID n.º: 6 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Rhizopus oryzae*.
 SEC ID n.º: 7 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus niger*.
 SEC ID n.º: 8 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus tubingensis*.
 SEC ID n.º: 9 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Fusarium oxysporum*.
 15 SEC ID n.º: 10 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Fusarium heterosporum*.
 SEC ID n.º: 11 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus oryzae*.
 SEC ID n.º: 12 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Penicillium camemberti*.
 SEC ID n.º: 13 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus foetidus*.
 SEC ID n.º: 14 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus niger*.
 20 SEC ID n.º: 15 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Aspergillus oryzae*.
 SEC ID n.º: 16 muestra la secuencia de aminoácidos de una lipasa de *Landerina penisapora*.

Descripción detallada de la invención

25 [0011] El uso de lipasas para eliminar manchas de lípido y grasa se conoce en la técnica donde las actividades de lipasas que suponen liberar lípidos de cadena corta libres, tal como por ejemplo ácido butírico se asocian a un olor indeseable.

La hidrólisis del sustrato de la tributirina produce la liberación de ácido butírico.

30 Sorprendentemente, se ha descubierto que los polipéptidos de la presente invención tienen una actividad específica baja, medida como LU/A280 con respecto a la tributirina a pH neutro cf. ejemplo 2 y tabla 3.

[0012] El factor riesgo beneficio (BR) se calcula por la división del rendimiento de (lavado) relativo (beneficio, RP) con el riesgo de rendimiento de olor (riesgo, R).

35 El rendimiento de lavado se puede medir por un ensayo de tensión mecánica automatizado (AMSA) cf. ejemplo 3 y la generación de olor se puede medir directamente por cromatografía de gases, cf. ejemplo 4 y tabla 3.

Un olor reducido afecta al BR y puede conducir a un aumento de BR.

Además, se ha descubierto que los polipéptidos de la presente invención tienen una generación de olor reducida y un BR aumentado sobre las lipasas conocidas en la técnica cf. ejemplo 5 y tabla 3.

40 [0013] Actividad lipásica (LU): el término "actividad lipásica" como se usa aquí implica una actividad de hidrolasa de éster carboxílico que cataliza la hidrólisis de triacilglicerol bajo la formación de diacilglicerol y un carboxilato.

Con motivo de la presente invención, la actividad lipásica se determina según el procedimiento siguiente: un sustrato para lipasa se prepara mediante una emulsión de tributirina (tributirato de glicerina) usando goma arábiga como emulsionante.

45 La hidrólisis de tributirina a 30 °C a pH 7 o 9 se sigue en un experimento de valoración del pH estadístico.

Una unidad de actividad lipásica (1 LU) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 micro mol de ácido butírico por minuto a 30 °C, pH 7.

50 [0014] Riesgo de rendimiento de olor (R): el término "riesgo de rendimiento de olor" como se usa aquí implica la proporción entre la cantidad de ácido butírico liberado de una muestra lavada de polipéptido y la cantidad de ácido butírico liberado a partir de una muestra lavada de polipéptido de referencia, después ambos valores han sido corregidos para la cantidad de ácido butírico liberado a partir de una muestra lavada no polipeptídica.

[0015] Rendimiento relativo (RP): el término "rendimiento relativo" como se usa aquí implica el rendimiento de lavado del polipéptido en comparación con el rendimiento de lavado de un polipéptido de referencia.

55 Con motivo de la presente invención, rendimiento relativo se determina según el procedimiento descrito en el ejemplo 3.

[0016] Polipéptido de referencia: el término "polipéptido de referencia", "enzima de referencia" o "lipasa de referencia" como se utiliza en este caso significa la parte madura de SEC ID n.º: 2 con las sustituciones T231R +N233R.

60 [0017] Factor riesgo beneficio (BR): el término "factor riesgo beneficio" como se usa aquí significa el rendimiento relativo medio (RP_{avg}) comparado con el riesgo de rendimiento de olor (R) y tiene la fórmula siguiente: $BR = RP_{avg} / R$.
 65

Nomenclatura para modificaciones de aminoácido

[0018] Al describir variantes de lipasa según la invención, la nomenclatura siguiente se usa para facilidad de referencia:

5

Aminoácido(s) original(es):posición(es):aminoácido(s) sustituido

[0019] Según esta nomenclatura, para el caso de la sustitución de ácido glutámico para glicina en la posición 195 se muestra como G195E.

10 Una delección de glicina en la misma posición se muestra como G195* y la inserción de un residuo de aminoácido adicional tal como lisina se muestra como G195GK.

Donde una lipasa específica contiene una "delección" en comparación con otras lipasas y una inserción está hecha en tal posición, esta se indica como *36D para la inserción de un ácido aspártico en la posición 36.

15 [0020] Las mutaciones múltiples se separan por sumas, es decir: R170Y+G195E, mutaciones representantes en posiciones 170 y 195 tirosina de sustitución y ácido glutámico para arginina y glicina, respectivamente.

[0021] X231 indica el aminoácido en un polipéptido progenitor que corresponde con la posición 231, cuando se aplica el procedimiento de alineamiento descrito.

20 X231R indica que el aminoácido se sustituye con R.

Para SEC ID n.º: 2 X es T y X231 R así indica una sustitución de T en la posición 231 con R.

Donde el aminoácido en una posición (por ejemplo 231) se puede sustituir por otro aminoácido seleccionado a partir de un grupo de aminoácidos, por ejemplo el grupo que consiste en R, P e Y, este será indicado por X231R/P/Y.

25 [0022] En cualquier caso, se utiliza la carta única de IUPAC aceptada o abreviatura de aminoácido de carta triple.

[0023] Identidad: el término "identidad" como se usa aquí implica que la relación entre secuencias de dos aminoácidos entre dos secuencias de nucleótidos se describe mediante el parámetro de "identidad".

30 [0024] Para fines de la presente invención, el alineamiento de dos secuencias de aminoácidos se determina usando el programa de Needle desde el paquete EMBOSS (<http://EMBOSS.ORG>) versión 2.8.0.

El programa de Needle implementa el algoritmo de alineamiento global descrito en Needleman, S. B. y Wunsch, C.D. (1970) J. Mol. Biol. 48,443-453.

35 La sustitución matricial usada es BLOSUM62, la penalización de abertura del espacio es 10 y penalización por extensión de espacio es 0.5.

[0025] El grado de identidad entre una secuencia de aminoácidos de la presente invención ("secuencia de invención"; por ejemplo aminoácidos 1 a 269 de SEC ID n.º: 2) y una secuencia de aminoácidos diferente ("diferente") se calcula como el número de coincidencias exactas en un alineamiento de las dos secuencias, dividido por la longitud de la "secuencia de invención" o la longitud de la "secuencia diferente", cualquiera que sea la más corta.

40

El resultado se expresa en identidad en porcentaje.

[0026] Se produce una correspondencia exacta cuando la "secuencia de invención" y la "secuencia externa" tienen residuos de aminoácidos idénticos en las mismas posiciones del recubrimiento.

45

La longitud de una secuencia es el número de residuos de aminoácidos en la secuencia (por ejemplo, la longitud de SEC ID n.º: 2 son 269).

[0027] El procedimiento anterior se puede utilizar para el cálculo de identidad al igual que de homología y para el alineamiento.

50

En el contexto de la homología de la presente invención y el alineamiento han sido calculados como se describe abajo.

Homología y alineamiento

55

[0028] Para fines de la presente invención, el grado de homología se puede determinar adecuadamente mediante programas informáticos conocidos en la técnica, tal como espacio proporcionado en el embalaje de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. y Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48,443-45), usando espacio con los ajustes siguientes para la comparación de secuencia polipeptídica: penalización por creación de espacio de 3.0 y penalización por extensión de espacio de 0.1.

60

[0029] En la presente invención, las posiciones correspondientes (u homólogas) en las secuencias de lipasa de *Absidia reflexa*, *Absidia corimbefera*, *Rhizomucor miehei*, *delemar Rhizopus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tubigenis*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium heterosporum*, *Aspergillus oryzae*, *Penicillium camembertii*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo: *Humicola lanuginosa*) y *Landerina penisapora* se

65

definen por el alineamiento mostrado en la figura 1.

[0030] Para encontrar las posiciones homólogas en las secuencias de lipasa no mostradas en el alineamiento, la secuencia de interés se alinea a las secuencias mostradas en la figura 1.

5 La nueva secuencia se alinea al alineamiento actual en la figura 1 usando el alineamiento del espacio a la secuencia más homóloga encontrada por el programa de espacio.

Se proporciona espacio en el embalaje de programa GCG (Program Manual for the Wisconsin Package, Version 8, August 1994, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711) (Needleman, S.B. and Wunsch, C.D., (1970), Journal of Molecular Biology, 48, 443-45).

10 Los ajustes siguientes se usan para la comparación de secuencia polipeptídica: penalización de creación de espacio de 3.0 y penalización por extensión de espacio de 0.1.

Fuentes de polipéptidos con actividad lipásica

15 [0031] Cualquier polipéptido adecuado puede ser utilizado.
En algunas formas de realización, el polipéptido puede ser un polipéptido fúngico.

[0032] El polipéptido puede ser un polipéptido de levadura originado de géneros tales como una *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*; o más preferiblemente un polipéptido fúngico filamentosos originado de géneros tales como un *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Micelioptora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomices*, *Penicillium*, *Piromices*, *Schizofilum*, *Talaromyces*, *Teramoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Thermomyces* o *Trichoderma*.

25 [0033] El polipéptido puede además ser un *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o un polipéptido de *Saccharomyces oviformis* con actividad lipásica.

[0034] Alternativamente, el polipéptido es un *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus turbigenis*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium*, *torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo: *Humicola lanuginosa*), *Mucor miehei*, *Micelioptora termófila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o polipéptido de *Trichoderma viride*.

[0035] En algunas formas de realización la invención se refiere a un polipéptido que es una lipasa de *Thermomyces*.

40 [0036] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un polipéptido que es una lipasa de *Thermomyces lanuginosus*.

45 [0037] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un polipéptido, donde el polipéptido es al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % idéntico a SEC ID n.º: 2.

Identificación de alteraciones en polipéptidos con actividad lipásica

50 [0038] Las posiciones referidas abajo son las posiciones de los residuos de aminoácidos en SEC ID n.º: 2.
El procedimiento descrito en el párrafo "Homología y alineamiento" se utiliza para encontrar la posición correspondiente u homóloga del residuo de aminoácido en una lipasa diferente.

[0039] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un primer polipéptido con actividad lipásica donde dicho polipéptido es un polipéptido con al menos uno de: (a) una actividad lipásica (LU) relativa a la absorbancia a 280 nm (A280) de menos del 500, menos del 450, menos del 400, menos del 350, menos del 300, menos del 250, menos del 200, menos del 150, menos del 100 o menos del 50 LU/A280, donde una unidad de LU (1 LU) se define como la cantidad de enzima capaz de liberar 1 micro mol de ácido butírico por minuto a 30°C a pH 7 y la absorbancia del polipéptido se mide a 280 nm (b) un riesgo de rendimiento de olor (R) menor de 0.5, menor de 0.4, menor de 0.3, menor de 0.2, menor de 0.1 o menor de 0.05, donde R se calcula como la proporción entre el ácido butírico de cantidad liberada a partir de una muestra lavada de polipéptido y la cantidad de ácido butírico liberada a partir de una muestra lavada de polipéptido de referencia, después ambos valores han sido corregidos para la cantidad de ácido butírico liberada a partir de una muestra lavada no polipeptídica; o (c) un factor riesgo beneficio (BR) de al menos 1.8, al menos 1.9, al menos 2.0, al menos 2.5, al menos 3.0, al menos 4.0, al menos 5.0 o al menos 6.0 donde BR se define como la media el rendimiento de lavado (RP_{avg}) dividida con el riesgo de rendimiento de olor (R).

[0040] En algunas formas de realización, la invención se refiere al primer polipéptido donde dicho polipéptido comprende alteraciones de los aminoácidos en las posiciones T231 R +N233R +1255A +P256K y al menos uno de (a) S58A +V60S +A150G +L227G; o (b) E210V/G; cuyas posiciones son correspondientes a SEC ID n.º: 2.

5 [0041] En algunas formas de realización, la invención se refiere al primer polipéptido que comprende además al menos una de la alteración del aminoácido en las posiciones I86V o T143S.

10 [0042] En algunas formas de realización, la invención se refiere al primer polipéptido, donde el polipéptido comprende al menos otra alteración seleccionada a partir de una sustitución, una delección o una adición de al menos un aminoácido en una posición que corresponde a la posición E1; D27; N33; S83; G91; N94; K98; E99; D102; D111; G163; I202; E210; S216; L259 o L269 de SEC ID n.º 2.

15 [0043] En algunas formas de realización, la invención se refiere al primer polipéptido, donde al menos una alteración es seleccionada desde el grupo consistente en: E1N/*, D27N, N33Q, S83T, G91N, N94R, K98I, E99K, D102A, D111N, G163K, I202L, E210A, S216P, L259F o L269APIA de SEC ID n.º: 2.

20 [0044] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un segundo polipéptido que comprende alteraciones de los aminoácidos en las posiciones T231 R +N233R +1255A +P256K y al menos uno de: (a) S58A +V60S +A150G +L227G; o (b) E210V/G; cuyas posiciones son correspondientes a SEC ID n.º: 2.

[0045] En algunas formas de realización, la invención se refiere al segundo polipéptido que comprende además al menos una de las alteraciones del aminoácido en las posiciones I86V o T143S.

25 [0046] En algunas formas de realización, la invención se refiere al segundo polipéptido, donde el polipéptido comprende al menos otra alteración seleccionada a partir de una sustitución, una delección o una adición de al menos un aminoácido en una posición que corresponde con la posición E1; D27; N33; S83; G91; N94; K98; E99; D102; D111; G163; I202; E210; S216; L259 o L269 de SEC ID n.º 2.

30 [0047] En algunas formas de realización, la invención se refiere al segundo polipéptido, donde al menos una alteración es seleccionada del grupo que consiste en: E1N/*, D27N, N33Q, S83T, G91N, N94R, K98I; E99K, D102A, D111N, G163K, I202L, E210A, S216P, L259F o L269APIA de SEC ID n.º: 2.

35 [0048] En algunas formas de realización, la invención se refiere al primer polipéptido, donde dicho polipéptido comprende alteraciones seleccionadas del grupo que consiste en: (a) T231 R +N233R +L269APIA; (b) S58T +V60K +A150G +T231R +N233I +D234G; (c) S58T +V60K + I86V + D102A + A150G + L227G + T231R + N233R + P256K; (d) S58N +V60S +I86P +T231R +N233R +P256S; (e) S58N +V60S +I86S +L227G +T231R +N233R +P256S; y (f) S58N +V60S +I86T +L227G +T231 R +N233R +P256L.

40 [0049] En algunas formas de realización, la invención se refiere al primer o el segundo polipéptido, donde dicho polipéptido comprende alteraciones seleccionadas del grupo que consiste en: (a) S58A +V60S + S83T +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (b) S58A +V60S + I86V +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (c) S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (d) S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +G163K +S216P +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (e) E1* +S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (f) S58A +V60S + I86V +K98I +E99K +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (g) E1N +S58A +V60S + I86V +K98I +E99K +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K +L259F; (h) S58A +V60S + I86V +K98I +E99K +D102A +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (i) N33Q +S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (j) E1* +S58A +V60S + I86V +K98I +E99K +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (k) E1N +S58A +V60S +I86V +K98I +E99K +T143S +A150G +S216P +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (l) D27N +S58A +V60S + I86V +G91N +N94R +D111N +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (m) E1N +S58A +V60S + I86V +K98I +E99K +T143S +A150G +E210A +S216P +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (n) A150G +E210V +T231R +N233R +1255A +P256K; (o) I202L +E210G +T231R +N233R +1255A +P256K; (p) E1N +A18K +V60K +I86V +A150G +E210A +L227G +T231 R +N233R +P256K; (q) E1L +D27K +V60K +I86V +A150G +S216P +L227G +T231R +N233R +P256K; (r) E1N +S58A +V60S +S83T +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (s) E1N +S58T +V60K +I86V +D102A +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (t) E1N +S58A +V60S +I86V +K98I +E99K +D102A +T143S +A150G +S216P +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; y (u) S58A +V60S +S83T +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K.

60 **Tabla 1:** alteraciones que pueden comprender los polipéptidos

Polipéptido	Mutaciones en SEQ ID N.º: 2
1	T231 R +N233R +L269APIA
2	S58T +V60K +A150G +T231R +N233I +D234G

ES 2 603 979 T3

3	S58T +V60K + 186V + D102A + A150G + L227G + T231R + N233R + P256K
4	S58N +V60S +I86P +T231 R +N233R +P256S
5	S58N +V60S +I86S +L227G +T231 R +N233R +P256S
6	S58N +V60S +I86T +L227G +T231 R +N233R +P256L
7	S58A +V60S + S83T +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K
8	S58A +V60S + 186V +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K
9	S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K
10	S58A +V60S + 186V +T143S +A150G +G163K +S216P +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K
11	E1* +S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K
12	S58A +V60S + 186V +K98I +E99K +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K
13	E1N, S58A, V60S, I86V, K98I, E99K, T143S, A150G, L227G, T231R, N233R, I255A, P256K, L259F
14	S58A, V60S, 186V, K98I, E99K, D102A, T143S, A150G, L227G, T231R, N233R, I255A, P256K
15	N33Q, S58A, V60S, I86V, T143S, A150G, L227G, T231R, N233R, I255A, P256K
16	E1* +S58A +V60S +I86V +K98I +E99K, T143S +A150G +L227G +T231R+N233R +I255A +P256K
17	E1N +S58A +V60S +I86V +K98I +E99K +T143S +A150G +S216P +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K
18	D27N +S58A +V60S +186V +G91 N +N94R +D111N +T143S +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K
19	E1N +S58A +V60S +I86V +K98I +E99K +T143S +A150G +E210A +S216P +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K
20	A150G +E210V +T231 R +N233R +I255A +P256K
21	I202L +E210G +T231R +N233R +I255A +P256K
22	E1N +A18K +V60K +I86V +A150G +E210A +L227G +T231R +N233R +P256K
23	E1L +D27K +V60K +I86V +A150G +S216P +L227G +T231R +N233R +P256K
24	E1N +S58A +V60S +S83T +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K
25	E1N +S58T +V60K +I86V +D102A +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K
26	E1N +S58A +V60S +I86V +K98I +E99K +D102A +T143S +A150G +S216P +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K
27	S58A +V60S +S83T +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K

[0050] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un primer polipéptido, donde dicho polipéptido comprende alteraciones seleccionadas del grupo que consiste en: (a) T231 R +N233R +L269APIA; (b) S58T +V60K

+A150G +T231R +N233I +D234G; (c) S58T +V60K + I86V + D102A + A150G + L227G + T231R + N233R + P256K; (d) S58N +V60S +I86P +T231R +N233R +P256S; (e) S58N +V60S +I86S +L227G +T231R +N233R +P256S; y (f) S58N +V60S +I86T +L227G +T231 R +N233R +P256L.

5 [0051] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un primer o un segundo polipéptido, donde dicho polipéptido comprende alteraciones seleccionadas del grupo que consiste en: (a) S58A +V60S + S83T +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (b) S58A +V60S + I86V +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (c) S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (d) S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +G163K +S216P +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (e) E1* +S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (f) S58A +V60S + I86V +K981 +E99K +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (g) E1N +S58A +V60S + I86V +K981 +E99K +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K +L259F; (h) S58A +V60S + I86V +K981 +E99K +D102A +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (i) N33Q +S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (j) E1* +S58A +V60S + I86V +K981 +E99K +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (k) E1N +S58A +V60S +I86V +K981 +E99K +T143S +A150G +S216P +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (l) D27N +S58A +V60S + I86V +G91N +N94R +D111N +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (m) E1N +S58A +V60S + I86V +K981 +E99K +T143S +A150G +E210A +S216P +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (n) A150G +E210V +T231R +N233R +1255A +P256K; (o) I202L +E210G +T231R +N233R +1255A +P256K; (p) E1N +A18K +V60K +I86V +A150G +E210A +L227G +T231R +N233R +P256K; (q) E1L +D27K +V60K +I86V +A150G +S216P +L227G +T231R +N233R +P256K; (r) E1N +S58A +V60S +S83T +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (s) E1N +S58T +V60K +I86V +D102A +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; (t) E1N +S58A +V60S +I86V +K981 +E99K +D102A +T143S +A150G +S216P +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K; y (u) S58A +V60S +S83T +A150G +L227G +T231R +N233R +1255A +P256K.

25 Polinucleótidos, vector de expresión, célula huésped, producción de polipéptidos

[0052] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido.

30 Tales polinucleótidos pueden hibridar bajo condiciones de astringencia muy bajas, condiciones de astringencia preferiblemente bajas, más preferiblemente condiciones de astringencia media, más preferiblemente condiciones de astringencia medio altas, aún más preferiblemente condiciones de astringencia altas y de la forma más preferible condiciones de astringencia muy altas con nucleótidos (i) 178 a 660 de SEC ID n.º: 1, (ii) la secuencia de ADNc contenida en nucleótidos 178 a 660 de SEC ID n.º: 1, (iii) una subsecuencia de (i) o (ii), o (iv) una cadena complementaria de (i); (ii), o (iii) (J. Sambrook, E.F. Fritsch, and T. Maniatus, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d edición, Cold Spring Harbor, New York).

35 Una subsecuencia de SEC ID n.º: 1 contiene al menos 100 nucleótidos contiguos o preferiblemente al menos 200 nucleótidos contiguos.

Además, la subsecuencia puede codificar un fragmento de polipéptido que tiene actividad lipásica.

40 [0053] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos en longitud, las condiciones de astringencia muy bajas a muy altas se definen como prehibridación e hibridación a 42°C en 5X SSPE, 0,3 % SDS, 200 ug/ml ADN de esperma de salmón cortado y desnaturalizado y bien un 25 % de formamida para astringencias muy bajas y bajas, un 35 % de formamida para astringencias medias y medio altas o bien un 50 % de formamida para astringencias altas y muy altas, seguidas de procedimientos de hibridación estándar Southern durante 12 a 24 horas óptimamente.

45 [0054] Para sondas largas de al menos 100 nucleótidos en longitud, el material portador se lava finalmente tres veces por cada 15 minutos utilizando 2X SSC, 0.2 % SDS preferiblemente al menos a 45 °C (astringencia muy baja), más preferiblemente al menos a 50 °C (astringencia baja), más preferiblemente al menos a 55 °C (astringencia media), más preferiblemente al menos a 60 °C (astringencia medio alta), aún más preferiblemente al menos a 65 °C (astringencia alta) y de la forma más preferible al menos a 70 °C (astringencia muy alta).

50 [0055] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido operacionalmente vinculado a al menos una secuencia de control que dirige la producción del polipéptido en un huésped de expresión.

55 [0056] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácido nucleico.

60 [0057] En algunas formas de realización, la invención se refiere a una célula huésped transformada que comprende el constructo de ácido nucleico o el vector de expresión recombinante.

65 [0058] El polinucleótido aislado que codifica el polinucleótido, el constructo de ácido nucleico que comprende el polinucleótido, el vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos y la célula huésped transformada que comprende el constructo de ácido nucleico o el vector de expresión recombinante todos se pueden obtener por métodos conocidos en la técnica.

[0059] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un método de preparación del polipéptido que incluye las etapas: (a) cultivo de la célula huésped transformada que comprende el constructo de ácido nucleico o el vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácido nucleico conductivo bajo condiciones conductoras para la producción del polipéptido; y (b) recuperación del polipéptido.

5 El método se puede practicar según los principios conocidos en la técnica.

Usos

10 [0060] Enzimas de la presente invención pueden ser utilizadas, incluso de uso industrial para eliminar la materia grasa.

[0061] En algunas formas de realización, la invención se refiere a una formulación que comprende el polipéptido. En otras formas de realización, la invención se refiere a una formulación, donde dicha formulación puede ser una formulación sólida o líquida.

15 El polipéptido se puede utilizar en una formulación sólida al igual que en una líquida.

[0062] En algunas formas de realización, la invención se refiere a un método de reducción de la formación de ácidos grasos de cadena corta generadores de olor durante hidrólisis lipídica, utilizando el polipéptido.

20 Ejemplos

[0063] Posteriormente, la presente invención se describe mediante los ejemplos siguientes que no deberían ser interpretados como limitación del ámbito de la invención.

25 [0064] Productos químicos usados como tampones y sustratos fueron productos comerciales de al menos calidad reactiva.

Ejemplo 1 - Producción de variantes de lipasa

30 [0065] Un plásmido que contiene el gen que codifica del polipéptido se construye y se transforma en una célula huésped adecuada, usando métodos estándar de la técnica.

[0066] La fermentación se realiza como una fermentación por lote alimentado, utilizando una temperatura media constante de 34 °C y un volumen de inicio de 1.2 litros.

35 El pH inicial del medio se fija a 6.5.

Una vez el pH ha aumentado a 7.0 este valor se mantiene a través de la adición de 10 % H₃PO₄.

El nivel de oxígeno disuelto en el medio se controla variando el índice de agitación y utilizando un índice de aireación fijo de 1.0 de aire de litro por medio de litro por minuto.

El nivel de adición de alimentación se mantiene a un nivel constante durante toda la fase de lote alimentado.

40 [0067] El medio de lote contiene jarabe de maltosa como fuente de carbono, urea y extracto de levadura como fuente de nitrógeno y una mezcla de trazas de metales y sales.

La alimentación adicionada continuamente durante la fase de lote alimentado contiene jarabe de maltosa como fuente de carbono mientras que el extracto de levadura y urea se añade para asegurar un suministro de nitrógeno suficiente.

45 [0068] La purificación del polipéptido se puede realizar usando métodos estándar conocidos en la técnica, por ejemplo, por la filtración del sobrenadante de fermentación y la posterior cromatografía hidrofóbica y cromatografía de intercambio de iones, por ejemplo, como se describe en EP 0 851 913 EP, ejemplo 3.

50 Ejemplo 2 - Unidad de actividad de lipasa (LU) con respecto a la absorbancia a 280 nm (LU/A280)

[0069] La actividad de la lipasa (LU) se determina como se ha descrito anteriormente en la sección de Actividad lipásica.

55 La absorbancia de la lipasa a 280 nm se mide (A280).

La actividad específica de un polipéptido se puede expresar como la proporción de LU/A280.

[0070] La LU/A280 relativa se calcula como la LU/A280 del polipéptido dividido por la LU/A280 de una enzima de referencia.

60 En el contexto de la presente invención, la enzima de referencia es la lipasa de SEC ID N.º: 2 con las sustituciones T231 R +N233R.

Ejemplo 3 - Cálculo del rendimiento relativo (RP) de datos obtenidos del ensayo de tensión mecánica automatizada (AMSA)

65 [0071] Los polipéptidos de la presente invención son evaluados utilizando el ensayo de tensión mecánica automática

(AMSA).

Con el AMSA se puede examinar el rendimiento de lavado de una gran cantidad de soluciones de enzima de detergente de volumen pequeño.

5 La placa AMSA tiene un número de ranuras para las soluciones de prueba y una tapa que comprime firmemente la muestra textil que se va a lavar frente a todas las aberturas de ranura.

Durante el tiempo de lavado, la placa, las soluciones de prueba, el textil y la tapa se agitan enérgicamente para llevar la solución de prueba en contacto con el textil y aplicar la tensión mecánica.

Para otra descripción ver la WO 02/42740 especialmente el párrafo "Special method embodiments" en las páginas 23-24.

10 Los contenedores, que contienen la solución de prueba de detergente, consisten en agujeros cilíndricos (6 mm diámetro, 10 mm profundidad) en una lámina metálica.

El tejido manchado (material de prueba) se extiende sobre la lámina metálica y se usa como una tapa y sella en los contenedores.

Otra lámina metálica se extiende sobre el tejido manchado para evitar cualquier vertido de cada contenedor.

15 Las dos placas metálicas con el tejido manchado vibran arriba y abajo a una frecuencia de 30 Hz con una amplitud de 2 mm.

Tabla 2: las condiciones experimentales para AMSA

	Ingrediente	% peso
Solución de prueba	Sulfato de éter de alquilo de sodio (Surfac LC70)	12.0
	Alquilbencenosulfonato (LAS)	7.0
	Jabón de sebo/coco 80/20	3.2
	Alcohol etoxilato (Neodol 23-9)	2.4
	Solución de prueba alquilo óxido de dimetilamina (Empigen OB)	2.0
	Ácido cítrico (sodio)	2.8
	Hidróxido sódico	1.6
	Glicerina	2.3
	Monoetanolamina	2.7
	Monopropilenglicol (MPG)	4.7
	Agua	59.2
Volumen de solución de prueba	160 micro l	
pH	Como es (≈8.3), ajustado con hidróxido sódico y ácido cítrico	
Tiempo de lavado	20 minutos	
Temperatura	30 °C	
Dureza del agua	6 °dH Proporción de Ca ²⁺ /Mg ²⁺ /NaHCO ₃ : 2:1:4.5	
Concentración enzimática en la solución de prueba	0.125, 0.25, 0.50, 0.50 mg ep / l	
Secado	Rendimiento: después del lavado de las piezas textiles (crema de café de cúrcuma) se enjuagan inmediatamente en agua corriente y se secan al aire a 85 °C en 5 min.	
	Olor: después del lavado de las piezas textiles (crema de cúrcuma) se enjuagan inmediatamente en agua corriente y se secan a temperatura ambiente (20 °C) durante 2 horas	
Material de prueba	Muestra de crema de cúrcuma o muestra de crema de café de cúrcuma como se describe abajo (EMPA221 usado como algodón textil obtenido de EMPA St. Gallen, Lerchfeldstrasse 5, CH-9014 St. Gallen, Switzerland)	

20 [0072] Muestras de crema de cúrcuma y muestras de crema de café de cúrcuma fueron preparadas mediante la mezcla de 5g de cúrcuma (Santa Maria, Denmark) con 100g de crema (38 % de grasa, Aria, Denamark) y 100g de crema de café (9 % grasa, Aria, Dinamarca) a 50 °C, respectivamente.

La mezcla se dejó a esta temperatura durante aproximadamente 20 minutos y se filtro (50 °C) para eliminar cualquier partícula no disuelta.

25 La mezcla fue enfriada a 20 °C y las muestras de algodón tejido, EMPA221, fueron sumergidas en la mezcla de crema de cúrcuma y después se dejaron secar a temperatura ambiente durante la noche y se congelaron hasta su uso.

La preparación de muestras de crema de cúrcuma se describe en la WO 06125437.

30 [0073] El rendimiento del polipéptido fue medido como la luminosidad del color de las muestras textiles lavadas con ese polipéptido específico.

La luminosidad también se puede expresar como la intensidad de la luz reflejada desde la muestra textil cuando se ilumina con luz blanca.

Cuando el textil se mancha, la intensidad de la luz reflejada es inferior que la de un textil limpio.

35 Por lo tanto, la intensidad de la luz reflejada se puede utilizar para medir el rendimiento de lavado de una variante

polipeptídica.

[0074] Las mediciones de color se realizaron con un escáner de superficie plana profesional (PFU DL2400pro), que se utiliza para capturar una imagen de las muestras textiles lavadas.

5 Los sondeos se realizaron con una resolución de 200 dpi y con una profundidad de color de emisión de 24 bits. Para obtener resultados precisos, el escáner se calibró frecuentemente con un objetivo Kodak reflectante IT8.

[0075] Para extraer un valor para la intensidad de luz desde las imágenes escaneadas, se usó una aplicación de software diseñada especial (analyzer de vector de color de Novozymes).

10 El programa recupera los valores de píxel de 24 bit desde la imagen y los convierte en valores para rojo, (RGB) verde y azul.

El valor de intensidad (Int) se calcula añadiendo los valores de RGB juntos como vectores y luego tomando la longitud del vector resultante:

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

15

[0076] El rendimiento de lavado (P) de los polipéptidos fue calculado conforme a la fórmula:

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

20

donde Int(v) es el valor de intensidad de luz de superficie textil lavada con enzima e Int(r) es el valor de intensidad de luz de superficie textil lavada sin enzima.

[0077] Se da una puntuación de rendimiento relativo como el resultado del AMSA lavado conforme a la definición: puntuaciones de rendimiento relativas (RP) están sumando los rendimientos (P) del polipéptido evaluado frente al polipéptido de referencia:

25

$$RP = P(\text{polipéptido de prueba}) / P(\text{polipéptido de referencia}).$$

[0078] RP_{avg} indica la media de rendimiento relativo en comparación con el polipéptido de referencia de mediciones hecho a 0.5 mg ep/l.

30

[0079] Se considera un polipéptido para exponer un rendimiento de lavado mejorado, si este se lleva a cabo mejor que la referencia.

35 En el contexto de la presente invención, la enzima de referencia es la lipasa de SEC ID N.º: 2 con las sustituciones T231 R + N233R.

Ejemplo 4 - Cálculo de factor de riesgo (R) de mediciones de cromatografía de gases de microextracción en fase sólida.

40

[0080] La liberación de ácido butírico desde las muestras lavadas de lipasa se midieron por cromatografía de gases de microextracción en fase sólida (SPME-GC) utilizando el método siguiente.

Cuatro piezas de tejidos (5 mm de diámetro), lavadas en la solución específica en la tabla 2 que contienen 0.5 mg/l de lipasa, fueron transferidas a un frasco de cromatógrafo de gases (GC).

45 Las muestras fueron incubadas a 30 °C durante 24 h y posteriormente calentadas a 140 °C durante 30 min y almacenadas a 20 °C - 25 °C durante al menos 4 h antes del análisis.

El análisis se realizó en un Varian 3800 GC equipado con una columna Stabilwax- DA w/Integra-Guard (30 m, 0.32 mm ID y 0.25 micro-m df) y una fibra Carboxen de PDMS MEFS (85 micro-m).

Se realizó un muestreo de cada frasco GC a 50 °C durante 8 min con la fibra de MEFS en el espacio de cabeza sobre las piezas textiles y los compuestos probados fueron inyectados posteriormente sobre la columna (temperatura del inyector = 250 °C).

50

Flujo de columna = 2 ml Helium/min.

Gradiente de temperatura de horno de columna: 0 min = 50°C, 2 min = 50°C, 6 min 45 s = 240°C, 11 min 45 s = 240 °C.

55 Se realizó la detección utilizando un detector de ionización de llama (FID) y el tiempo de retención para el ácido butírico se identificó utilizando un estándar auténtico.

[0081] El riesgo de rendimiento de olor (R) de un polipéptido es la proporción entre la cantidad de ácido butírico liberado (área de valor máximo) a partir de una muestra lavada de polipéptido y la cantidad de ácido butírico liberado (área de valor máximo) a partir de una muestra lavada de polipéptido de referencia, después de que ambos valores se hayan corregido en cuanto a la cantidad de ácido butírico liberado (área de valor máximo) a partir de una muestra

60

lavada no polipeptídica (blanca).

El polipéptido de referencia es el polipéptido de SEC ID n.º: 2 con las sustituciones T231 R + N233R.

El riesgo de rendimiento de olor (R) del polipéptido se calcula de acuerdo con la fórmula de abajo:

5 Olor = ácido butírico medido (área de valor máximo) liberado desde la superficie textil.

$$\alpha_{enzima\ de\ prueba} = Olor_{enzima\ de\ prueba} - Olor_{blanco}$$

$$\alpha_{enzima\ de\ referencia} = Olor_{enzima\ de\ referencia} - Olor_{blanco}$$

$$R = \frac{\alpha_{enzima\ de\ prueba}}{\alpha_{enzima\ de\ referencia}}$$

10 [0082] Se considera un polipéptido para mostrar un olor reducido en comparación con la referencia si el factor R es inferior a 1.

Ejemplo 5 - Factor riesgo beneficio (BR).

15 [0083] El factor riesgo beneficio que describe el rendimiento de lavado en comparación con el riesgo reducido para olor se define así como:

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

20 [0084] Se considera una variante para mostrar el rendimiento de lavado mejorado y el olor reducido, si el factor BR es superior a 1.

Tabla 3: Actividad específica (LU/A280), riesgo de rendimiento de olor (R) y factor riesgo beneficio (BR) para algunos polipéptidos de la invención

Polipéptido	Mutaciones en SEQ ID N.º: 2	LU/A280 Ej.2	R Ej.4	BR Ej.5
REF	T231 R +N233R	4760	1.00	1.00
1	T231 R +N233R +L269APIA	127	0.19	2.77
2	S58T +V60K +A150G +T231R +N233I +D234G	1287	0.51	2.02
3	S58T +V60K + 186V + D102A + A150G + L227G + T231 R + N233R + P256K	358	0.44	2.04
4	S58N +V60S +I86P +T231 R +N233R +P256S	ND	0.5	2
5	S58N +V60S +I86S +L227G +T231 R +N233R +P256S	ND	0.2	2.82
6	S58N +V60S +I86T +L227G +T231 R +N233R +P256L	1576	0.34	2.11
7	S58A +V60S + S83T +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K	141	0.12	2.88
8	S58A +V60S + 186V +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K	479	0.20	3.04
9	S58A +V60S + 186V +T143S +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K	232	0.06	6.20
10	S58A +V60S + 186V +T143S +A150G +G163K +S216P +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K	208	0.09	4.54
11	E1* +S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K	273	0.27	2.87
12	S58A +V60S + 186V +K98I +E99K +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K	143	0.20	3.12
13	E1N, S58A, V60S, I86V, K98I, E99K, T143S, A150G, L227G, T231R, N233R, I255A, P256K, L259F	ND	0.10	5.20
14	S58A, V60S, 186V, K98I, E99K, D102A, T143S, A150G, L227G, T231R, N233R, I255A, P256K	15	0.16	3.87
15	N33Q, S58A, V60S, I86V, T143S, A150G, L227G, T231 R, N233R,	394	0.09	6.55

ES 2 603 979 T3

	I255A, P256K			
16	E1* +S58A +V60S +I86V +K98I +E99K, T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K	129	0.23	3.02
17	E1N +S58A +V60S +I86V +K98I +E99K +T143S +A150G+S216P+L227G+T231R+N233R +I255A +P256K	123	0.22	3.17
18	D27N +S58A +V60S +I86V +G91 N +N94R +D111N +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K	946	0.25	2.70
19	E1N +S58A +V60S +I86V +K98I +E99K +T143S +A150G +E210A +S216P +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K	127	0.28	2.83
20	A150G +E210V +T231 R +N233R +I255A +P256K	666	0.45	1.99
21	I202L +E210G +T231R +N233R +I255A +P256K	1062	0.37	2.33
22	E1N +A18K +V60K +I86V +A150G +E210A +L227G +T231 R +N233R +P256K	107	0.30	2.6
23	E1L +D27K +V60K +I86V +A150G +S216P +L227G +T231 R +N233R +P256K	488	0.22	2.8
24	E1N +S58A +V60S +S83T +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K	98	0.15	2.4
25	E1N +S58T +V60K +I86V +D102A +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K	144	0.28	2.3
26	E1N +S58A +V60S +I86V +K98I +E99K +D102A +T143S +A150G +S216P +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K	14	0.31	2.1
27	S58A +V60S +S83T +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K	280	0.18	1.9

Listado de secuencias

[0085]

5

<110> Novozymes A/S
Novozymes A/S
Vind, Jesper
Knötzel, Jürgen C. F.

10

Borch, Kim
Svendsen, Allan
Callisen, Thomas H
Yaver, Debbie
Bjørnvad, Mads

15

Hansen, Peter K

<120> POLIPÉPTIDOS CON ACTIVIDAD LIPÁSICA Y POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN LOS MISMOS

20

<130> 11180.000

<160> 16

25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 873

<212> ADN

<213> Thermomyces lanuginosus

30

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(873)

35

<220>

<221> sig_péptido

ES 2 603 979 T3

```

<222> (1)..(51)

<220>
<221> propep
5 <222> (52)..(66)

<220>
<221> mat_péptido
<222> (67)..()
10

<400> 1
atg agg agc tcc ctt gtg ctg ttc ttt gtc tct gcg tgg acg gcc ttg      48
Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
          -20                    -15                    -10

15
gcc agt cct att cgt cga gag gtc tcg cag gat ctg ttt aac cag ttc      96
Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
      -5                    -1  1                    5                    10

20
aat ctc ttt gca cag tat tct gca gcc gca tac tgc gga aaa aac aat      144
Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
          15                    20                    25

25
gat gcc cca gct ggt aca aac att acg tgc acg gga aat gcc tgc ccc      192
Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
          30                    35                    40

30
gag gta gag aag gcg gat gca acg ttt ctc tac tcg ttt gaa gac tct      240
Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser
          45                    50                    55

35
gga gtg ggc gat gtc acc ggc ttc ctt gct ctc gac aac acg aac aaa      288
Gly Val Gly Asp Val Thr Gly Phe Leu Ala Leu Asp Asn Thr Asn Lys
          60                    65                    70

40
ttg atc gtc ctc tct ttc cgt ggc tct cgt tcc ata gag aac tgg atc      336
Leu Ile Val Leu Ser Phe Arg Gly Ser Arg Ser Ile Glu Asn Trp Ile
      75                    80                    85                    90

45
ggg aat ctt aac ttc gac ttg aaa gaa ata aat gac att tgc tcc ggc      384
Gly Asn Leu Asn Phe Asp Leu Lys Glu Ile Asn Asp Ile Cys Ser Gly
          95                    100                    105

50
tgc agg gga cat gac ggc ttc act tcg tcc tgg agg tct gta gcc gat      432
Cys Arg Gly His Asp Gly Phe Thr Ser Ser Trp Arg Ser Val Ala Asp
          110                    115                    120

55
acg tta agg cag aag gtg gag gat gct gtg agg gag cat ccc gac tat      480
Thr Leu Arg Gln Lys Val Glu Asp Ala Val Arg Glu His Pro Asp Tyr
          125                    130                    135

60
cgc gtg gtg ttt acc gga cat agc ttg ggt ggt gca ttg gca act gtt      528
Arg Val Val Phe Thr Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Leu Ala Thr Val
          140                    145                    150

```

ES 2 603 979 T3

gcc gga gca gac ctg cgt gga aat ggg tat gat atc gac gtg ttt tca 576
 Ala Gly Ala Asp Leu Arg Gly Asn Gly Tyr Asp Ile Asp Val Phe Ser
 155 160 165 170

5 tat ggc gcc ccc cga gtc gga aac agg gct ttt gca gaa ttc ctg acc 624
 Tyr Gly Ala Pro Arg Val Gly Asn Arg Ala Phe Ala Glu Phe Leu Thr
 175 180 185

10 gta cag acc ggc gga aca ctc tac cgc att acc cac acc aat gat att 672
 Val Gln Thr Gly Gly Thr Leu Tyr Arg Ile Thr His Thr Asn Asp Ile
 190 195 200

15 gtc cct aga ctc ccg ccg cgc gaa ttc ggt tac agc cat tct agc cca 720
 Val Pro Arg Leu Pro Pro Arg Glu Phe Gly Tyr Ser His Ser Ser Pro
 205 210 215

20 gag tac tgg atc aaa tct gga acc ctt gtc ccc gtc acc cga aac gat 768
 Glu Tyr Trp Ile Lys Ser Gly Thr Leu Val Pro Val Thr Arg Asn Asp
 220 225 230

atc gtg aag ata gaa ggc atc gat gcc acc ggc ggc aat aac cag cct 816
 Ile Val Lys Ile Glu Gly Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asn Gln Pro
 235 240 245 250

25 aac att ccg gat atc cct gcg cac cta tgg tac ttc ggg tta att ggg 864
 Asn Ile Pro Asp Ile Pro Ala His Leu Trp Tyr Phe Gly Leu Ile Gly
 255 260 265

30 aca tgt ctt 873
 Thr Cys Leu

35 <210> 2
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> Thermomyces lanuginosus

40 <400> 2
 Met Arg Ser Ser Leu Val Leu Phe Phe Val Ser Ala Trp Thr Ala Leu
 -20 -15 -10

45 Ala Ser Pro Ile Arg Arg Glu Val Ser Gln Asp Leu Phe Asn Gln Phe
 -5 -1 1 5 10

50 Asn Leu Phe Ala Gln Tyr Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Gly Lys Asn Asn
 15 20 25

55 Asp Ala Pro Ala Gly Thr Asn Ile Thr Cys Thr Gly Asn Ala Cys Pro
 30 35 40

Glu Val Glu Lys Ala Asp Ala Thr Phe Leu Tyr Ser Phe Glu Asp Ser

ES 2 603 979 T3

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

ES 2 603 979 T3

<210> 3
 5 <211> 265
 <212> PRT
 <213> Absidia reflexa

 <400> 3
 10 Ser Ser Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile
 1 5 10 15
 15 Lys Ala His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg
 20 25 30
 20 Thr Val Ile Pro Gly Gly Arg Trp Ser Cys Pro His Cys Gly Val Ala
 35 40 45
 25 Ser Asn Leu Gln Ile Thr Lys Thr Phe Ser Thr Leu Ile Thr Asp Thr
 50 55 60
 30 Asn Val Leu Val Ala Val Gly Glu Lys Glu Lys Thr Ile Tyr Val Val
 65 70 75 80
 35 Phe Arg Gly Thr Ser Ser Ile Arg Asn Ala Ile Ala Asp Ile Val Phe
 85 90 95
 40 Val Pro Val Asn Tyr Pro Pro Val Asn Gly Ala Lys Val His Lys Gly
 100 105 110
 45 Phe Leu Asp Ser Tyr Asn Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val
 115 120 125
 50 Lys Ala Gln Leu Asp Arg His Pro Gly Tyr Lys Ile Val Val Thr Gly
 130 135 140
 55 His Ser Leu Gly Gly Ala Thr Ala Val Leu Ser Ala Leu Asp Leu Tyr
 145 150 155 160
 60 His His Gly His Ala Asn Ile Glu Ile Tyr Thr Gln Gly Gln Pro Arg
 165 170 175
 65 Ile Gly Thr Pro Ala Phe Ala Asn Tyr Val Ile Gly Thr Lys Ile Pro
 180 185 190

ES 2 603 979 T3

Tyr Gln Arg Leu Val His Glu Arg Asp Ile Val Pro His Leu Pro Pro
 195 200 205
 5
 Gly Ala Phe Gly Phe Leu His Ala Gly Glu Glu Phe Trp Ile Met Lys
 210 215 220
 10 Asp Ser Ser Leu Arg Val Cys Pro Asn Gly Ile Glu Thr Asp Asn Cys
 225 230 235 240
 15 Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Val Ile Asp His Leu Ser Tyr
 245 250 255
 20 Leu Asp Met Asn Thr Gly Leu Cys Leu
 260 265
 <210> 4
 <211> 264
 <212> PRT
 25 <213> Absidia corymbifera
 <400> 4
 30 Ser Ser Ser Thr Gln Asp Tyr Arg Ile Ala Ser Glu Ala Glu Ile Lys
 1 5 10 15
 35 Ala His Thr Phe Tyr Thr Ala Leu Ser Ala Asn Ala Tyr Cys Arg Thr
 20 25 30
 40 Val Ile Pro Gly Gly Gln Trp Ser Cys Pro His Cys Asp Val Ala Pro
 35 40 45
 45 Asn Leu Asn Ile Thr Lys Thr Phe Thr Thr Leu Ile Thr Asp Thr Asn
 50 55 60
 50 Val Leu Val Ala Val Gly Glu Asn Glu Lys Thr Ile Tyr Val Val Phe
 65 70 75 80
 55 Arg Gly Thr Ser Ser Ile Arg Asn Ala Ile Ala Asp Ile Val Phe Val
 85 90 95
 60 Pro Val Asn Tyr Pro Pro Val Asn Gly Ala Lys Val His Lys Gly Phe
 100 105 110
 65 Leu Asp Ser Tyr Asn Glu Val Gln Asp Lys Leu Val Ala Glu Val Lys

ES 2 603 979 T3

	115		120		125														
5	Ala	Gln	Leu	Asp	Arg	His	Pro	Gly	Tyr	Lys	Ile	Val	Val	Thr	Gly	His			
	130						135					140							
10	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Thr	Ala	Val	Leu	Ser	Ala	Leu	Asp	Leu	Tyr	His			
	145					150					155					160			
15	His	Gly	His	Asp	Asn	Ile	Glu	Ile	Tyr	Thr	Gln	Gly	Gln	Pro	Arg	Ile			
					165					170					175				
20	Gly	Thr	Pro	Glu	Phe	Ala	Asn	Tyr	Val	Ile	Gly	Thr	Lys	Ile	Pro	Tyr			
				180					185					190					
25	Gln	Arg	Leu	Val	Asn	Glu	Arg	Asp	Ile	Val	Pro	His	Leu	Pro	Pro	Gly			
			195					200					205						
30	Ala	Phe	Gly	Phe	Leu	His	Ala	Gly	Glu	Glu	Phe	Trp	Ile	Met	Lys	Asp			
	210						215					220							
35	Ser	Ser	Leu	Arg	Val	Cys	Pro	Asn	Gly	Ile	Glu	Thr	Asp	Asn	Cys	Ser			
	225					230					235					240			
40	Asn	Ser	Ile	Val	Pro	Phe	Thr	Ser	Val	Ile	Asp	His	Leu	Ser	Tyr	Leu			
					245					250					255				
45	Asp	Met	Asn	Thr	Gly	Leu	Cys	Leu											
				260															
50	<210>	5																	
	<211>	269																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Rhizomucor miehei																	
55	<400>	5																	
	Ser	Ile	Asp	Gly	Gly	Ile	Arg	Ala	Ala	Thr	Ser	Gln	Glu	Ile	Asn	Glu			
	1				5					10					15				
60	Leu	Thr	Tyr	Tyr	Thr	Thr	Leu	Ser	Ala	Asn	Ser	Tyr	Cys	Arg	Thr	Val			
				20					25					30					
65	Ile	Pro	Gly	Ala	Thr	Trp	Asp	Cys	Ile	His	Cys	Asp	Ala	Thr	Glu	Asp			
			35					40					45						

ES 2 603 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 603 979 T3

<210> 6
 <211> 271
 <212> PRT
 5 <213> Rhizopus oryzae
 <400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 603 979 T3

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

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

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

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

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

20
<210> 7
<211> 267
<212> PRT
<213> Aspergillus niger

25
<400> 7

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

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

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

40 Tyr Asn Ser Gln Thr Asp Ile Asn Gly Trp Ile Leu Arg Asp Asp Ser
50 55 60

45 Ser Lys Glu Ile Ile Thr Val Phe Arg Gly Thr Gly Ser Asp Thr Asn
65 70 75 80

50 Leu Gln Leu Asp Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Pro Phe Asp Thr Leu Pro
85 90 95

Gln Cys Asn Gly Cys Glu Val His Gly Gly Tyr Tyr Ile Gly Trp Val
100 105 110

55 Ser Val Gln Asp Gln Val Glu Ser Leu Val Lys Gln Gln Val Ser Gln
115 120 125

ES 2 603 979 T3

5 Tyr Pro Asp Tyr Ala Leu Thr Val Thr Gly His Ser Leu Gly Ala Ser
130 135 140

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

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

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

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

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

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

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

45 Tyr Phe Gly Met Thr Ser Gly Ala Cys Thr Trp
260 265

50 <210> 8
<211> 266
<212> PRT
<213> Aspergillus tubingensis

55 <400> 8

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

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

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

ES 2 603 979 T3

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

ES 2 603 979 T3

<210> 9
 <211> 276
 <212> PRT
 5 <213> *Fusarium oxysporum*
 <400> 9

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

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

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

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

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

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

40 Glu Asp Cys Ser Leu Val Ser Gly Cys Gly Val His Ser Gly Phe Gln
 100 105 110

45 Arg Ala Trp Asn Glu Ile Ser Ser Gln Ala Thr Ala Ala Val Ala Ser
 115 120 125

50 Ala Arg Lys Ala Asn Pro Ser Phe Asn Val Ile Ser Thr Gly His Ser
 130 135 140

55 Leu Gly Gly Ala Val Ala Val Leu Ala Ala Ala Asn Leu Arg Val Gly
 145 150 155 160

60 Gly Thr Pro Val Asp Ile Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn
 165 170 175

65 Ala Gln Leu Ser Ala Phe Val Ser Asn Gln Ala Gly Gly Glu Tyr Arg
 180 185 190

70 Val Thr His Ala Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Leu Ile Phe

ES 2 603 979 T3

	195		200		205														
5	Gly	Tyr	Arg	His	Thr	Thr	Pro	Glu	Phe	Trp	Leu	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly			
	210						215					220							
10	Asp	Lys	Val	Asp	Tyr	Thr	Ile	Ser	Asp	Val	Lys	Val	Cys	Glu	Gly	Ala			
	225					230					235					240			
15	Ala	Asn	Leu	Gly	Cys	Asn	Gly	Gly	Thr	Leu	Gly	Leu	Asp	Ile	Ala	Ala			
					245					250					255				
20	His	Leu	His	Tyr	Phe	Gln	Ala	Thr	Asp	Ala	Cys	Asn	Ala	Gly	Gly	Phe			
				260					265					270					
25	Ser	Trp	Arg	Arg															
			275																
30	<210>	10																	
	<211>	273																	
	<212>	PRT																	
	<213>	Fusarium heterosporum																	
35	<400>	10																	
	Thr	Val	Thr	Thr	Gln	Asp	Leu	Ser	Asn	Phe	Arg	Phe	Tyr	Leu	Gln	His			
	1				5					10				15					
40	Ala	Asp	Ala	Ala	Tyr	Cys	Asn	Phe	Asn	Thr	Ala	Val	Gly	Lys	Pro	Val			
			20						25					30					
45	His	Cys	Ser	Ala	Gly	Asn	Cys	Pro	Asp	Ile	Glu	Lys	Asp	Ala	Ala	Ile			
			35					40					45						
50	Val	Val	Gly	Ser	Val	Val	Gly	Thr	Lys	Thr	Gly	Ile	Gly	Ala	Tyr	Val			
	50						55					60							
55	Ala	Thr	Asp	Asn	Ala	Arg	Lys	Glu	Ile	Val	Val	Ser	Val	Arg	Gly	Ser			
	65				70						75					80			
60	Ile	Asn	Val	Arg	Asn	Trp	Ile	Thr	Asn	Phe	Asn	Phe	Gly	Gln	Lys	Thr			
					85					90					95				
65	Cys	Asp	Leu	Val	Ala	Gly	Cys	Gly	Val	His	Thr	Gly	Phe	Leu	Asp	Ala			
				100					105					110					

ES 2 603 979 T3

Trp Glu Glu Val Ala Ala Asn Val Lys Ala Ala Val Ser Ala Ala Lys
 115 120 125

5
 Thr Ala Asn Pro Thr Phe Lys Phe Val Val Thr Gly His Ser Leu Gly
 130 135 140

10
 Gly Ala Val Ala Thr Ile Ala Ala Ala Tyr Leu Arg Lys Asp Gly Phe
 145 150 155 160

15
 Pro Phe Asp Leu Tyr Thr Tyr Gly Ser Pro Arg Val Gly Asn Asp Phe
 165 170 175

20
 Phe Ala Asn Phe Val Thr Gln Gln Thr Gly Ala Glu Tyr Arg Val Thr
 180 185 190

25
 His Gly Asp Asp Pro Val Pro Arg Leu Pro Pro Ile Val Phe Gly Tyr
 195 200 205

30
 Arg His Thr Ser Pro Glu Tyr Trp Leu Asn Gly Gly Pro Leu Asp Lys
 210 215 220

35
 Asp Tyr Thr Val Thr Glu Ile Lys Val Cys Glu Gly Ile Ala Asn Val
 225 230 235 240

40
 Met Cys Asn Gly Gly Thr Ile Gly Leu Asp Ile Leu Ala His Ile Thr
 245 250 255

45
 Tyr Phe Gln Ser Met Ala Thr Cys Ala Pro Ile Ala Ile Pro Trp Lys
 260 265 270

50
 Arg

55
 <210> 11
 <211> 278
 <212> PRT
 <213> Aspergillus oryzae

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

Ala Ala Ala Thr Tyr Cys Pro Asn Asn Tyr Val Ala Lys Asp Gly Glu

ES 2 603 979 T3

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

ES 2 603 979 T3

Phe His Ser His Val Trp Tyr Phe Ile His Ala Asp Ala Cys Lys Gly
 260 265 270
 5

 Pro Gly Leu Pro Leu Arg
 275
 10

 <210> 12
 <211> 278
 <212> PRT
 15 <213> Penicillium camemberti

 <400> 12

 Asp Val Ser Thr Ser Glu Leu Asp Gln Phe Glu Phe Trp Val Gln Tyr
 1 5 10 15
 20

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

 Lys Leu Ser Cys Ser Lys Gly Asn Cys Pro Glu Val Glu Ala Thr Gly
 35 40 45
 30

 Ala Thr Val Ser Tyr Asp Phe Ser Asp Ser Thr Ile Thr Asp Thr Ala
 50 55 60
 35

 Gly Tyr Ile Ala Val Asp His Thr Asn Ser Ala Val Val Leu Ala Phe
 65 70 75 80
 40

 Arg Gly Ser Tyr Ser Val Arg Asn Trp Val Ala Asp Ala Thr Phe Val
 85 90 95
 45

 His Thr Asn Pro Gly Leu Cys Asp Gly Cys Leu Ala Glu Leu Gly Phe
 100 105 110
 50

 Trp Ser Ser Trp Lys Leu Val Arg Asp Asp Ile Ile Lys Glu Leu Lys
 115 120 125
 55

 Glu Val Val Ala Gln Asn Pro Asn Tyr Glu Leu Val Val Val Gly His
 130 135 140
 60

 Ser Leu Gly Ala Ala Val Ala Thr Leu Ala Ala Thr Asp Leu Arg Gly
 145 150 155 160
 65

ES 2 603 979 T3

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

ES 2 603 979 T3

	65				70					75					80	
5	Arg	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Glu	Asn	Trp	Ile	Ala	Asn	Leu	Asp	Phe	Ile
					85					90					95	
10	Leu	Glu	Asp	Asn	Asp	Asp	Leu	Cys	Thr	Gly	Cys	Lys	Val	His	Thr	Gly
				100					105					110		
15	Phe	Trp	Lys	Ala	Trp	Glu	Ser	Ala	Ala	Asp	Glu	Leu	Thr	Ser	Lys	Ile
			115					120					125			
20	Lys	Ser	Ala	Met	Ser	Thr	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Leu	Tyr	Phe	Thr	Gly
		130					135					140				
25	His	Ser	Leu	Gly	Gly	Ala	Leu	Ala	Thr	Leu	Gly	Ala	Thr	Val	Leu	Arg
	145					150					155					160
30	Asn	Asp	Gly	Tyr	Ser	Val	Glu	Leu	Tyr	Thr	Tyr	Gly	Cys	Pro	Arg	Ile
					165					170					175	
35	Gly	Asn	Tyr	Ala	Leu	Ala	Glu	His	Ile	Thr	Ser	Gln	Gly	Ser	Gly	Ala
				180					185					190		
40	Asn	Phe	Arg	Val	Thr	His	Leu	Asn	Asp	Ile	Val	Pro	Arg	Val	Pro	Pro
			195					200					205			
45	Met	Asp	Phe	Gly	Phe	Ser	Gln	Pro	Ser	Pro	Glu	Tyr	Trp	Ile	Thr	Ser
		210					215					220				
50	Gly	Asn	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Ala	Ser	Asp	Ile	Glu	Val	Ile	Glu	Gly
	225					230				235					240	
55	Ile	Asn	Ser	Thr	Ala	Gly	Asn	Ala	Gly	Glu	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Leu
					245					250					255	
60	Ala	His	Leu	Trp	Tyr	Phe	Phe	Ala	Ile	Ser	Glu	Cys	Leu	Leu		
				260					265					270		
65	<210>	14														
70	<211>	270														
75	<212>	PRT														
80	<213>	Aspergillus niger														

ES 2 603 979 T3

<400> 14

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

ES 2 603 979 T3

5 Gly Thr Gly Ala Ser Val Thr Ala Ser Asp Ile Glu Leu Ile Glu Gly
 225 230 235 240
 Ile Asn Ser Thr Ala Gly Asn Ala Gly Glu Ala Thr Val Asp Val Leu
 245 250 255
 10 Ala His Leu Trp Tyr Phe Phe Ala Ile Ser Glu Cys Leu Leu
 260 265 270
 15 <210> 15
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> *Aspergillus oryzae*
 20 <400> 15
 Asp Val Ser Ser Ser Leu Leu Asn Asn Leu Asp Leu Phe Ala Gln Tyr
 1 5 10 15
 25 Ser Ala Ala Ala Tyr Cys Asp Glu Asn Leu Asn Ser Thr Gly Thr Lys
 20 25 30
 30 Leu Thr Cys Ser Val Gly Asn Cys Pro Leu Val Glu Ala Ala Ser Thr
 35 40 45
 35 Gln Ser Leu Asp Glu Phe Asn Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asn Pro Ala
 50 55 60
 40 Gly Tyr Leu Ala Ala Asp Glu Thr Asn Lys Leu Leu Val Leu Ser Phe
 65 70 75 80
 Arg Gly Ser Ala Asp Leu Ala Asn Trp Val Ala Asn Leu Asn Phe Gly
 85 90 95
 45 Leu Glu Asp Ala Ser Asp Leu Cys Ser Gly Cys Glu Val His Ser Gly
 100 105 110
 50 Phe Trp Lys Ala Trp Ser Glu Ile Ala Asp Thr Ile Thr Ser Lys Val
 115 120 125
 55 Glu Ser Ala Leu Ser Asp His Ser Asp Tyr Ser Leu Val Leu Thr Gly
 130 135 140

ES 2 603 979 T3

His Ser Tyr Gly Ala Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Thr Ala Leu Arg
 145 150 155 160
 5 Asn Ser Gly His Ser Val Glu Leu Tyr Asn Tyr Gly Gln Pro Arg Leu
 165 170 175
 10 Gly Asn Glu Ala Leu Ala Thr Tyr Ile Thr Asp Gln Asn Lys Gly Gly
 180 185 190
 15 Asn Tyr Arg Val Thr His Thr Asn Asp Ile Val Pro Lys Leu Pro Pro
 195 200 205
 20 Thr Leu Leu Gly Tyr His His Phe Ser Pro Glu Tyr Tyr Ile Ser Ser
 210 215 220
 25 Ala Asp Glu Ala Thr Val Thr Thr Thr Asp Val Thr Glu Val Thr Gly
 225 230 235 240
 30 Ile Asp Ala Thr Gly Gly Asn Asp Gly Thr Asp Gly Thr Ser Ile Asp
 245 250 255
 35 Ala His Arg Trp Tyr Phe Ile Tyr Ile Ser Glu Cys Ser
 260 265
 <210> 16
 <211> 251
 <212> PRT
 <213> Landerina penisapora
 <400> 16
 40 Pro Gln Asp Ala Tyr Thr Ala Ser His Ala Asp Leu Val Lys Tyr Ala
 1 5 10 15
 45 Thr Tyr Ala Gly Leu Ala Tyr Gln Thr Thr Asp Ala Trp Pro Ala Ser
 20 25 30
 50 Arg Thr Val Pro Lys Asp Thr Thr Leu Ile Ser Ser Phe Asp His Thr
 35 40 45
 55 Leu Lys Gly Ser Ser Gly Tyr Ile Ala Phe Asn Glu Pro Cys Lys Glu
 50 55 60
 60 Ile Ile Val Ala Tyr Arg Gly Thr Asp Ser Leu Ile Asp Trp Leu Thr

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido con actividad lipásica, que es al menos un 80 % idéntico a SEC ID N.º: 2 y es un polipéptido:

a) con al menos uno de:

i) una actividad lipásica (LU) relativa a la absorbancia a 280 nm (A280) inferior a 500 LU/A280, donde una unidad de LU (1 LU) se define como la cantidad de enzimas capaz de liberar 1 micro mol de ácido butírico por minuto a 30 °C a pH 7 y la absorbancia del polipéptido se mide a 280 nm;

ii) un riesgo de rendimiento de olor (R) inferior a 0.5, donde R se calcula como la proporción entre la cantidad de ácido butírico liberado a partir de una muestra lavada de polipéptido y la cantidad de ácido butírico liberado a partir de una muestra lavada de polipéptido de referencia, después de que ambos valores se han corregido en cuanto a la cantidad de ácido butírico liberado a partir de una muestra lavada no polipeptídica donde el polipéptido de referencia es la parte madura de SEC ID n.º: 2 con las sustituciones T231 R+N233R o

iii) un factor riesgo beneficio (BR) de al menos 1.8, donde BR se define como el rendimiento de lavado medio (RP_{avg}) dividido con el riesgo de rendimiento de olor (R) donde RP_{avg} indica el rendimiento relativo medio en comparación con el polipéptido de referencia de mediciones hechas a 0.5 mg ep/L; y

b) que comprende alteraciones de los aminoácidos en las posiciones T231 R +N233R +I255A +P256K y al menos uno de:

i) S58A +V60S +A150G +L227G; o

ii) E210V/G;

estas posiciones son correspondientes a SEC ID n.º: 2.

2. Polipéptido, según la reivindicación 1, que comprende además al menos una de la alteración del aminoácido en las posiciones I86V o T143S.

3. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, donde el polipéptido comprende al menos otra alteración seleccionada a partir de una sustitución, una delección o una adición de al menos un aminoácido en una posición que corresponde con la posición E1; D27; N33; S83; G91; N94; K98; E99; D102; D111; G163; I202; E210; S216; L259 o L269 de SEC ID N.º: 2.

4. Polipéptido, según la reivindicación 3, donde al menos una alteración se selecciona del grupo que consiste en: E1N*, D27N, N33Q, S83T, G91N, N94R, K98I, E99K, D102A, D111N, G163K, I202L, E210A, S216P, L259F o L269APIA de SEC ID n.º: 2.

5. Polipéptido, según la reivindicación 1, donde dicho polipéptido comprende alteraciones seleccionadas del grupo que consiste en:

a) T231 R +N233R +L269APIA;

b) S58T +V60K +A150G +T231 R +N2331 +D234G;

c) S58T +V60K + I86V + D102A + A150G + L227G + T231 R + N233R + P256K;

d) S58N +V60S +I86P +T231 R +N233R +P256S;

e) S58N +V60S +I86S +L227G +T231 R +N233R +P256S; y

f) S58N +V60S +I86T +L227G +T231 R +N233R +P256L.

6. Polipéptido, según la reivindicación 1, donde dicho polipéptido comprende alteraciones seleccionadas del grupo que consiste en:

a) S58A +V60S + I83T +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K;

b) S58A +V60S + I86V +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K;

c) S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K;

d) S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +G163K +S216P +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K;

e) E1* +S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K;

f) S58A +V60S + I86V +K981 +E99K +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K;

g) E1N +S58A +V60S + I86V +K981 +E99K +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K +L259F;

h) S58A +V60S + I86V +K981 +E99K +D102A +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K;

i) N33Q +S58A +V60S + I86V +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K;

j) E1* +S58A +V60S + I86V +K981 +E99K +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K;

k) E1N +S58A +V60S + I86V +K981 +E99K +T143S +A150G +S216P +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K;

l) D27N +S58A +V60S + I86V +G91N +N94R +D111N +T143S +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K;

m) E1N +S58A +V60S + I86V +K981 +E99K +T143S +A150G +E210A +S216P +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K;

n) A150G +E210V +T231 R +N233R +I255A +P256K;

o) I202L +E210G +T231R +N233R +I255A +P256K;

p) E1N +A18K +V60K +I86V +A150G +E210A +L227G +T231 R +N233R +P256K;

q) E1L +D27K +V60K +I86V +A150G +S216P +L227G +T231R +N233R +P256K;

- r) E1N +S58A +V60S +S83T +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K;
s) E1N +S58T +V60K +I86V +D102A +T143S +A150G +L227G +T231R +N233R +I255A +P256K;
t) E1N +S58A +V60S +I86V +K98I +E99K +D102A +T143S +A150G +S216P +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K; y
5 u) S58A +V60S +S83T +A150G +L227G +T231 R +N233R +I255A +P256K.

7. Polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde dicho polipéptido es un polipéptido fúngico o un polipéptido de levadura.

10 8. Polipéptido, según la reivindicación 6, donde el polipéptido de levadura se origina de géneros *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* o *Yarrowia*.

15 9. Polipéptido, según la reivindicación 7, donde el *Saccharomyces* es *Saccharomyces carlsbergensis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces diastaticus*, *Saccharomyces douglasii*, *Saccharomyces kluyveri*, *Saccharomyces norbensis* o *Saccharomyces oviformis*.

20 10. Polipéptido, según la reivindicación 6, donde el polipéptido es un polipéptido fúngico filamentoso originado de géneros *Acremonium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Cryptococcus*, *Filobasidium*, *Fusarium*, *Humicola*, *Magnaporthe*, *Mucor*, *Myceliophthora*, *Neocallimastix*, *Neurospora*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Piromyces*, *Schizofilum*, *Talaromyces*, *Teramoascus*, *Thielavia*, *Tolipocladium*, *Thermomyces* o *Trichoderma*.

25 11. Polipéptido, según la reivindicación 9, donde el polipéptido fúngico filamentoso es un *Aspergillus aculeatus*, *Aspergillus awamori*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus foetidus*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus turbigensis*, *Fusarium bactridioides*, *Fusarium cerealis*, *Fusarium crookwellense*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium graminum*, *Fusarium heterosporum*, *Fusarium negundi*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium reticulatum*, *Fusarium roseum*, *Fusarium sambucinum*, *Fusarium sarcochromum*, *Fusarium sporotrichioides*, *Fusarium sulphureum*, *Fusarium torulosum*, *Fusarium trichothecioides*, *Fusarium venenatum*, *Humicola insolens*, *Thermomyces lanuginosus* (sinónimo: *Humicola lanuginosa*), *Mucor miehei*, *Myceliophthora thermophila*, *Neurospora crassa*, *Penicillium purpurogenum*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma koningii*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* o polipéptido *Trichoderma viride*.

12. Polinucleótido aislado que codifica el polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

35 13. Constructo de ácidos nucleicos que comprende el polinucleótido, según la reivindicación 12, vinculado operacionalmente al menos a una secuencia de control que dirige la producción del polipéptido en un huésped de expresión.

14. Vector de expresión recombinante que comprende el constructo de ácidos nucleicos, según la reivindicación 13.

40 15. Célula huésped transformada que comprende el constructo de ácidos nucleicos, según la reivindicación 13, o el vector de expresión recombinante, según la reivindicación 14.

45 16. Método de la preparación del polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que incluye las etapas:
a) cultivo de la célula huésped transformada que comprende el constructo de ácido nucleico o el vector de expresión recombinante, que comprende el polipéptido bajo condiciones conductoras para la producción del polipéptido; y
b) recuperación del polipéptido.

50 17. Formulación que comprende el polipéptido, según cualquiera de las reivindicaciones 1-11.

18. Formulación, según la reivindicación 17, donde dicha formulación puede ser una formulación sólida o líquida.

55 19. Método de reducción de la formación de ácidos grasos de cadena corta generadores de olor durante la hidrólisis lipídica, utilizando los polipéptidos de las reivindicaciones 1-11.

ES 2 603 979 T3

```

ID n.º 1:  SSSSTQDYRIASEAEIKAHTFYTALSANA
ID n.º 2:  SSSTQDYRIASEAEIKAHTFYTALSANA
ID n.º 3:  SIDGGIRAATSQEINELTYTTLSANS
ID n.º 4:  SASDGGKVVAATTAQIQEFTKYAGIAATA
ID n.º 5:  TAGHALAASTQ GISEDLYSRL VEMATISQAA
ID n.º 6:  TAGHALAASTQ GISEDLYSRL VEMATISQAA
ID n.º 7:  AVGVTTTDFSNFKFYIQHGAAA
ID n.º 8:  TVTTQDLSNFRFYLOHADAA
ID n.º 9:  DIPTTQLEDFKFWVQYAAAT
ID n.º 10:  DVSTSELDQFEFVWQYAAAS
ID n.º 11:  SVSTSTLDELQLFAQWSAAA
ID n.º 12:  SVSTSTLDELQLFSQWSAAA
ID n.º 13:  DVSSLLNLDLFAQYSAAA
ID n.º 14:  EVSQDLFNQFNLFAQYSAAA
ID n.º 15:  PQDAYTASHADLVKYATYAGLA

ID n.º 1:  YCRTVIPG      GRWSCPHCGVAS  NLQITKTFST  LITDTNVLVAV
ID n.º 2:  YCRTVIPG      GQWSCPHCDVAP  NLNITKTFTT  LITDTNVLVAV
ID n.º 3:  YCRTVIPG      ATWDCIHCDATE  DLKIIKTWST  LIYDTNAMVAR
ID n.º 4:  YCRSVVPG      NKWDCVQCQKWVP  DGKIIITFTS  LLSDTNGYVLR
ID n.º 5:  YADLCNIPST                    IIKGEKIYNSQTDINGWILR
ID n.º 6:  YADLCNIPST                    IIKGEKIYNSQTDINGWILR
ID n.º 7:  YC  NSEAAA  GSKITCSNNGCPTVQNGATIVTSF  VGSKTGIGGYVAT
ID n.º 8:  YC  NFNTAV  GKPVHCSAGNCPDIEKDAAIVVGSV  VGTKTGIGAYVAT
ID n.º 9:  YCPNNYVAKD  GEKLNCSVGNCPDVEAAGSTVKLSFS  DDTITDTAGFVAV
ID n.º 10:  YYEADYTAQV  GDKLSCSKGNCPVEEATGATVSYDFS  DSTITDTAGYIAV
ID n.º 11:  YCSNNID SK  DSNLCTANACPSVEEASTTMLLEFDLTNDFGGTAGFLAA
ID n.º 12:  YCSNNID SD  DSNVCTADACPSVEEASTKMLLEFDLTNDFGGTAGFLAA
ID n.º 13:  YCDENLN ST  GTKLTCSVGNCPLVEAASTQSLDEFNESSSYGNPAGYLAA
ID n.º 14:  YCGKNNDAPA  GTNITCTGNACPEVEKADATFLYSFE  DSGVGDVGTGFLAL
ID n.º 15:  YQTTDAWPAS                    RTVPKDITLISSFD  HTLKGSSGYIAF

ID n.º 1:  GEKEKTIYVV  FRGTSSIRNA  IADIVFVPVN  YPPV  NGA  KVHKGFLDSY
ID n.º 2:  GENEKTIYVV  FRGTSSIRNA  IADIVFVPVN  YPPV  NGA  KVHKGFLDSY
ID n.º 3:  GDSEKTIYIV  FRGSSSIRNW  IADLTFVPVS  YPPV  SGT  KVHKGFLDSY
ID n.º 4:  SDKQKTIYLV  FRGTNSFRSA  ITDIVFNFS  YKPV  KGA  KVHAGFLSSY
ID n.º 5:  DDSSKEIITV  FRGTGSDTNL  QLDTNYTLTP  FDTLPQCNGC  EVHGGYYIGW
ID n.º 6:  DDSSKEIITV  FRGTGSDTNL  QLDTNYTLTP  FDTLPQCNSC  EVHGGYYIGW
ID n.º 7:  DSARKEIVVS  FRGSINIRNW  LTNLDFG  QE  DCSL  VSGC  GVHSGFQRAW
ID n.º 8:  DNARKEIVVS  VRGSINVRNW  ITNFNFG  QK  TCDL  VAGC  GVHTGFDAW
ID n.º 9:  DNTNKAIVVA  FRGSYSIRNW  VTDATEFP  QT  DPGL  CDGC  KAELGFWTAW
ID n.º 10:  DHTNSAVVLA  FRGSYSVRNW  VADATFV  HT  NPGL  CDGC  LAELGFWSSW
ID n.º 11:  DNTNKRLVVA  FRGSSTIENW  IANLDFILED  NDDL  CTGC  KVHTGFWKAW
ID n.º 12:  DNTNKRLVVA  FRGSSTIKNW  IADLDFILOD  NDDL  CTGC  KVHTGFWKAW
ID n.º 13:  DETNKLLVLS  FRGSADLANW  VANLNFGLED  ASDL  CSGC  EVHSGFWKAW
ID n.º 14:  DNTNKLIVLS  FRGSRSIENW  IGNLNFDLKE  INDI  CSGC  RGHDFGTSSW
ID n.º 15:  NEPCKEIIVA  YRGTDSLIDW  LTNLNFDKTA  WPAN  ISNS  LVHEGFLNAY

```

Figura 1

ES 2 603 979 T3

ID n.º 1: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHSL GGATAVLSALDLYHHGHA
 ID n.º 2: NEVQDKLVAE VKAQLDRHPG YKIVVTGHSL GGATAVLSALDLYHHGHD
 ID n.º 3: GEVQNELVAT VLDQFKQYPS YKVAVTGHSL GGATALLCALDLYQREEGLS
 ID n.º 4: EQVVNDYFPV VQEQLTAHPT YKVIVTGHSL GGAQALLAGMDLYQREPRLS
 ID n.º 5: VSVQDQVESL VKQQVSQYPD YALTVTGHSL GASLAALTAACL SATYD
 ID n.º 6: ISVQDQVESL VQQQVSQFPD YALTVTGHSL GASLAALTAACL SATYD
 ID n.º 7: NEISSQATAA VASARKANPS FNVISTGHSL GGAVAVLAAAANLRVGGT
 ID n.º 8: EEVAANVKAA VSAAKTANPT FKFVVTGHSL GGAVATIAAAAYLRKDFG
 ID n.º 9: KVVDRRIKT LDELKPEHSD YKIVVVGHSL GAAIASLAAAADLRTKNY
 ID n.º 10: KLVRDDIKE LKEVVAQNPN YELVVVGHSL GAAVATLAATDLRKGYP
 ID n.º 11: ESAADELTSK IKSAMSTYSG YTLYFTGHSL GGALATLGATVLRNDGY
 ID n.º 12: EAAADNLTSK IKSAMSTYSG YTLYFTGHSL GGALATLGATVLRNDGY
 ID n.º 13: SEIADTITSK VESALSDHSD YSLVLTGHSY GAALAAALATALRNSGH
 ID n.º 14: RSVADTLRQK VEDAVREHPD YRVVFTGHSL GGALATVAGADLRNGY
 ID n.º 15: LVSMQQVQEA VDSLLAKCPD ATISFTGHSL GGALACISMVDTAQRHRGI

ID n.º 1: NIEIYTQG QPRIGTPAFA NYVIGT KIPYQRLVHERDIVPHL
 ID n.º 2: NIEIYTQG QPRIGTPEFA NYVIGT KIPYQRLVNERDIVPHL
 ID n.º 3: SSNLFLYTQG QPRVGDPAFA NYVVST GIPYRRTVNERDIVPHL
 ID n.º 4: PKNLSIFTVG GPRVGNPTFA YYVEST GIPFQRTVHKRDIVPHV
 ID n.º 5: NIRLYTFG EPRSGNQAFA SYMNDAFQASSPDTTQYFRVTHANDGIPNL
 ID n.º 6: NIRLYTFG EPRS NQAFA SYMNDAFQASSPDTTQYFRVTHANDGIPNL
 ID n.º 7: PVDIYTYG SPRVGNAQLS AFVSNQ AGGEYRVTHADDPVPRL
 ID n.º 8: PFDLYTYG SPRVGNDFFA NFVTQQ TGAEYRVTHGDDVPVRL
 ID n.º 9: DAILYAYA APRVANKPLA EFITNQ GNNYRFTHNDPVPKL
 ID n.º 10: SAKLYAYA SPRVGNAALA KYITAQ GNNFRFTHTNDPVPKL
 ID n.º 11: SVELYTYG CPRIGNYALA EHITSQ GSGANFRVTHLNDIVPRV
 ID n.º 12: SVELYTYG CPRVGNYALA EHITSQ GSGANFPVTHLNDIVPRV
 ID n.º 13: SVELYNYG QPRLGNEALA TYITDQ NKGGNRVVTHTNDIVPVL
 ID n.º 14: DIDVFSYG APRVGNRAFA EFLTVQ TGGTLYRITHTNDIVPVL
 ID n.º 15: KMQMPTYG QPRTGNQAFA EYVENL GHPVFRVVYRHDIVPRM

ID n.º 1: PPGAFGFLHA GEEFWIMK DSSLRVCNPIETDNCNSIV
 ID n.º 2: PPGAFGFLHA GEEFWIMK DSSLRVCNPIETDNCNSIV
 ID n.º 3: PPAAFGFLHA GEEYWITD NSPETVQVCTSDLETSDCNSIV
 ID n.º 4: PPQSGFGLHP GVESWIKS GTSNVQICTSEIETKDCNSIV
 ID n.º 5: PPVEQGYAHG GVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCCE AQGGQG
 ID n.º 6: PPADEGYAHG VVEYWSV DPYSAQNTFVCTGDEVQCCE AQGGQG
 ID n.º 7: PPLIFGYRHT TPEFWLSGGGDKVDYITISDVKVCEGAANLG CNGGTL
 ID n.º 8: PPIVFGYRHT SPEYWLNG GPLDKDYTVTEIKVCEGIANVM CNGGTI
 ID n.º 9: PLLTMGYVHI SPEYYITA PDNTTVTDNQVTVLDGYVNFK GNTGTS
 ID n.º 10: PLLSMGYVHV SPEYWITS PNNATVSTSDIKVIDGDVSFD GNTGTG
 ID n.º 11: PPMDFGFSQP SPEYWITS GNGASVTASDIEVIEGINSTA GNAGEA
 ID n.º 12: PPMDFGFSQP SPEYWITS GTGASVTASDIEVIEGINSTA GNAGEA
 ID n.º 13: PPTLLGYHHF SPEYYISS ADEATVTTTDVTEVTGIDATG GNDGTD
 ID n.º 14: PPREFGYSHS SPEYWIKS GTLVPVTRNDIVKIEGIDATG GNNQPN
 ID n.º 15: PPMDLGFQHH GQEVWYEG DENIKFCKGEGENLTCELGVP

ID n.º 1: PFT SVIDHLSYLDNMNTGL CL
 ID n.º 2: PFT SVIDHLSYLDNMNTGL CL
 ID n.º 3: PFT SVLDHLSYFGINTGL CT
 ID n.º 4: PFT SILDHLSYFDINEGS CL
 ID n.º 5: VN NAHTTYF GMTSGACTW
 ID n.º 6: VN NAHTTYF GMTSGHCTW

Figura 1 (cont.)

ID n.º 7: GL DIAAHLHYF QATDA CNAGGFSWR R
 ID n.º 8: GL DILAHITYF QSMAT CAPIAIPWK R
 ID n.º 9: GGLPDLLAFHSHVWYFIHADACKGPGPLR
 ID n.º 10: LPLLTDFEAHIWYF VQVDA GKGPGLPFK R
 ID n.º 11: TV SVLAHLWYF FAISE CLL
 ID n.º 12: TV DVLAHLWYF FAISE CLL
 ID n.º 13: GT SIDAHRWYF IYISE CS
 ID n.º 14: IP DIPAHLWYF GLIGT CL
 ID n.º 15: FSEL NAKDHSEYP GMH

ID n.º:	Microorganismo	SEQ ID n.º:
1.	<i>Absidia reflexa</i>	3
2.	<i>Absidia corymbifera</i>	4
3.	<i>Rhizomucor miehei</i>	5
4.	<i>Rhizopus delemar (oryzea)</i>	6
5.	<i>Aspergillus niger</i>	7
6.	<i>Aspergillus tubingensis</i>	8
7.	<i>Fusarium oxysporum</i>	9
8.	<i>Fusarium heterosporum</i>	10
9.	<i>Aspergillus oryzae</i>	11
10.	<i>Penicilium camembertii</i>	12
11.	<i>Aspergillus foetidus</i>	13
12.	<i>Aspergillus niger</i>	14
13.	<i>Aspergillus oryzae</i>	15
14.	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	2
15.	<i>Landerina penisapora</i>	16

Figura 1. Alineamiento de secuencias de lipasa.

Figura 1 (cont.)