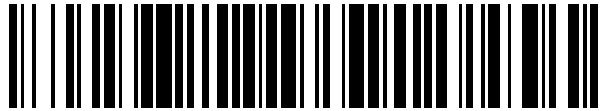


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 399 341**

51 Int. Cl.:

C12N 9/28 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2005 E 05785569 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.11.2012 EP 1794291**

54 Título: **Método para preparar un producto a base de masa**

30 Prioridad:

24.09.2004 DK 200401458

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

27.03.2013

73 Titular/es:

**NOVOZYMES A/S (100.0%)
KROGSHOEJVEJ 36
2880 BAGSVAERD, DK**

72 Inventor/es:

**BEIER, LARS;
FRIIS, ESBEN, PETER y
LUNDKVIST, HENRIK**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 399 341 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

Método para preparar un producto a base de masa

5 LISTADO DE SECUENCIAS Y MICROORGANISMOS DEPOSITADOS

Listado de secuencias

[0001] La presente invención comprende un listado de secuencias.

10

Depósito de material biológico

[0002] Ninguno.

15 Campo de la invención

[0003] La presente invención se refiere al uso de amilasas de antiendurecimiento en la preparación de masa o productos comestibles a base de masa con un alto contenido en sacarosa.

20 Antecedentes de la invención

[0004] La US 3026205 describe un proceso de producción de dulces horneados y los productos resultantes de los mismos por alfa-amilasa.

25 [0005] La WO 9104669 describe el uso de una alfa-amilasa maltogénica para retardar el endurecimiento de los productos horneados tales como pan; la alfa-amilasa maltogénica descrita en ésta está comercialmente disponible bajo el nombre comercial de Novamyl® (producto de Novozymes A/S). La US 6162628 describe variantes de Novamyl y su uso para el mismo fin. Conforti et al: (J. Food Quality, Food and Nutrition, 1998, 21: 85-94) y Sternhagen et al: (Cereal Chemistry, 1994, 71; 560-563) divulgan el uso de alfa-amilasas bacterianas en masa con alto contenido en azúcar. Rosell et al: (J Agric Food Chem, 2001, 49; 2973-2977) divulga que Novamyl 1500 MG es seriamente inhibido por la sacarosa.

30

[0006] Las estructuras tridimensionales de Novamyl se publican en la US 6162628 y en el Protein Data Bank (banco de datos de proteínas, disponible en <http://www.rcsb.org/pdb/>) con identificadores 1QHO y 1QHP.

35

Resumen de la invención

[0007] Los inventores han encontrado que una masa con alto contenido en sacarosa (tal como una masa de pastel) tiende a inhibir la actividad de unas amilasas de antiendurecimiento tales como Novamyl, haciéndolas menos eficaces para prevenir el endurecimiento de productos a base de masa con alto contenido en sacarosa, tales como pasteles. Han encontrado que un buen efecto de antiendurecimiento en pasteles se puede conseguir usando una amilasa antiendurecimiento cuidadosamente seleccionada con propiedades determinadas y han identificado tales amilasas.

40

[0008] Analizando una estructura 3D de Novamyl, los inventores además encontraron que la sacarosa puede inhibir por unión en el sitio activo. Han encontrado que la sacarosa se acopla en el sitio activo de Novamyl diferentemente del sustrato o inhibidor en modelos publicados 1QHO y 1 QHP, y han usado este hallazgo para diseñar variantes tolerantes a la sacarosa.

45

[0009] Por consiguiente, la invención proporciona un método de preparación de masa o de un producto comestible a base de masa (p. ej. un producto horneado) añadiendo una amilasa antiendurecimiento tolerante a la sacarosa.

50

Descripción detallada de la invención

Alfa-amilasa maltogénica y acoplamiento de sacarosa

55

[0010] Una alfa-amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133) con más del 70 % de identidad (particularmente más del 80 % o 90%, tal como al menos 95% o 96% o 97% o 98% o 99%) con la secuencia de Novamyl mostrada como SEQ ID n°: 1 se puede utilizar como enzima parental para diseñar variantes tolerantes a la sacarosa. La identidad de aminoácido se puede calcular como se describe en la US 6162628.

60

[0011] Para Novamyl (SEQ ID n°: 1), se puede utilizar una estructura 3D que incluya un sustrato o inhibidor como se describe en la US 6162628 o en el *Protein Data Bank* con el identificador 1QHO o 1 QHP. Alternativamente, se puede utilizar una variante de Novamyl, tal como una variante descrita en la US 6162628 o en esta especificación, por ejemplo la variante F188L +D261 G +T288P. Un estructura 3D de una variante se puede desarrollar a partir de la estructura de Novamyl por métodos conocidos, por ejemplo como se describe en T.L. Blundell et al., Nature, vol. 326, p. 347 ff (26 March 1987); J. Greer, Proteins: Structure, Function and Genetics, 7:317-334 (1990); o el ejemplo 1 de WO 9623874.

65

[0012] Los inventores encontraron que la sacarosa puede inhibir Novamyl por unión en el sitio activo. El acoplamiento de sacarosa en el sitio activo de Novamyl (usando el software versión GOLD 2.1.2, Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road, Cambridge, CB2 1EZ, Reino Unido y la parte de proteína de la estructura de rayos X 1QHO.pdb) revela una configuración de enlace específico como único para sacarosa. Las coordenadas cartesianas para los átomos de sacarosa en esta configuración de unión, utilizando el sistema de coordenadas de la estructura de rayos X 1QHO.pdb se dan en la Fig. 1.

Ensayo de alfa-amilasa maltogénica

[0013] La actividad de una alfa-amilasa maltogénica se puede determinar usando un ensayo de actividad tal como el método MANU. Un MANU (Maltogenic Amylase Novo Unit, Novo Unidad de Amilasa Maltogénica) se define como la cantidad de enzima requerida para liberar un micromol de maltosa por minuto en una concentración de 10 mg de sustrato de maltotriosa por ml en 0,1 M de tampón de citrato en pH 5,0, 37°C durante 30 minutos.

Alteraciones de aminoácidos

[0014] La secuencia de aminoácidos de una alfa-amilasa maltogénica se puede alterar para reducir la inhibición de sacarosa. Los inventores encontraron que la alteración se pueden hacer en un residuo de aminoácidos con al menos un átomo dentro de 4 Angstroms de cualquiera de los átomos de sacarosa cuando la molécula de sacarosa se acopla en la estructura 3D de la alfa-amilasa maltogénica. Usando la estructura de Novamyl 1QHO y el acoplamiento de sacarosa en la figura 1, los siguientes residuos de Novamyl están dentro de 4 Å: K44; N86; Y89; H90; Y92; W93; F188; T189; D190; P191; A192; F194; D372; P373; R376.

[0015] Además, las siguientes posiciones se han identificado como importantes: I15; R81; T87; G88; L196; N371 o N375 de SEQ ID n°: 1.

[0016] La alteración puede ser una sustitución o deleción de uno o varios de los residuos seleccionados, o uno o más residuos (particularmente 1-4 residuos o 5-6 residuos) se pueden insertar adyacentes a un residuo seleccionado.

[0017] La sustitución puede ser con un residuo mayor o menor. Una sustitución para aumentar el tamaño del residuo puede disminuir el espacio obtenido por la molécula de sacarosa acoplada previniendo así la unión de sacarosa. Los residuos de aminoácidos se clasifican de la siguiente manera de menor a mayor: (un signo igual indica residuos con tamaños que son prácticamente indistinguibles):

G < A=S=C < V=T < P < L=I=N=D=M < E=Q < K < H < R < F < Y < W

[0018] La sustitución puede también ser tal como eliminar contactos con la molécula de sacarosa, en particular por movimiento o deleción de sitios potenciales de unión de hidrógeno o interacciones de Van der Waals.

[0019] La sustitución puede ser particularmente con otro residuo del mismo tipo donde el tipo es negativo, positivo, hidrofóbico o hidrofílico. Los residuos negativos son D,E, los residuos positivos son K/R, los residuos hidrofóbicos son A,C,F,G,I,L,M,P,V,W,Y, y los residuos hidrofílicos son H,N,Q,S,T.

[0020] Algunos ejemplos particulares de sustituciones son I15T/S/V/L, R18K, K44R/S/T/Q/N, N86Q/S/T, T87N/Q/S, G88A/S/T, Y89W/F/H, H90W/F/Y/R/K/N/Q/M, W93Y/F/M/E/G/V/T/S, F188H/L/I/T/G/V, D190E/Q/G, A192S/T, F194S/L/Y, L196F, N371 K/R/F/Y/Q, D372E/Q/S/T/A y N375S/T/D/E/Q.

[0021] Ejemplos de deleciones son la deleción del residuo 191 o 192. Un ejemplo de una inserción es Ala insertada entre 192 y 193.

[0022] El polipéptido puede incluir otras alteraciones en comparación con Novamyl (SEQ ID n°: 1), por ejemplo alteraciones para aumentar la termoestabilidad, como se describe en la US 6162628.

Nomenclatura para alteraciones de aminoácidos

[0023] En esta especificación, se describe una sustitución de aminoácidos usando códigos de una sola letra, por ejemplo K44R. Las barras se utilizan para indicar alternativas, por ejemplo K44R/S/T/Q/N para indicar la sustitución de K44 con R o S, etc. P191* indica una deleción de P191. *192aA indica la inserción de una Ala después de A192. Las comas se utilizan para indicar alteraciones múltiples en la secuencia, por ejemplo F188L, D261G, T288P para indicar una variante con tres sustituciones.

Propiedades de amilasa antiendurecimiento para su uso con sacarosa

[0024] La amilasa para el uso en la masa con alto contenido en sacarosa se puede seleccionar para que tenga principalmente actividad de exo-amilasa. Más específicamente, la amilasa hidroliza la amilosa de modo que el peso

molecular medio de la amilosa después de 0,4-4 % de hidrólisis es más del 50 % (particularmente más del 75 %) del peso molecular antes de la hidrólisis.

[0025] Así, la amilasa puede hidrolizar amilosa (p. ej. amilosa de trigo o amilosa sintética) de modo que el peso molecular medio de la amilosa después de 0,4-4 % de hidrólisis (es decir, entre 0,4-4 % de hidrólisis del número total de enlaces) es más del 50 % (particularmente más del 75 %) del valor antes de la hidrólisis. La hidrólisis se puede conducir en un 1,7 % de solución de amilosa por peso en condiciones adecuadas (p. ej. 10 minutos a 60°C, pH 5,5), y la distribución de peso molecular antes y después de la hidrólisis se puede determinar por HPLC. La prueba se puede realizar como se describe en C. Christophersen et al., Starch 50 (1), 39-45 (1998).

[0026] Una exo-amilasa para el uso en masas con alto contenido en sacarosa puede tener un tolerancia al azúcar específica. En comparación con su actividad en ausencia de sacarosa, la amilasa puede tener más del 20 % de actividad con 10 % de azúcar, más del 10 % de actividad con 20 % de sacarosa o más del 4 % de actividad con 40 % de sacarosa. La tolerancia al azúcar se puede determinar como se describe en los ejemplos.

[0027] La exo-amilasa puede tener actividad óptima en el rango de pH 4,5-8,5. Puede tener suficiente termoestabilidad para retener al menos 20 % (particularmente al menos 40 %) de actividad después de 30 minutos de incubación a 85°C en pH 5,7 (50 mM Na-acetato, 1 mM CaCl₂) sin sustrato.

[0028] La exo-amilasa se puede adicionar a la masa en una cantidad correspondiente a 1-100 mg de proteína enzimática por kg de harina, particularmente 5-50 mg por kg.

[0029] La exo-amilasa puede ser no liquificante. Esto se puede determinar dejando actuar la exo-amilasa en un 1% de solución de almidón de trigo hasta que la reacción se complete, es decir, la adición de enzimas frescas no causa más degradación, y analizando los productos reactivos, por ejemplo por HPLC. Las condiciones de reacción típicas son, por ejemplo, 0,01 mg de enzima por ml de solución de almidón durante 48 horas. La exo-amilasa se considera no liquificante si la cantidad de almidón residual después de la reacción es al menos 20 % de la cantidad inicial de almidón.

[0030] La exo-amilasa puede tener actividad de alfa-amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133). La exo-amilasa puede ser la amilasa descrita en DK PA 2004 00021 o puede ser una variante de Novamyl descrita en esta especificación.

Masa y producto comestible a base de masa

[0031] La masa puede tener un contenido de sacarosa por encima del 10% en peso, particularmente por encima del 20% o 30%, por ejemplo 30-40%. El contenido de harina es típicamente 25-35% en peso de los ingredientes totales. La masa puede estar hecha con una receta de pastel convencional, típicamente con harina de pastel, azúcar, grasa/aceite y huevos como ingredientes principales. Puede incluir otros ingredientes convencionales tales como emulsionantes, humectantes, gomas, almidón y levadura. Contiene generalmente ingredientes tales como harina de trigo blando, leche u otros líquidos, azúcar, huevos, leudantes químicos, extractos de sabor y especias, al igual que otros que pueden o no incluir grasa vegetal.

[0032] La masa se trata generalmente con calor, por ejemplo por horneado o fritura para preparar un producto comestible, tal como pasteles, incluyendo pastel de libra, pasteles de estrato blanco y amarillo, pasteles con chocolate y productos a base de cacao, pasteles de esponja, pasteles comida de ángel, pasteles de fruta y pasteles tipo espuma y donuts.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Tolerancia a la sacarosa de las variantes de Novamyl

[0033] La actividad amilasa de varios polipéptidos fue evaluada por incubación con comprimidos de Phadebas (producto de Pharmacia®) durante 15 minutos a 60°C en presencia de sacarosa en varias concentraciones (en % por peso). Los resultados se expresan en % del resultado sin azúcar:

Alteraciones en comparación con SEQ ID n°: 1	0 % sacarosa	10 % sacarosa	20 % sacarosa	40 % sacarosa
Ninguna	100	13	6	1,5
F188L,D261G,T288P	100	27,5	14,5	6
F194S	100	31,5	18,5	7,5
L196F	100	69	42	23
D190G	100	65	43	21

Ejemplo 2: Tolerancia a la sacarosa de las variantes de Novamyl

[0034] Un número de polipéptidos fueron evaluados como en el ejemplo 1. Los resultados se expresan como actividad con 10 % de sacarosa en % de la actividad sin sacarosa:

5

Alteraciones en comparación con SEQ ID n°: 1	Tolerancia al azúcar
Ninguna	15
D261G,T288P	24
F188L,D261 G,T288P	35
T288P	56
Y89F,D261G,T288P	42
N86V, F188L,D261 G,T288P	37
Y89F,F188L,D261 G,T288P	38
Y89H,F188L,D261 G,T288P	50
N86T, F188L,D261G,T288P	49
F194S,D261G,T288P	47
L196F	65
D261G,T288P,D372V	62
Q184H,N187D,F194Y	47
D190G	66
N86G,Y89M, F188L,D261G,T288P	47
F188L,D190G,D261G,T288P	68
A192Q,D261 G,T288P,S446A	46
F188H	49
P191*	42
A192*	51
A192*,G193*	67
*192aA	44
N86K,F252L,D261 G,T288P	49
F194Y,L225S,D261 G,T288P	49
F194L,D261 G,T288P	54
F194S,D261 G,T288P,P642Q	60
D261G,T288P,N375S	58
F188T	37
F188G	36
F188V	41
A192R,F194L,D261G,T288P,G469R	60
A192G,D261G,T288P	41
Y89F,D261G,T288P,1290V,N375S	60

[0035] Las siguientes variantes también se consideran de interés en el contexto de la presente invención:

Alteraciones en comparación con SEQ ID n°: 1
I15T, N86K, P191S, D261G, T288P
I15T, P191 S, D261G, T288P
I15T, P191S, Y258F, D261 G, T288P, N375S, Y549C, Q648H
I15T, G153R, P191S, D261 G, T288P, N371K, K645R

Ejemplo 3: tolerancia a la sacarosa y termoestabilidad de amilasas

5 [0036] Las siguientes amilasas fueron evaluadas para termoestabilidad y tolerancia al azúcar: alfa-amilasa bacteriana de *B. amyloliquefaciens* (BAN™, producto de Novozymes A/S), alfa-amilasa fúngica de *A. oryzae* (Fungamyl®), producto de Novozymes A/S), alfa-amilasa maltogénica con la secuencia de SEQ ID n°: 1 (Novamyl®, producto de Novozymes A/S), una variante de Novamyl con SEQ ID n°: 1 con las sustituciones F188L +D261 G +T288P y alfa-amilasa bacteriana de *B. licheniformis* (Termamyl®, producto de Novozymes A/S).

10 Actividad de exo-amilasa

15 [0037] Las cinco amilasas fueron evaluadas para actividad de exo-amilasa como se ha descrito anteriormente. Los resultados muestran que Novamyl y la variante de Novamyl tuvieron actividad de exo-amilasa mediante esta prueba y las otras tres no.

Termoestabilidad

20 [0038] Cada amilasa se incubó a 85°C en pH 5,7 (50 mM Na-acetato, 1 mM CaCl₂) sin sustrato y la actividad amilasa se midió después de 0, 15, 30 y 60 minutos de tratamiento térmico. Los resultados se expresan como actividad residual en % de la actividad inicial:

	0	15	30	60
BAN	100	3	1	0
Fungamyl	100	0	0	0
Novamyl	100	51	29	13
Variante de Novamyl	100	64	48	54
Termamyl	100	100	71	85

25 [0039] Los resultados muestran que la variante de Novamyl y Termamyl no se desactivaron por el tratamiento térmico. BAN y Fungamyl pierden toda su actividad después de 15 min mientras que Novamyl la pierde gradualmente con el tiempo de tratamiento térmico.

Tolerancia a la sacarosa

30 [0040] El experimento se repitió en 10 % de solución de sacarosa.

Los resultados se expresan como actividad residual en % de la actividad inicial sin sacarosa:

	0	15	30	60
BAN	93	2	1	0
Fungamyl	31	0	0	0
Novamyl	7	6	1	3
Variante de Novamyl	21	19	14	16
Termamyl	116	112	97	82

35 [0041] Los resultados muestran que BAN y Termamyl no fueron inhibidos por el azúcar mientras que Fungamyl y la variante de Novamyl fueron un tanto inhibidos y Novamyl fue fuertemente inhibido por el azúcar. La combinación de

azúcar y tratamiento de calor muestra que la variante de Novamyl y Termamyl podrían ser activos durante la cocción de pasteles. Termamyl y la variante de Novamyl cumplen el criterio de termoestabilidad y tolerancia al azúcar utilizado en esta invención.

5 **Ejemplo 4: preparación de pasteles de esponja con amilasa**

[0042] Se hicieron pasteles de esponja con adición de amilasa de la siguiente manera: BAN (0,83, 8,3 o 83 mg/kg harina), Novamyl (1,3 o 13 mg/kg harina) o la variante de Novamyl usada en el ejemplo 1 (1,10 o 100 mg/kg harina). Se hizo un pastel de control sin amilasa.

10

[0043] Los pasteles se hornearon según el método de pastel de sándwich de esponja de alta proporción (HRSSC, por su sigla en inglés). Después de la cocción, los pasteles se enfriaron durante 60-120 minutos, y los pasteles se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas plásticas selladas llenas de nitrógeno hasta su análisis. Los pasteles se evaluaron los días 1, 3, 7 o 23.

15

[0044] Se realizó el análisis de perfil de textura (TPA, por su sigla en inglés) como se describe en Bourne M. C. (2002) 2. ed., Food Texture and Viscosity: Concept and Measurement. Academy Press. Los resultados mostraron que el aumento en la dureza era más lento al incrementar la dosificación de la variante de Novamyl. La adición de BAN o Novamyl tuvo sólo un ligero efecto y sólo en la dosificación más alta.

20

[0045] La cohesión de los pasteles disminuyó con el tiempo de almacenamiento. La adición de la variante de Novamyl retrasó esta disminución. La adición de BAN o Novamyl tuvo un ligero efecto y sólo en la dosificación más alta.

25

[0046] La movilidad del agua se caracterizó por RMN de campo bajo. La adición de la variante de Novamyl y BAN aumentó la movilidad, indicando que las dos amilasas fueron capaces de mantener los pasteles más húmedos. Novamyl no tuvo prácticamente ningún efecto.

30

[0047] Una pequeña evaluación sensorial de blandura y humedad se realizó el día 13 en los 3 pasteles con la variante de Novamyl y el pastel de control. Los pasteles se evaluaron con respecto a tres parámetros: solidez, humedad y preferibilidad. El control fue el más firme, el más seco y el menos preferido. Cuanto mayor fue la dosificación de la variante de Novamyl, el pastel fue menos firme (más blando), más húmedo y gustó más.

35

[0048] Una evaluación sensorial de panel grande se realizó el día 13. Fue una prueba de comparación pareada en la que un pastel de control se comparó con el pastel con la variante de Novamyl en la dosificación más alta. A un panel de 30 miembros se le plantearon dos preguntas (1) ¿qué pastel es más húmedo? y (2) ¿qué pastel es más fresco?. Todos los miembros del panel estuvieron de acuerdo en que el pastel con la variante de Novamyl era más húmedo y más fresco. La preferencia fue significativa a un nivel de importancia por encima del 99.999 %.

40

[0049] Para resumir, los datos muestran que la variante de Novamyl tuvo propiedades de antiendurecimiento y fue capaz de mejorar la percepción de humedad y la humedad medida por RMN. Las otras dos amilasas tuvieron sólo un ligero efecto.

Ejemplo 5: pasteles de unidad de proporción alta

45

[0050] Se hicieron pasteles con adición de amilasa de la siguiente manera: BAN (0,83, 8,3 o 83 mg/kg harina) o la variante de Novamyl usada en el ejemplo 1 (1,10 o 100 mg/kg harina). Se hizo un pastel de control sin amilasa.

50

[0051] Los pasteles fueron horneados según el método de pastel de unidad de proporción alta (HRUC, por su sigla en inglés). Después de la cocción, los pasteles se enfriaron durante 60-120 minutos y los pasteles se almacenaron a temperatura ambiente en bolsas plásticas selladas llenas de nitrógeno hasta su análisis. Los pasteles se evaluaron los días 7, 20 y 34 por los mismos métodos que en el ejemplo precedente.

55

[0052] El aumento en la dureza fue más lento con la variante de Novamyl en la dosificación más alta. La adición de BAN al pastel dio como resultado un pastel de bajo volumen y pastoso que dio pobres resultados en las mediciones de dureza.

60

[0053] La adición de la variante de Novamyl retardó la reducción en la cohesión mientras que BAN no influyó nada en ésta.

[0054] La variante de Novamyl y BAN fueron capaces de mantener el pastel más húmedo que el control. Este aumento en la movilidad del agua libre podría parcialmente explicarse porque los pasteles con BAN y la variante de Novamyl pudieron retener el contenido de humedad.

65

[0055] Una pequeña evaluación sensorial en el día 34 mostró que el pastel con la variante de Novamyl en la dosificación más alta fue claramente mejor que el pastel de control; éste era más húmedo y menos quebradizo.

[0056] Sobre todo, hubo un efecto de antiendurecimiento de la variante de Novamyl en la dosificación más alta, similar al efecto en los pasteles de esponja del ejemplo precedente. El endurecimiento de los pasteles de HRUC fue más lento que el de los pasteles de esponja, pero siguió siendo evidente que la variante de Novamyl tuvo un efecto de antiendurecimiento. El efecto de antiendurecimiento se vio con análisis de textura, RMN y evaluación sensorial. BAN
5 mostró efectos de antiendurecimiento en el HRUC, pero fue sensible a la sobredosificación que dio como resultado el desplome del pastel y un pastel pastoso.

Ejemplo 6: pastel de esponja

[0057] Se hicieron pasteles de esponja con adición de la amilasa de DK PA 2004 00021 en dosificaciones 0,5, 1, 2,5 y
10 20 mg/kg harina y un pastel de control sin amilasa.

[0058] La textura y la RMN se midieron en los días 1, 7 y 13. La adición de la amilasa redujo el aumento de la solidez,
15 especialmente en las dosificaciones más altas. La amilasa también tuvo un efecto provechoso en la movilidad del agua, que se correlacionó con la humedad del pastel.

[0059] Una evaluación de clasificación sensorial ciega realizada el día 14 mostró una clasificación según la dosificación,
20 cuanto mayor fue la dosificación más húmedo y blando fue el pastel. El pastel más preferido fue el de dosificación más alta.

Ejemplo 7: procedimiento de cocción pastel de Tegral Allegro

Receta

[0060] Se utilizó la siguiente receta:

	%
Tegral Allegro mix*	100
Huevo entero pasteurizado	50
Mantequilla	50
Enzimas	Según la prueba. 0 o 25 mg/kg de harina
*comercialmente disponible de Puratos NV/SA, Groot-Bijgaarden, Bélgica	

Procedimiento

[0061] Los ingredientes se midieron en un bol de mezclas y se mezclaron usando un mezclador industrial (p. ej. Bjørn
30 AR 5 A Varimixer) con una velocidad de pala adecuada. Se vertieron 300 g de la masa en moldes. Los pasteles se hornean en un horno adecuado (p. ej. horno de piso Sveba Dahlin) durante 45 min. a 180 °C. Se dejaron enfriar los pasteles a temperatura ambiente durante 1 hora.

[0062] El volumen de los pasteles se determinó cuando los pasteles se hubieron enfriado utilizando el método de
35 desplazamiento de semilla de colza. Los pasteles se embalaron con nitrógeno en bolsas plásticas selladas y se almacenaron a temperatura ambiente hasta su análisis.

[0063] Los pasteles se evaluaron los días 1, 7 y 14, se usaron dos pasteles en cada ocasión.

[0064] La cohesión y la dureza de los pasteles se evaluó con un analizador de textura y la movilidad de agua se
40 caracterizó por RMN de campo bajo.

[0065] El análisis de perfil de textura (TPA) se realizó como se describe en Bourne M. C. (2002) 2. ed., Food Texture
45 and Viscosity: Concept and Measurement. Academic Press.

[0066] La movilidad del agua libre se determinó como describe P. L. Chen, Z. Long, R. Ruan and T. P. Labuza, Nuclear
50 Magnetic Resonance Studies of water Mobility in Bread during Storage. Lebensmittel Wissenschaft und Technologie 30, 178-183 (1997). La movilidad del agua libre se ha descrito en la bibliografía para correlacionarse con la humedad de la miga de pan.

Resultado

[0067] En comparación con los pasteles sin adición de enzimas, el volumen de los pasteles no se ve afectado por la
55 adición de la enzima de referencia (SEQ ID n°. 1) ni por la adición de variantes de ésta, es decir, los pasteles no se derrumbaron por la adición de enzima.

ES 2 399 341 T3

[0068] La cohesión de los pasteles disminuyó con el tiempo de almacenamiento. La adición de variantes de SEQ ID n°: 1 retardó esta disminución como se puede ver en la tabla 1.

5 Tabla 1: cambio en la cohesión [gs/g] con tiempo de almacenamiento de pasteles con 25 mg de enzima de proteína por kg de harina

Enzima	Día 1	Día 7	Día 14
Sin enzima	0,44	0,35	0,32
SEQ ID N°:1	0,43	0,38	0,36
F188L,D261 G,T288P	0,46	0,42	0,41
Y89F,D261G,T288P	0,45	0,43	0,39
N86G,Y89M, F188L,D261G,T288P	0,44	0,42	0,38
T288P	0,44	0,40	0,41
F194S,D261G,T288P	0,47	0,43	0,42
D261G,T288P,D372V	0,46	0,43	0,37
A192Q,D261 G,T288P,S446A	0,44	0,42	0,39
A192R,F194L,D261G,T288P,G469R	0,47	0,44	0,42
A192G,D261G,T288P	0,46	0,42	0,39
N86K,F252L,D261 G,T288P	0,45	0,41	0,39
F194L,D261 G,T288P	0,45	0,42	0,42
F194S,D261 G,T288P,P642Q	0,44	0,40	0,39
Y89F,D261G,T288P,I290V,N375S	0,43	0,42	0,40

10 [0069] La movilidad del agua libre está en relación con la percepción de humedad de la miga del pastel, se reduce con el tiempo. La adición de las variantes de Novamyl aumentó la movilidad en comparación con el control, indicando que las amilasas fueron capaces de mantener los pasteles más húmedos. Los resultados se catalogan en la tabla 2.

15 Tabla 2: cambio en la movilidad de agua libre [micros] con tiempo de almacenamiento de pasteles con 25 mg de enzima de proteína por kg harina

Enzima	Día 1	Día 7	Día 14
Sin enzima	7077	5111	4175
SEQ ID N°:1	6990	5460	4583
F188L,D261 G,T288P	7216	5624	4656
Y89F,D261G,T288P	7085	6044	5151
N86G,Y89M, F188L,D261G,T288P	7493	5349	5120
T288P	7458	5785	4858
F194S,D261G,T288P	7746	6373	5325
D261G,T288P,D372V	7417	5517	4525
A192Q,D261G,T288P,S446A	7357	5714	5041
A192R,F194L,D261G,T288P, G469R	7549	5536	sin datos
A192G,D261G,T288P	7546	5815	sin datos
N86K,F252L,D261 G,T288P	7349	5295	4775
F194L,D261 G,T288P	7773	6803	5750
F194S,D261 G,T288P,P642Q	8152	5969	4971
Y89F,D261G,T288P,I290V,N375S	7753	6175	4811

[0070] La dureza de los pasteles aumentó con el tiempo de almacenamiento. La adición de variantes de SEQ ID n°: 1 retardó este aumento en la dureza como se puede ver en la tabla 3.

ES 2 399 341 T3

Tabla 3: cambio en la dureza [g] con tiempo de almacenamiento de pasteles con 25 mg de enzima de proteína por kg harina

Enzima	Día 1	Día 7	Día 14
Sin enzima	647	1060	1408
SEQ ID No:1	677	997	1171
F188L,D261G,T288P	683	951	1167
Y89F,D261G,T288P	649	998	1160
N86G,Y89M, F188L,D261G,T288P	630	844	1194
T288P	719	1101	1098
F194S,D261G,T288P	672	943	1061
D261G,T288P,D372V	593	962	1344
A192Q,D261 G,T288P,S446A	680	931	1159
A192R,F194L,D261G,T288P,G469R	720	987	1209
A192G,D261G,T288P	707	1024	1102
N86K,F252L,D261 G,T288P	678	955	1248
F194L,D261G,T288P	648	895	1050
F194S,D261G,T288P,P642Q	674	1028	1316
Y89F,D261G,T288P,I290V,N375S	602	731	827

5

LISTADO DE SECUENCIAS

[0071]

10

<110> Novozymes A/S

<120> Variantes de alfa-amilasa maltogénica

15

<130> 10618.204-WO

<160> 1

<170> Versión de patentIn 3. 3

20

<210> 1

<211> 686

<212> PRT

<213> Bacillus stearothermophilus

25

<400> 1

ES 2 399 341 T3

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

ES 2 399 341 T3

Asp Asp Ala Thr Lys Gly Tyr Phe His His Asn Gly Asp Ile Ser Asn
 165 170 175

Trp Asp Asp Arg Tyr Glu Ala Gln Trp Lys Asn Phe Thr Asp Pro Ala
 180 185 190

Gly Phe Ser Leu Ala Asp Leu Ser Gln Glu Asn Gly Thr Ile Ala Gln
 195 200 205

Tyr Leu Thr Asp Ala Ala Val Gln Leu Val Ala His Gly Ala Asp Gly
 210 215 220

Leu Arg Ile Asp Ala Val Lys His Phe Asn Ser Gly Phe Ser Lys Ser
 225 230 235 240

Leu Ala Asp Lys Leu Tyr Gln Lys Lys Asp Ile Phe Leu Val Gly Glu
 245 250 255

Trp Tyr Gly Asp Asp Pro Gly Thr Ala Asn His Leu Glu Lys Val Arg
 260 265 270

Tyr Ala Asn Asn Ser Gly Val Asn Val Leu Asp Phe Asp Leu Asn Thr
 275 280 285

Val Ile Arg Asn Val Phe Gly Thr Phe Thr Gln Thr Met Tyr Asp Leu
 290 295 300

Asn Asn Met Val Asn Gln Thr Gly Asn Glu Tyr Lys Tyr Lys Glu Asn
 305 310 315 320

Leu Ile Thr Phe Ile Asp Asn His Asp Met Ser Arg Phe Leu Ser Val
 325 330 335

Asn Ser Asn Lys Ala Asn Leu His Gln Ala Leu Ala Phe Ile Leu Thr
 340 345 350

Ser Arg Gly Thr Pro Ser Ile Tyr Tyr Gly Thr Glu Gln Tyr Met Ala
 355 360 365

Gly Gly Asn Asp Pro Tyr Asn Arg Gly Met Met Pro Ala Phe Asp Thr
 370 375 380

Thr Thr Thr Ala Phe Lys Glu Val Ser Thr Leu Ala Gly Leu Arg Arg
 385 390 395 400

Asn Asn Ala Ala Ile Gln Tyr Gly Thr Thr Thr Gln Arg Trp Ile Asn
 405 410 415

Asn Asp Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Phe Asn Asp Val Val Leu
 420 425 430

Val Ala Ile Asn Arg Asn Thr Gln Ser Ser Tyr Ser Ile Ser Gly Leu
 435 440 445

Gln Thr Ala Leu Pro Asn Gly Ser Tyr Ala Asp Tyr Leu Ser Gly Leu
 450 455 460

Leu Gly Gly Asn Gly Ile Ser Val Ser Asn Gly Ser Val Ala Ser Phe
 465 470 475 480

Thr Leu Ala Pro Gly Ala Val Ser Val Trp Gln Tyr Ser Thr Ser Ala
 485 490 495

Ser Ala Pro Gln Ile Gly Ser Val Ala Pro Asn Met Gly Ile Pro Gly
 500 505 510

Asn Val Val Thr Ile Asp Gly Lys Gly Phe Gly Thr Thr Gln Gly Thr
 515 520 525

Val Thr Phe Gly Gly Val Thr Ala Thr Val Lys Ser Trp Thr Ser Asn
 530 535 540

Arg Ile Glu Val Tyr Val Pro Asn Met Ala Ala Gly Leu Thr Asp Val
 545 550 555 560

Lys Val Thr Ala Gly Gly Val Ser Ser Asn Leu Tyr Ser Tyr Asn Ile
 565 570 575

Leu Ser Gly Thr Gln Thr Ser Val Val Phe Thr Val Lys Ser Ala Pro
 580 585 590

Pro Thr Asn Leu Gly Asp Lys Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Ile Pro Glu
 595 600 605

Leu Gly Asn Trp Ser Thr Asp Thr Ser Gly Ala Val Asn Asn Ala Gln
 610 615 620

Gly Pro Leu Leu Ala Pro Asn Tyr Pro Asp Trp Phe Tyr Val Phe Ser
 625 630 635 640

ES 2 399 341 T3

Val Pro Ala Gly Lys Thr Ile Gln Phe Lys Phe Phe Ile Lys Arg Ala
645 650 655

Asp Gly Thr Ile Gln Trp Glu Asn Gly Ser Asn His Val Ala Thr Thr
660 665 670

Pro Thr Gly Ala Thr Gly Asn Ile Thr Val Thr Trp Gln Asn Ser Ser
675 680 685 1

Ser Ala Ser Val Lys Gly Asp Val Ile Tyr Gln Ile Ile Ile Asp Arg
5 10 15

Phe Tyr Asp Gly Asp Thr Thr Asn Asn Asn Pro Ala Lys Ser Tyr Gly
20 25 30

Leu Tyr Asp Pro Thr Lys Ser Lys Trp Lys Met Tyr Trp Gly Gly Asp
35 40 45 50

Leu Glu Gly Val Arg Gln Lys Leu Pro Tyr Leu Lys Gln Leu Gly Val
55 60 65

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

Gly Thr Asp Asn Thr Gly Tyr His Gly Tyr Trp Thr Arg Asp Phe Lys
85 90 95

Gln Ile Glu Glu His Phe Gly Asn Trp Thr Thr Phe Asp Thr Leu Val
100 105 110

Asn Asp Ala His Gln Asn Gly Ile Lys Val Ile Val Asp Phe Val Pro
115 120 125 130

Asn His Ser Thr Pro Phe Lys Ala Asn Asp Ser Thr Phe Ala Glu Gly
135 140 145

Gly Ala Leu Tyr Asn Asn Gly Thr Tyr Met Gly Asn Tyr Phe Asp Asp
150 155 160

Ala Thr Lys Gly Tyr Phe His His Asn Gly Asp Ile Ser Asn Trp Asp
165 170 175

Asp Arg Tyr Glu Ala Gln Trp Lys Asn Phe Thr Asp Pro Ala Gly Phe

ES 2 399 341 T3

180					185						190				
Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Ser	Gln	Glu	Asn	Gly	Thr	Ile	Ala	Gln	Tyr	Leu
195					200					205					210
Thr	Asp	Ala	Ala	Val	Gln	Leu	Val	Ala	His	Gly	Ala	Asp	Gly	Leu	Arg
				215					220					225	
Ile	Asp	Ala	Val	Lys	His	Phe	Asn	Ser	Gly	Phe	Ser	Lys	Ser	Leu	Ala
			230					235					240		
Asp	Lys	Leu	Tyr	Gln	Lys	Lys	Asp	Ile	Phe	Leu	Val	Gly	Glu	Trp	Tyr
		245					250					255			
Gly	Asp	Asp	Pro	Gly	Thr	Ala	Asn	His	Leu	Glu	Lys	Val	Arg	Tyr	Ala
	260					265					270				
Asn	Asn	Ser	Gly	Val	Asn	Val	Leu	Asp	Phe	Asp	Leu	Asn	Thr	Val	Ile
275					280					285					290
Arg	Asn	Val	Phe	Gly	Thr	Phe	Thr	Gln	Thr	Met	Tyr	Asp	Leu	Asn	Asn
				295					300					305	
Met	Val	Asn	Gln	Thr	Gly	Asn	Glu	Tyr	Lys	Tyr	Lys	Glu	Asn	Leu	Ile
			310					315					320		
Thr	Phe	Ile	Asp	Asn	His	Asp	Met	Ser	Arg	Phe	Leu	Ser	Val	Asn	Ser
		325					330					335			
Asn	Lys	Ala	Asn	Leu	His	Gln	Ala	Leu	Ala	Phe	Ile	Leu	Thr	Ser	Arg
	340					345					350				
Gly	Thr	Pro	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Gly	Thr	Glu	Gln	Tyr	Met	Ala	Gly	Gly
355					360					365					370
Asn	Asp	Pro	Tyr	Asn	Arg	Gly	Met	Met	Pro	Ala	Phe	Asp	Thr	Thr	Thr
				375					380					385	
Thr	Ala	Phe	Lys	Glu	Val	Ser	Thr	Leu	Ala	Gly	Leu	Arg	Arg	Asn	Asn
			390					395					400		
Ala	Ala	Ile	Gln	Tyr	Gly	Thr	Thr	Thr	Gln	Arg	Trp	Ile	Asn	Asn	Asp
		405						410				415			

ES 2 399 341 T3

Val Tyr Ile Tyr Glu Arg Lys Phe Phe Asn Asp Val Val Leu Val Ala
420 425 430

Ile Asn Arg Asn Thr Gln Ser Ser Tyr Ser Ile Ser Gly Leu Gln Thr
435 440 445 450

Ala Leu Pro Asn Gly Ser Tyr Ala Asp Tyr Leu Ser Gly Leu Leu Gly
455 460 465

Gly Asn Gly Ile Ser Val Ser Asn Gly Ser Val Ala Ser Phe Thr Leu
470 475 480

Ala Pro Gly Ala Val Ser Val Trp Gln Tyr Ser Thr Ser Ala Ser Ala
485 490 495

Pro Gln Ile Gly Ser Val Ala Pro Asn Met Gly Ile Pro Gly Asn Val
500 505 510

Val Thr Ile Asp Gly Lys Gly Phe Gly Thr Thr Gln Gly Thr Val Thr
515 520 525 530

Phe Gly Gly Val Thr Ala Thr Val Lys Ser Trp Thr Ser Asn Arg Ile
535 540 545

Glu Val Tyr Val Pro Asn Met Ala Ala Gly Leu Thr Asp Val Lys Val
550 555 560

Thr Ala Gly Gly Val Ser Ser Asn Leu Tyr Ser Tyr Asn Ile Leu Ser
565 570 575

Gly Thr Gln Thr Ser Val Val Phe Thr Val Lys Ser Ala Pro Pro Thr
580 585 590

Asn Leu Gly Asp Lys Ile Tyr Leu Thr Gly Asn Ile Pro Glu Leu Gly
595 600 605 610

Asn Trp Ser Thr Asp Thr Ser Gly Ala Val Asn Asn Ala Gln Gly Pro
615 620 625

Leu Leu Ala Pro Asn Tyr Pro Asp Trp Phe Tyr Val Phe Ser Val Pro
630 635 640

Ala Gly Lys Thr Ile Gln Phe Lys Phe Phe Ile Lys Arg Ala Asp Gly
645 650 655

ES 2 399 341 T3

Thr Ile Gln Trp Glu Asn Gly Ser Asn His Val Ala Thr Thr Pro Thr
660 665 670

Gly Ala Thr Gly Asn Ile Thr Val Thr Trp Gln Asn
675 680 685

10618.204-WO

1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Método de preparación de una masa o un producto comestible a base de masa, que comprende la adición de un polipéptido con actividad de alfa-amilasa maltogénica a la masa, donde la masa comprende al menos 10 % de sacarosa en peso, y el polipéptido:
- 10 a) tiene una secuencia de aminoácidos que es como mínimo 70 % idéntica a la SEQ ID nº: 1, y
 b) comparado con SEQ ID nº: 1 comprende una alteración de aminoácidos que es sustitución o delección de o inserción adyacente a I15; R18; K44; N86; T87; G88; Y89; H90; Y92; W93; F188; T189; D190; P191; A192; F194; L196; D329; N371; D372; P373; N375 o R376, y,
 c) tiene más del 20 % de actividad en 10 % de sacarosa, en comparación con su actividad en ausencia de sacarosa.
- 15 2. Método según la reivindicación 1 donde la alteración es sustitución con un residuo de aminoácido mayor o menor.
3. Método según la reivindicación 1 donde la alteración es inserción de 1-4 residuos de aminoácidos en el lado N- o C- del residuo específico.
- 20 4. Método según la reivindicación 1 donde el polipéptido comprende una sustitución I15T/S/V/L, R18K, K44R/S/T/Q/N, N86Q/S/T, T87N/Q/S, G88A/S/T, Y89W/F/H, H90W/F/Y/R/K/N/Q/M, W93Y/F/M/E/G/V/T/S, F188H/L/I/T/G/V, D190E/Q/G, A192G/S/T/Q/R, F194S/L/Y, L196F, N371 K/R/F/Y/Q o D372E/Q/S/T/A, N375S, una delección de 191 o 192 o una inserción de Ala después de 192.
- 25 5. Método según la reivindicación 1 donde el polipéptido tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID nº: 1 con uno de los siguientes conjuntos de alteraciones:

Alteraciones comparadas con SEQ ID nº: 1
D261D,T288P
F188L,D261G,T288P
T288P
Y89F,D261 G,T288P
N86V, F188L,D261G,T288P
Y89F,F188L,D261 G,T288P
Y89H,F188L,D261G,T288P
N86T, F188L,D261G,T288P
F194S,D261G,T288P
L196F
D261G,T288P,D372V
Q184H,N187D,F194Y
D190G
N86G,Y89M, F188L,D261G,T288P
F188L,D190G,D261 G,T288P
A192Q,D261G,T288P,S446A
F188H
P191*
A192*
A192*,G193*
*192aA
N86K,F252L,D261 G,T288P
F194Y,L225S,D261G,T288P
F194L,D261G,T288P
F194S,D261 G,T288P,P642Q

ES 2 399 341 T3

D261G,T288P,N375S
F188T
F188G
F188V
A192R,F194L,D261 G,T288P,G469R
A192G,D261G,T288P
Y89F,D261G,T288P,I290V,N375S

ES 2 399 341 T3

ATOM	1	C1	GLC	A	1	39.217	71.096	23.310	1.00	53.03	C
ATOM	2	C2	GLC	A	1	38.281	69.893	23.579	1.00	55.06	C
ATOM	3	O2	GLC	A	1	37.370	70.251	24.614	1.00	58.15	O
ATOM	4	C3	GLC	A	1	39.115	68.665	24.014	1.00	52.01	C
ATOM	5	O3	GLC	A	1	38.239	67.559	24.350	1.00	51.59	O
ATOM	6	C4	GLC	A	1	40.134	68.335	22.918	1.00	53.28	C
ATOM	7	O4	GLC	A	1	41.075	67.354	23.379	1.00	56.10	O
ATOM	8	C5	GLC	A	1	40.910	69.552	22.419	1.00	55.06	C
ATOM	9	O5	GLC	A	1	40.130	70.771	22.258	1.00	55.28	O
ATOM	10	C6	GLC	A	1	41.528	69.246	21.045	1.00	52.65	C
ATOM	11	O6	GLC	A	1	42.190	70.422	20.599	1.00	38.28	O
ATOM	12	H01	GLC	A	1	41.470	68.299	20.510	1.00	52.65	H
ATOM	13	H02	GLC	A	1	38.649	71.976	23.008	1.00	53.03	H
ATOM	14	H03	GLC	A	1	37.734	69.638	22.672	1.00	55.06	H
ATOM	15	H04	GLC	A	1	37.860	70.513	25.396	1.00	58.15	H
ATOM	16	H05	GLC	A	1	39.655	68.880	24.937	1.00	52.01	H
ATOM	17	H06	GLC	A	1	37.543	67.825	24.856	1.00	51.59	H
ATOM	18	H07	GLC	A	1	41.666	67.115	22.661	1.00	56.10	H
ATOM	19	C1	FRU	A	2	39.472	73.740	24.328	1.00	56.70	C
ATOM	20	O1	FRU	A	2	39.013	73.640	22.974	1.00	60.98	O
ATOM	21	C2	FRU	A	2	40.511	72.650	24.697	1.00	60.03	C
ATOM	22	O2	FRU	A	2	39.917	71.335	24.487	1.00	54.05	O
ATOM	23	C3	FRU	A	2	41.038	72.717	26.169	1.00	56.66	C
ATOM	24	O3	FRU	A	2	40.143	72.012	27.049	1.00	57.01	O
ATOM	25	C4	FRU	A	2	42.371	71.945	26.006	1.00	56.00	C
ATOM	26	O4	FRU	A	2	43.252	72.139	27.103	1.00	53.30	O
ATOM	27	C5	FRU	A	2	42.866	72.599	24.701	1.00	54.87	C
ATOM	28	O5	FRU	A	2	41.705	72.741	23.843	1.00	54.62	O
ATOM	29	C6	FRU	A	2	43.903	71.816	23.946	1.00	55.79	C
ATOM	30	O6	FRU	A	2	44.464	72.647	22.938	1.00	54.56	O
ATOM	31	H01	FRU	A	2	43.759	73.046	22.423	1.00	54.56	H
ATOM	32	H02	FRU	A	2	38.615	73.643	24.994	1.00	56.70	H
ATOM	33	H03	FRU	A	2	38.363	74.325	22.804	1.00	60.98	H
ATOM	34	H04	FRU	A	2	41.133	73.718	26.592	1.00	56.66	H
ATOM	35	H05	FRU	A	2	40.267	71.066	26.941	1.00	57.01	H
ATOM	36	H06	FRU	A	2	42.287	70.859	25.973	1.00	56.00	H
ATOM	37	H07	FRU	A	2	42.807	71.896	27.918	1.00	53.30	H
ATOM	38	H08	FRU	A	2	43.345	73.538	24.976	1.00	54.87	H
ATOM	39	H09	FRU	A	2	43.440	70.944	23.487	1.00	55.79	H
ATOM	40	H10	FRU	A	2	44.686	71.486	24.630	1.00	55.79	H
ATOM	41	H11	FRU	A	2	39.962	74.708	24.436	1.00	56.70	H

Fig. 1