

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 745**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2007 PCT/IB2007/002056**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.12.2007 WO07148224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2007 E 07789503 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2035447**

54 Título: **Polipéptido**

30 Prioridad:

19.06.2006 US 814851 P

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

30.11.2017

73 Titular/es:

**DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS
(100.0%)**

**Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK**

72 Inventor/es:

**DERKX, PATRICK MARIA FRANCISCUS;
HEMMINGSSEN, ANJA KELLET-SMITH;
MEJLDAL, RIE;
SØRENSEN, BO SPANGE y
KRAGH, KARSTEN MATTHIAS**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 644 745 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

Polipéptido

5 Se remite a las solicitudes provisionales de EE. UU. n.º de serie 60/485.413, 60/485.539 y 60/485.616, presentadas el 7 de julio, 2003. También se remite a las solicitudes internacionales PCT/US2004/021723 y PCT/US2004/021739, presentadas el 7 de julio, 2004 y destinadas a EE. UU. (solicitante: Genencor International, Inc). También se remite a las solicitudes de utilidad de EE. UU. con n.º de serie 10/886.905 y 10/866.903, las cuales también se presentaron el 7 de julio, 2004.

10 También se remite a la solicitud provisional de EE. UU. n.º de serie 60/608.919 (presentada como solicitud de utilidad de EE. UU. n.º de serie 10/887.056 el 7 de julio, 2004, pero convertida en solicitud provisional el 15 de septiembre, 2004). También se remite a la solicitud provisional de EE. UU. n.º de serie 60/612.407, que se presentó el 22 de septiembre, 2004.

15 También se remite a la solicitud de EE. UU. n.º de serie 60/485.539, presentada el 7 de julio, 2003. También se remite a la solicitud internacional PCT/IB2004/002487, presentada el 7 de julio, 2004 y destinada a EE. UU. (solicitante: Danisco A/S). También se remite a la solicitud de utilidad de EE. UU. n.º de serie 10/886.023, presentada el 7 de julio, 2004.

También se remite a las solicitudes de utilidad de EE. UU. con n.º de serie 10/886.505, 10/886.527 y 10/886.504, las cuales se presentaron el 7 de julio, 2004. También se remite a la solicitud de utilidad de EE. UU. n.º de serie 10/947.612, presentada el 22 de septiembre, 2004.

20 También se remite a la solicitud de patente internacional n.º de serie PCT/GB2005/002675, presentada el 7 de julio, 2004 y destinada a EE. UU. (solicitantes: Danisco A/S y Genencor International, Inc, D. Young & Co., n.º de referencia del abogado: P020161WO). También se remite a la solicitud provisional de EE. UU. n.º de serie 60/697.302, presentada el 7 de julio, 2005.

Campo

25 La presente invención se refiere a polipéptidos, de modo específico a polipéptidos de amilasa y a ácidos nucleicos que los codifican, y sus usos como exoamilasas no maltogénicas para producir productos alimentarios. Las amilasas de la presente invención han sido modificadas para que tengan unas cualidades más beneficiosas. De modo específico, las amilasas de la presente invención muestran una exoespecificidad alterada y/o una termoestabilidad alterada. En particular, los polipéptidos se derivan de polipéptidos que tienen actividad exoamilasa no maltogénica, en particular, actividad glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60).

Antecedentes

30 Unas amilasas mejoradas pueden mejorar los problemas inherentes a ciertos procesos, tales como el horneado de pan. La cristalización de la amilopectina se produce en los gránulos de almidón días después del horneado del pan, lo cual conduce a una mayor firmeza del pan y provoca el enranciamiento del pan. Cuando el pan se enrancia, la miga pierde blandura y humedad. Como resultado, la miga se hace menos elástica, y el pan desarrolla una corteza correosa.

35 La hidrólisis enzimática (por amilasas, por ejemplo) de las cadenas laterales de la amilopectina puede reducir la cristalización y aumentar el antienranciamiento. La cristalización depende de la longitud de las cadenas laterales de la amilopectina: cuanto más largas sean las cadenas laterales, mayor será la cristalización. La mayoría de los gránulos de almidón están compuestos de una mezcla de dos polímeros: la amilopectina y la amilosa, de los cuales aproximadamente 75% es amilopectina. La amilopectina es una molécula ramificada muy grande que consiste en cadenas de unidades de α -D-glucopiranosilo unidas por enlaces (1-4), y las cadenas que están unidas por enlaces α -D-(1-6) forman las ramificaciones. La amilosa es una cadena lineal de unidades de α -D-glucopiranosilo con enlaces (1-4) que tienen pocas ramificaciones α -D-(1-6).

40 El horneado de productos farináceos del pan, tal como pan blanco, pan fabricado a partir de harina de centeno y harina de trigo tamizadas y panecillos se realiza horneando la masa del pan a unas temperaturas del horno en el intervalo de 180 a 250°C durante aproximadamente 15 a 60 minutos. Durante el proceso del horneado, predomina un gradiente pronunciado de temperatura (200 \rightarrow 120°C) en las capas exteriores de la masa en donde se desarrolla la corteza del producto horneado. Sin embargo, debido al vapor, la temperatura de la miga solo es de aproximadamente 100°C al final del proceso de horneado. Por encima de unas temperaturas de aproximadamente 45 85°C puede producirse la inactivación de las enzimas, y las enzimas no presentarán propiedades antienranciamiento. Por tanto, solo las amilasas termoestables son capaces de modificar el almidón de forma eficaz durante el horneado.

50 Una actividad endoamilasa puede afectar negativamente a la calidad del producto de pan final, produciendo una miga pegajosa o gomosa debido a la acumulación de dextrinas ramificadas. Se prefiere la actividad exoamilasa, porque logra la modificación deseada del almidón que conduce al retraso en el enranciamiento, con una cantidad

menor de los efectos negativos asociados con la actividad endoamilasa. La reducción de la actividad endoamilasa puede conducir a una mayor exoespecificidad, lo cual puede reducir las dextrinas ramificadas y producir un pan de mayor calidad.

El documento US 2006/008890 A1 describe polipéptidos variantes de PS4.

5 Sumario

Los inventores proporcionan, según la invención, un polipéptido variante de PS4 según se indica en las reivindicaciones. Los inventores también proporcionan el uso de dicho polipéptido variante de PS4 como aditivo alimentario, producto alimentario, producto de panadería, composición mejoradora, producto de pienso, que incluye pienso animal, etc., y también incluido en estos, según se indica en las reivindicaciones. Los inventores proporcionan ácidos nucleicos que codifican y que están relacionados con los polipéptidos variantes de PS4, según se indica en las reivindicaciones. En las reivindicaciones también se indican métodos para producir dichos polipéptidos variantes de PS4, así como otros aspectos de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un ejemplo de una curva de un analizador de texturas.

15 La figura 2 muestra los resultados de un experimento para determinar la estabilidad de temperatura de los polipéptidos variantes de PS4 descritos en la presente. Eje de abscisas: temperatura, eje de ordenadas: semivida (minutos). Rombos: pSac-D34/pMD3 (SEQ ID NO:2), cuadrados: pSac-pMD229 (SEQ ID NO:13), triángulos: pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21).

20 La figura 3 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la firmeza de un pan tratado con diversas concentraciones del polipéptido variante de PS4 y un pan sin tratar. El eje de abscisas muestra el número de días, mientras que el eje de ordenadas muestra la firmeza expresada en hPa (véase el ejemplo 13). Rombos: 20.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382. Cuadrados: 40.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382. Triángulos: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382. Aspas: Control (sin enzima).

25 La figura 4 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la resiliencia de un pan tratado con diversas concentraciones del polipéptido variante de PS4 y un pan sin tratar. El eje de abscisas muestra el número de días, mientras que el eje de ordenadas muestra la resiliencia expresada en unidades de resiliencia (véase el ejemplo 14). Rombos: 20.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382. Cuadrados: 40.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382. Triángulos: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382. Aspas: Control (sin enzima).

30 La figura 5 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la cohesividad de un pan tratado con diversas concentraciones del polipéptido variante de PS4 y un pan sin tratar. El eje de abscisas muestra el número de días, mientras que el eje de ordenadas muestra la cohesividad expresada en unidades de cohesividad (véase el ejemplo 15). Rombos: 20.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382. Cuadrados: 40.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382. Triángulos: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382. Aspas: Control (sin enzima).

35 La figura 6 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la firmeza de un pan tratado con diversas concentraciones del polipéptido variante de PS4 con una sustitución en 307. El eje de abscisas muestra el número de días, mientras que el eje de ordenadas muestra la firmeza expresada en hPa (véase el ejemplo 13). Rombos: Control (sin enzima). Cuadrados: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-D34/pMD3 (SEQ ID NO:2). Triángulos: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMD229 (SEQ ID NO:13). Aspas: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382.

40 La figura 7 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la resiliencia de un pan tratado con un polipéptido variante de PS4 con una sustitución en 307. El eje de abscisas muestra el número de días, mientras que el eje de ordenadas muestra la resiliencia expresada en unidades de resiliencia (véase el ejemplo 14). Rombos: Control (sin enzima). Cuadrados: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-D34/pMD3 (SEQ ID NO:2). Triángulos: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMD229 (SEQ ID NO:13). Aspas: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382.

45 La figura 8 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la cohesividad de un pan tratado con un polipéptido variante de PS4 con una sustitución en 307. El eje de abscisas muestra el número de días, mientras que el eje de ordenadas muestra la cohesividad expresada en unidades de cohesividad (véase el ejemplo 15). Rombos: Control (sin enzima). Cuadrados: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-D34/pMD3 (SEQ ID NO:2). Triángulos: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMD229 (SEQ ID NO:13). Aspas: 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382.

50 Figura 9. Ensayo de plegabilidad en el día 8 después del horneado de tortillas con 400 ppm de Novamyl (TM) 1500 y 50 BMK/kg de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21).

Figura 10. Ensayo de plegabilidad en el día 8 después del horneado de tortillas con 400 ppm de Novamyl (TM) 1500 y 50 BMK/kg de pSacpMS382 (SEQ ID NO:21).

Figura 11. Ensayo de firmeza de torrijas preparadas con SSM 471 B10 (SEQ ID NO:27) y SSM 471 C04 (SEQ ID NO:29).

5 Figura 12. Ensayo de resiliencia de torrijas preparadas con SSM 471 B10 (SEQ ID NO:27) y SSM 471 C04 (SEQ ID NO:29).

Figura 13. Ensayo de resiliencia de torrijas preparadas con pMS 370 (SEQ ID NO:31) y SSM 471 C04 (SEQ ID NO:29).

Listado de secuencias

10 **SEQ ID NO:1** muestra una secuencia de referencia de PS4, proveniente de la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila*. **SEQ ID NO:2** muestra una secuencia de pSac-D34; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 11 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón. **SEQ ID NO:3** muestra una secuencia de pSac-D20; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 13 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón. **SEQ ID NO:4** muestra una secuencia de pSac-D14; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 14 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón. **SEQ ID NO:5** muestra un precursor de la glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60) (G4-amilasa) (amilasa formadora de maltotetraosa) (exomaltotetrahidrolasa) (exoamilasa formadora de maltotetraosa) de *Pseudomonas saccharophila*, n.º de registro de SWISS-PROT P22963. **SEQ ID NO:6** muestra un gen mta de *P. saccharophila* que codifica una maltotetrahidrolasa (n.º EC = 3.2.1.60), n.º de registro de GenBank X16732. **SEQ ID NO:7** muestra una secuencia de referencia de PS4, proveniente de la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri*. **SEQ ID NO:8** muestra una secuencia de PStu-D34; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri* con 9 sustituciones. **SEQ ID NO:9** muestra una secuencia de PStu-D20; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri* con 11 sustituciones. **SEQ ID NO:10** muestra una secuencia de PStu-D14; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri* con 12 sustituciones. **SEQ ID NO:11** muestra un precursor de la glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60) (G4-amilasa) (amilasa formadora de maltotetraosa) (exomaltotetrahidrolasa) (exoamilasa formadora de maltotetraosa) de *Pseudomonas stutzeri*, n.º de registro de SWISS-PROT P13507. **SEQ ID NO:12** muestra un gen de amilasa formadora de maltotetraosa (amyP) de *P. stutzeri*, cds completo, n.º de registro de GenBank M24516.

SEQ ID NO:13 muestra una secuencia de aminoácidos de pSac-pMD229 que tiene las mutaciones 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 272Q, 303E, 307L, 309P y 334P. **SEQ ID NO:14** muestra una secuencia de ácido nucleico de pSac-pMD229. **SEQ ID NO:15** muestra una secuencia de aminoácidos de pSac-pMD248 que tiene las mutaciones 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 145D, 146G, 157L, 178F, 179T, 223E, 229P, 272Q, 303E, 307L y 334P. **SEQ ID NO:16** muestra una secuencia de ácido nucleico de pSac-pMD248. **SEQ ID NO:17** muestra una secuencia de aminoácidos de pSac-pMD253 que tiene las mutaciones 33Y, 34N, 121D, 134R, 141P, 146G, 157L, 178F, 179T, 223E, 229P, 272Q, 303E, 307L, 309P y 334P. **SEQ ID NO:18** muestra una secuencia de ácido nucleico de pSac-pMD253. **SEQ ID NO:19** muestra una secuencia de aminoácidos de pSac-pMD271 que tiene las mutaciones 3S, 33Y, 34N, 70D, 121D, 134R, 141P, 146G, 157L, 178F, 179T, 223E, 229P, 272Q, 303E, 307L, 309P y 334P. **SEQ ID NO:20** muestra una secuencia de ácido nucleico de pSac-pMD271.

SEQ ID NO:21 muestra una secuencia de aminoácidos de pSac-pMS382 que tiene las mutaciones 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307K, 309P y 334P. **SEQ ID NO:22** muestra una secuencia de nucleótidos de pSac-pMS382. **SEQ ID NO:23** muestra una secuencia de aminoácidos de pSac-pMS382R que tiene las mutaciones 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307R, 309P y 334P. **SEQ ID NO:24** muestra una secuencia de nucleótidos de pSac-pMS382R. **SEQ ID NO:25** muestra una secuencia de aminoácidos de pSac-pMS382H que tiene las mutaciones 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 309P y 334P. **SEQ ID NO:26** muestra una secuencia de nucleótidos de pSac-pMS382H.

SEQ ID NO:27 muestra una secuencia de aminoácidos de SSM471 B10 que tiene las mutaciones 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 272Q, 303E, 307R, 309P y 334P. **SEQ ID NO:28** muestra una secuencia de ácido nucleico de SSM471 B10. **SEQ ID NO:29** muestra una secuencia de aminoácidos de SSM471 C04 que tiene las mutaciones 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 272Q, 303E, 307K, 309P y 334P. **SEQ ID NO:30** muestra una secuencia de ácido nucleico de SSM471 C04. **SEQ ID NO:31** muestra una secuencia de aminoácidos de PMS 370 que tiene las mutaciones 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 272Q, 303E, 309P y 334P. **SEQ ID NO:32** muestra una secuencia de ácido nucleico de PMS 370.

Descripción detallada

En la siguiente descripción y ejemplos, a menos que el contexto indique lo contrario, las dosificaciones de los

polipéptidos variantes de PS4 se indican en partes por millón (microgramos por gramo) de harina. Por ejemplo, "1 D34" indica 1 parte por millón de pSac-D34 basado en peso por peso. Preferiblemente, las cantidades de enzima se determinan basándose en ensayos de actividad como equivalentes de proteína enzimática pura medida con albúmina de suero bovina (BSA) como patrón, utilizando el ensayo descrito en Bradford (1976, A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem., 72:248-254).

Cuando se describen los diferentes variantes de los polipéptidos variantes de PS4 producidos o que se contemplan como incluidos en este documento, se adopta la siguiente nomenclatura para facilitar la referencia:

(i) cuando la sustitución incluye un número y una letra, por ejemplo, 141P, esto se refiere a la posición según el sistema de numeración/aminoácido sustituido. Por consiguiente, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido por prolina en la posición 141 se indica como 141P;

(ii) cuando la sustitución incluye una letra, un número y una letra, por ejemplo, A141P, entonces esto se refiere al aminoácido original/posición según el sistema de numeración/aminoácido sustituido. Por consiguiente, por ejemplo, la sustitución de alanina por prolina en la posición 141 se indica como A141P.

Cuando son posibles dos o más sustituyentes posibles en una posición concreta, esto se indicará por medio de letras contiguas, que pueden estar separadas opcionalmente por barras "/", por ejemplo, G303ED o G303E/D. Cuando el aminoácido pertinente en una posición puede ser sustituido por cualquier aminoácido, esto se indica por medio de la posición según el sistema de numeración/X, por ejemplo, 121X.

Las mutaciones múltiples pueden indicarse separadas por barras "/", por ejemplo, A141P/G223A, o comas ",", por ejemplo, A141P, G223A que representan mutaciones en la posición 141 y 223 que sustituyen la alanina por prolina y la glicina por alanina, respectivamente.

A menos que se indique lo contrario, todos los términos y expresiones técnicos y científicos empleados en la presente tienen el mismo significado que el que entienden habitualmente los expertos en la técnica a la cual pertenece esta invención. Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1994), y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a los expertos en la técnica un diccionario general de muchos de los términos y expresiones empleados en esta invención. Aunque pueden emplearse muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente en la práctica o el ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Los intervalos numéricos incluyen los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, los ácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación 5' a 3'; las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi, respectivamente.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Estas técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F. M. *et al.* (1995 y suplementos periódicos; Current Protocols in Molecular Biology, cap. 9, 13, y 16, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley & Sons; J. M. Polak y James O'D. McGee, 1990, In Situ Hybridization: Principles and Practice; Oxford University Press; M. J. Gait (editor), 1984, Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, Irl Press; D. M. J. Lilley y J. E. Dahlberg, 1992, Methods of Enzymology: DNA Structure Part A: Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology, Academic Press; Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol NO. 1 por Edward Harlow, David Lane, ed. Harlow (1999, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-544-7); Antibodies: A Laboratory Manual por Ed Harlow (editor), David Lane (editor) (1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN 0-87969-314-2), 1855, Lars-Inge Larsson "Immunocytochemistry: Theory and Practice", CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1988, ISBN 0-8493-6078-1, John D. Pound (ed.); "Immunochemical Protocols, vol 80", en la serie: "Methods in Molecular Biology", Humana Press, Totowa, Nueva Jersey, 1998, ISBN 0-89603-493-493, Handbook of Drug Screening, editado por Ramakrishna Seethala, Prabhavathi B. Fernandes (2001, Nueva York, NY, Marcel Dekker, ISBN 0-8247-0562-9); y Lab Ref: A Handbook of Recipes, Reagents, and Other Reference Tools for Use at the Bench, editado por Jane Roskams y Linda Rodgers, 2002, Cold Spring Harbor Laboratory, ISBN 0-87969-630-3.

Polipéptidos variantes de PS4

Se proporciona un polipéptido que tiene una sustitución en una o más posiciones que provoca que se altere una propiedad, que puede ser cualquier combinación de una exoespecificidad alterada o termoestabilidad alterada, o una propiedad de manipulación alterada, con relación a la enzima de origen. Estos polipéptidos variantes se denominan en este documento, por conveniencia, "polipéptidos variantes de PS4".

Los polipéptidos variantes de PS4 preferiblemente muestran actividad enzimática. Más preferiblemente, los polipéptidos variantes de PS4 comprenden una actividad amilasa, preferiblemente una actividad exoamilasa. En

realizaciones muy preferidas, los polipéptidos variantes de PS4 muestran una actividad exoamilasa no maltogénica.

5 También se proporcionan composiciones, que incluyen aditivos alimentarios, productos alimentarios, productos de panadería, composiciones mejoradoras, productos de piensos, que incluyen piensos animales, etc., que comprenden dichos polipéptidos variantes de PS4, preferiblemente los que presentan actividad exoamilasa no maltogénica, así como métodos para fabricar y emplear dicho polipéptidos y las composiciones.

10 Tal como se indicó anteriormente, los polipéptidos variantes de PS4 pueden comprender una o más propiedades de manipulación mejoradas, preferiblemente propiedades de horneado mejoradas. Así, los polipéptidos variantes de PS4 son de tal forma que los productos alimentarios tratados con ellos presentan uno o más (preferiblemente todos) de una menor firmeza, una mayor resiliencia, una mayor cohesividad, un menor desmigajamiento o una mayor plegabilidad. Estas propiedades de manipulación u horneado mejoradas mostradas por los polipéptidos variantes de PS4 se describen con más detalle a continuación.

Se proporciona el tratamiento de productos alimentarios, en particular masas y productos de panadería, con dichos polipéptidos, de modo que los productos alimentarios muestren las cualidades deseadas indicadas anteriormente.

15 Se proporcionan otros usos de dichas composiciones, tales como para la preparación de detergentes, como edulcorantes, jarabes, etc. Las composiciones incluyen el polipéptido junto con al menos otro componente. En particular, se proporcionan aditivos alimentarios o de piensos que comprenden los polipéptidos.

20 Estos polipéptidos y ácidos nucleicos se diferencian de sus secuencias de origen por la inclusión de una serie de mutaciones. En otras palabras, la secuencia del polipéptido o ácido nucleico variante de PS4 es diferente de la de su secuencia de origen en una serie de posiciones o restos. En realizaciones preferidas, las mutaciones comprenden sustituciones de aminoácidos, es decir, un cambio de un resto aminoácido por otro. Así, los polipéptidos variantes de PS4 comprenden una serie de cambios en la naturaleza del resto aminoácido en una o más posiciones de la secuencia de origen.

25 Tal como se emplea en la presente, el término "variante" significa una molécula capaz de obtenerse de una molécula de origen. Los variantes incluyen polipéptidos, así como ácidos nucleicos. Los variantes incluyen delecciones, inserciones y sustituciones a nivel de aminoácidos, y transversiones, transiciones e inversiones a nivel de ácido nucleico, entre otras, en una o más localizaciones. Los variantes también incluyen truncamientos. Los variantes incluyen homólogos y derivados funcionales de las moléculas de origen. Los variantes incluyen secuencias que son complementarias con secuencias que son capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente.

30 Mutantes del resto básico en la posición 307

Se proporcionan polipéptidos variantes de PS4 con alteraciones en la secuencia que comprenden sustituciones de aminoácidos en una secuencia de amilasa, preferiblemente con actividad exoamilasa, más preferiblemente una secuencia de exoamilasa no maltogénica.

35 De modo específico, se proporciona un polipéptido variante de PS4 capaz de obtenerse de un polipéptido de origen que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, que comprende una mutación de aminoácido en la posición 307 referente a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophyllia* mostrada como SEQ ID NO:1. La sustitución en la posición 307 es preferiblemente una sustitución por un aminoácido básico o con carga positiva, preferiblemente lisina (K) o arginina (R).

40 En una realización, se proporciona un polipéptido variante de PS4 en el que la sustitución del aminoácido en la posición 307 es una sustitución por lisina (307K), preferiblemente H307K. En otra realización, se proporciona un polipéptido variante de PS4 en el que la sustitución del aminoácido en la posición 307 es una sustitución por arginina (307R), preferiblemente H307R.

45 El polipéptido variante de PS4 puede comprender además una mutación en la posición 70 a ácido aspártico (D), preferiblemente 70D. En realizaciones preferidas, la sustitución es G70D. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se proporciona un polipéptido variante de PS4 que comprende las sustituciones G70D, H307K o G70D, H307R con relación a una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophyllia* mostrada como SEQ ID NO:1.

50 Los restos en las posiciones 272 y 303 pueden ser "de tipo salvaje", o pueden estar mutados. En realizaciones preferidas, el resto en la posición 272 es un resto de tipo salvaje, concretamente, histidina (H). Preferiblemente, el resto en la posición 303 también es un resto de tipo salvaje, concretamente, glicina (G). Por tanto, se proporciona un polipéptido variante de PS4 que comprende las sustituciones G70D y H307K, siendo con el resto en la posición 272 una H y siendo el resto en la posición 303 una G, o G70D and H307R, siendo el resto en la posición 272 una H y siendo el resto en la posición 303 una G con relación a una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophyllia* mostrada como SEQ ID NO:1.

55 Estos polipéptidos variantes y otros descritos en este documento se denominan en este documento "polipéptidos

variantes de PS4". También se describen los ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos variantes y se denominarán, por conveniencia, ácidos nucleicos de variantes de PS4". Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes de PS4 se describirán con más detalle a continuación.

5 Las secuencias "de origen", es decir, las secuencias en las que se basan los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes de PS4, preferiblemente son polipéptidos que tienen actividad exoamilasa no maltogénica. Las expresiones "enzimas de origen" y "polipéptidos de origen" deben interpretarse en consecuencia, y significan las enzimas y los polipéptidos en que se basan los polipéptidos variantes de PS4. Se describen con más detalle a continuación.

Las mutaciones y los cambios en los aminoácidos pueden realizarse sobre cualquier entorno o esqueleto polipeptídico adecuado, de tipo salvaje o mutado, tal como se describe con más detalle a continuación.

10 En realizaciones particularmente preferidas, las secuencias de origen son enzimas de exoamilasa no maltogénica, preferiblemente enzimas de exoamilasa no maltogénica bacterianas. En realizaciones muy preferidas, la secuencia de origen comprende una glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60). Preferiblemente, la secuencia de origen puede obtenerse de especies de *Pseudomonas*, por ejemplo *Pseudomonas saccharophila* o *Pseudomonas stutzeri*.

15 En algunas realizaciones, el polipéptido de origen comprende una secuencia de exoamilasa no maltogénica de tipo salvaje, o es homólogo con esta, por ejemplo, de *Pseudomonas spp.*

20 Así, el polipéptido de origen puede comprender una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila* que tiene una secuencia mostrada como SEQ ID NO:1. En otras realizaciones preferidas, el polipéptido de origen comprende una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri* que tiene una secuencia mostrada como SEQ ID NO:11, o una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri* que tiene el n.º de registro de SWISS-PROT P13507.

Por otra parte, el polipéptido de origen puede ser un variante de cualquiera de las secuencias de tipo salvaje, es decir, el polipéptido de origen puede estar en sí mismo modificado o puede comprender un polipéptido variante de PS4.

25 En realizaciones preferidas, las mutaciones y los cambios se realizan sobre una secuencia de PS4 que ya está mutada, preferiblemente pMD 229 (SEQ ID NO:13 o 14).

30 Sin embargo, será evidente para los expertos en la técnica que aunque los polipéptidos variantes de PS4 pueden obtenerse mutando secuencias que ya están mutadas, es posible construir estos polipéptidos variantes comenzando a partir de una secuencia de tipo salvaje (o de cualquier secuencia adecuada), identificando las diferencias entre la secuencia de partida y el variante deseado, e introduciendo las mutaciones requeridas en la secuencia de partida para lograr el variante deseado.

35 Las proteínas y sus ácidos nucleicos relacionados, que preferiblemente tienen homología de secuencia o funcional con la secuencia de exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO:1 o una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri* que tiene una secuencia mostrada como SEQ ID NO:11, se indican en este documento como miembros de la "familia de PS4". Los ejemplos de enzimas de exoamilasa no maltogénica de la "familia de PS4" adecuadas para su uso para generar los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes de PS4 se describirán con más detalle a continuación.

40 Los polipéptidos variantes de PS4 descritos en este documento preferiblemente conservan las características de los polipéptidos de origen y además preferiblemente tienen propiedades beneficiosas adicionales, por ejemplo, una actividad potenciada o termoestabilidad, o resistencia al pH o cualquier combinación (preferiblemente todas). Esto se describirá con más detalle a continuación.

45 Los mutantes de sustitución de PS4 descritos en la presente pueden utilizarse para cualquier objetivo adecuado. Pueden emplearse preferiblemente para los objetivos para los cuales la enzima de origen resulta adecuada. En particular, pueden emplearse en cualquier aplicación para la cual se emplee una exomaltotetrahidrolasa. En realizaciones muy preferidas, tienen la ventaja añadida de una mayor termoestabilidad o mayor actividad exoamilasa o mayor estabilidad frente al pH o cualquier combinación. Los ejemplos de usos adecuados para los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes de PS4 incluyen la producción de alimentos, en particular, alimentos horneados, así como la producción de composiciones alimentarias; otros ejemplos se indican en detalle a continuación.

50 Los polipéptidos variantes de PS4 pueden comprender una o más mutaciones adicionales, además de las posiciones indicadas anteriormente. Puede haber una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más mutaciones, preferiblemente sustituciones, además de las que se han indicado. También pueden incluirse otras mutaciones, tales como deleciones, inserciones y sustituciones a nivel de aminoácidos, y transversiones, transiciones e inversiones a nivel de ácido nucleico, en una o más localizaciones, tal como se describe a continuación. Además, no es necesario que los variantes de PS4 presenten todas las sustituciones en las posiciones listadas. En efecto, pueden que no presenten una, dos, tres, cuatro o cinco sustituciones, es decir, el resto aminoácido de tipo salvaje está presente en dichas posiciones.

Otras mutaciones

Posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309 y/o 334

En realizaciones preferidas, el polipéptido variante de PS4 puede comprender una o más mutaciones adicionales en otros sitios o posiciones en su secuencia.

5 Por ejemplo, el polipéptido variante de PS4 puede comprender además una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones: 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309 o 334. Los restos en estas posiciones pueden comprender preferiblemente 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307K, 309P o 334P.

10 Por tanto, el polipéptido variante de PS4 puede comprender, además de 307K/R/H, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 mutaciones en las posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309 o 334. El resto en la posición 307 en estas realizaciones puede comprender histidina (H), en particular cuando dichas mutaciones adicionales están presentes.

15 Por tanto, el polipéptido variante de PS4 puede comprender, además de 307K/R/H, una mutación adicional en cualquiera de las posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309 o 334, tal como se muestra en "Anexo A: Una mutación", concretamente, 33Y; 34N; 70D; 121F; 134R; 141P; 146G; 157L; 161A; 178F; 179T; 223E; 229P; 309P; o 334P.

20 En otras palabras, el polipéptido variante de PS4 puede comprender cualquiera de las siguientes: 33Y, 307K/R/H; 34N, 307K/R/H; 70D, 307K/R/H; 121F, 307K/R/H; 134R, 307K/R/H; 141P, 307K/R/H; 146G, 307K/R/H; 157L, 307K/R/H; 161A, 307K/R/H; 178F, 307K/R/H; 179T, 307K/R/H; 223E, 307K/R/H; 229P, 307K/R/H; 309P, 307K/R/H; o 334P, 307K/R/H.

25 Como alternativa, el polipéptido variante de PS4 puede comprender, además de 307K/R/H, dos mutaciones adicionales en cualquiera de las posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309 o 334, tal como se muestra en "Anexo A: Dos mutaciones", concretamente, 33Y,34N; 33Y,70D; 33Y,121F; 33Y,134R; 33Y,141P; 33Y,146G; 33Y,157L; 33Y,161A; 33Y,178F; 33Y,179T; 33Y,223E; 33Y,229P; 33Y,309P; 33Y,334P; 34N,70D; 34N,121F; 34N,134R; 34N,141P; 34N,146G; 34N,157L; 34N,161A; 34N,178F; 34N,179T; 34N,223E; 34N,229P; 34N,309P; 34N,334P; 70D,121F; 70D,134R; 70D,141P; 70D,146G; 70D,157L; 70D,161A; 70D,178F; 70D,179T; 70D,223E; 70D,229P; 70D,309P; 70D,334P; 121F,134R; 121F,141P; 121F,146G; 121F,157L; 121F,161A; 121F,178F; 121F,179T; 121F,223E; 121F,229P; 121F,309P; 121F,334P; 134R,141P; 134R,146G; 134R,157L; 134R,161A; 134R,178F; 134R,179T; 134R,223E; 134R,229P; 134R,309P; 134R,334P; 141P,146G; 141P,157L; 141P,161A; 141P,178F; 141P,179T; 141P,223E; 141P,229P; 141P,309P; 141P,334P; 146G,157L; 146G,161A; 146G,178F; 146G,179T; 146G,223E; 146G,229P; 146G,309P; 146G,334P; 157L,161A; 157L,178F; 157L,179T; 157L,223E; 157L,229P; 157L,309P; 157L,334P; 161A,178F; 161A,179T; 161A,223E; 161A,229P; 161A,309P; 161A,334P; 178F,179T; 178F,223E; 178F,229P; 178F,309P; 178F,334P; 179T,223E; 179T,229P; 179T,309P; 179T,334P; 223E,229P; 223E,309P; 223E,334P; 229P,309P; 229P,334P; o 309P,334P.

35 En otras palabras, el polipéptido variante de PS4 puede comprender cualquiera de las siguientes: 33Y,34N,307K/R/H; 33Y,70D,307K/R/H; 33Y,121F,307K/R/H; 33Y,134R,307K/R/H; 33Y,141P,307K/R/H; 33Y,146G,307K/R/H; 33Y,157L,307K/R/H; 33Y,161A,307K/R/H; 33Y,178F,307K/R/H; 33Y,179T,307K/R/H; 33Y,223E,307K/R/H; 33Y,229P,307K/R/H; 33Y,309P,307K/R/H; 33Y,334P,307K/R/H; 34N,70D,307K/R/H; 34N,121F,307K/R/H; 34N,134R,307K/R/H; 34N,141P,307K/R/H; 34N,146G,307K/R/H; 34N,157L,307K/R/H; 34N,161A,307K/R/H; 34N,178F,307K/R/H; 34N,179T,307K/R/H; 34N,223E,307K/R/H; 34N,229P,307K/R/H; 34N,309P,307K/R/H; 34N,334P,307K/R/H; 70D,121F,307K/R/H; 70D,134R,307K/R/H; 70D,141P,307K/R/H; 70D,146G,307K/R/H; 70D,157L,307K/R/H; 70D,161A,307K/R/H; 70D,178F,307K/R/H; 70D,179T,307K/R/H; 70D,223E,307K/R/H; 70D,229P,307K/R/H; 70D,309P,307K/R/H; 70D,334P,307K/R/H; 121F,134R,307K/R/H; 121F,141P,307K/R/H; 121F,146G,307K/R/H; 121F,157L,307K/R/H; 121F,161A,307K/R/H; 121F,178F,307K/R/H; 121F,179T,307K/R/H; 121F,223E,307K/R/H; 121F,229P,307K/R/H; 121F,309P,307K/R/H; 121F,334P,307K/R/H; 134R,141P,307K/R/H; 134R,146G,307K/R/H; 134R,157L,307K/R/H; 134R,161A,307K/R/H; 134R,178F,307K/R/H; 134R,179T,307K/R/H; 134R,223E,307K/R/H; 134R,229P,307K/R/H; 134R,309P,307K/R/H; 134R,334P,307K/R/H; 141P,146G,307K/R/H; 141P,157L,307K/R/H; 141P,161A,307K/R/H; 141P,178F,307K/R/H; 141P,179T,307K/R/H; 141P,223E,307K/R/H; 141P,229P,307K/R/H; 141P,309P,307K/R/H; 141P,334P,307K/R/H; 146G,157L,307K/R/H; 146G,161A,307K/R/H; 146G,178F,307K/R/H; 146G,179T,307K/R/H; 146G,223E,307K/R/H; 146G,229P,307K/R/H; 146G,309P,307K/R/H; 146G,334P,307K/R/H; 157L,161A,307K/R/H; 157L,178F,307K/R/H; 157L,179T,307K/R/H; 157L,223E,307K/R/H; 157L,229P,307K/R/H; 157L,309P,307K/R/H; 157L,334P,307K/R/H; 161A,178F,307K/R/H; 161A,179T,307K/R/H; 161A,223E,307K/R/H; 161A,229P,307K/R/H; 161A,309P,307K/R/H; 161A,334P,307K/R/H; 178F,179T,307K/R/H; 178F,223E,307K/R/H; 178F,229P,307K/R/H; 178F,309P,307K/R/H; 178F,334P,307K/R/H; 179T,223E,307K/R/H; 179T,229P,307K/R/H; 179T,309P,307K/R/H; 179T,334P,307K/R/H; 223E,229P,307K/R/H; 223E,309P,307K/R/H; 223E,334P,307K/R/H; 229P,309P,307K/R/H; 229P,334P,307K/R/H; 309P,334P,307K/R/H.

Como alternativa, el polipéptido variante de PS4 puede comprender, además de 307K/R/H, tres mutaciones adicionales en cualquiera de las posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309 o 334,

tal como se muestra en "Anexo A: 3 mutaciones".

Como alternativa, el polipéptido variante de PS4 puede comprender, además de 307K/R/H, cuatro mutaciones adicionales en cualquiera de las posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309 o 334, tal como se muestra en "Anexo A: 4 mutaciones".

- 5 Como alternativa, el polipéptido variante de PS4 puede comprender, además de 307K/R/H, cinco mutaciones adicionales en cualquiera de las posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309 o 334, tal como se muestra en "Anexo A: 5 mutaciones".

- 10 Como alternativa, el polipéptido variante de PS4 puede comprender, además de 307K/R/H, seis mutaciones adicionales en cualquiera de las posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309 o 334, tal como se muestra en "Anexo A: 6 mutaciones".

Como alternativa, el polipéptido variante de PS4 puede comprender, además de 307K/R/H, siete mutaciones adicionales en cualquiera de las posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309 o 334, tal como se muestra en "Anexo A: 7 mutaciones".

- 15 El polipéptido variante de PS4 puede comprender una secuencia con nueve mutaciones, v.g. cada uno de los siguientes restos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307K/R/H, 309P, 334P, pero no incluye los septetos de restos mostrados en "Anexo A: 7 mutaciones".

El polipéptido variante de PS4 puede comprender una secuencia con diez mutaciones, v.g. cada uno de los siguientes restos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307K/R/H, 309P, 334P, pero no incluye los sextetos de restos mostrados en "Anexo A: 6 mutaciones".

- 20 El polipéptido variante de PS4 puede comprender una secuencia con once mutaciones, v.g. cada uno de los siguientes restos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307K/R/H, 309P, 334P, pero no incluye los quintetos de restos mostrados en "Anexo A: 5 mutaciones".

- 25 El polipéptido variante de PS4 puede comprender una secuencia con doce mutaciones, v.g. cada uno de los siguientes restos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307K/R/H, 309P, 334P, pero no incluye los cuartetos de restos mostrados en "Anexo A: 4 mutaciones".

El polipéptido variante de PS4 puede comprender una secuencia con trece mutaciones, v.g. cada uno de los siguientes restos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307K/R/H, 309P, 334P, pero no incluye los tríos de restos mostrados en "Anexo A: 3 mutaciones".

- 30 El polipéptido variante de PS4 puede comprender una secuencia con catorce mutaciones, v.g. cada uno de los siguientes restos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307K/R/H, 309P, 334P, pero no incluye las parejas de restos mostradas en "Anexo A: 2 mutaciones".

El polipéptido variante de PS4 puede comprender una secuencia con quince mutaciones, v.g. cada uno de los siguientes restos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307K/R/H, 309P, 334P, pero no incluye los restos individuales mostrados en "Anexo A: 1 mutación".

- 35 *Secuencias del polipéptido variante de PS4 preferidas*

Sin embargo, preferiblemente, el polipéptido variante de PS4 comprende además mutaciones en cada una de estas posiciones.

- 40 De modo específico, se proporciona un polipéptido variante de PS4 capaz de obtenerse de un polipéptido de origen que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, en el que el polipéptido variante de PS4 comprende una mutación en cada una de las siguientes posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 307, 309, 334, referentes a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophylla* mostrada como SEQ ID NO:1.

- 45 En realizaciones preferidas, la mutación en la posición 307 comprende un resto básico o con carga positiva. En algunas realizaciones, la mutación en la posición 307 comprende 307K o 307R. En otra realización preferida, el resto en la posición 307 es H. Por tanto, se proporciona un polipéptido variante de PS4 capaz de obtenerse de un polipéptido de origen que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, en el que el polipéptido variante de PS4 comprende una mutación en la posición 307 a K o R, o en el que el resto en la posición 307 es H, junto con mutaciones en cada una de las posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 307, 309, 334.

- 50 Preferiblemente, el resto en la posición 33 puede comprender Y, preferiblemente 33Y, más preferiblemente N33Y. Preferiblemente, el resto en la posición 34 puede comprender N, preferiblemente 34N, más preferiblemente D34N. Preferiblemente, el resto en la posición 70 puede comprender D, preferiblemente 70D, más preferiblemente G70D. Preferiblemente, el resto en la posición 121 puede comprender F, preferiblemente 121F, más preferiblemente

5 G121F. Preferiblemente, el resto en la posición 134 puede comprender R, preferiblemente 134R, más preferiblemente G134R. Preferiblemente, el resto en la posición 141 puede comprender P, preferiblemente 141P, más preferiblemente A141P. Preferiblemente, el resto en la posición 146 puede comprender G, preferiblemente 146G, más preferiblemente Y146G. Preferiblemente, el resto en la posición 157 puede comprender L, preferiblemente 157L, más preferiblemente I157L. Preferiblemente, el resto en la posición 161 puede comprender A, preferiblemente 161A, más preferiblemente S161A. Preferiblemente, el resto en la posición 178 puede comprender F, preferiblemente 178F, más preferiblemente L178F. Preferiblemente, el resto en la posición 179 puede comprender T, preferiblemente 179T, más preferiblemente A179T. Preferiblemente, el resto en la posición 223 puede comprender E, preferiblemente 223E, más preferiblemente G223E. Preferiblemente, el resto en la posición 229 puede comprender P, preferiblemente 229P, más preferiblemente S229P. Preferiblemente, el resto en la posición 307 puede comprender K, preferiblemente 307K, más preferiblemente H307K. Preferiblemente, el resto en la posición 309 puede comprender P, preferiblemente 309P, más preferiblemente A309P. Preferiblemente, el resto en la posición 334 puede comprender P, preferiblemente 334P, más preferiblemente S334P.

15 Tal como se indicó anteriormente, en realizaciones preferidas, la mutación en la posición 70 es 70D, preferiblemente G70D. Por tanto, se proporciona un polipéptido variante de PS4 capaz de obtenerse de un polipéptido de origen que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, en el que el polipéptido variante de PS4 comprende una mutación en la posición 307 a K o R, o en el que el resto en la posición 307 es H, y una mutación en la posición 70 a 70D, junto con mutaciones en cada una de las posiciones 33, 34, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 307, 309, 334.

20 En realizaciones preferidas, el resto en la posición 272 es "de tipo salvaje", es decir, no está mutado. El resto en la posición 272, por tanto, es preferiblemente histidina (H). Por tanto, se proporciona un polipéptido variante de PS4 capaz de obtenerse de un polipéptido de origen que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, en el que el polipéptido variante de PS4 comprende una mutación en la posición 307 a K o R, o en el que el resto en la posición 307 es H, y una mutación en la posición 70 a 70D, en el que el resto en la posición 272 es H, junto con mutaciones en cada una de las posiciones 33, 34, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 307, 309, 334.

25 De modo similar, el resto en la posición 303 es "de tipo salvaje" o no está mutado, y es preferiblemente glicina (G) en otras realizaciones preferidas. Por tanto, se proporciona un polipéptido variante de PS4 capaz de obtenerse de un polipéptido de origen que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, en el que el polipéptido variante de PS4 comprende una mutación en la posición 307 a K o R, o en el que el resto en la posición 307 es H, y una mutación en la posición 70 a 70D, en el que el resto en la posición 303 es G, junto con mutaciones en cada una de las posiciones 33, 34, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 307, 309, 334.

35 En realizaciones preferidas, en cada una de las anteriores realizaciones del polipéptido variante de PS4 que comprende mutaciones adicionales en las posiciones 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309, 334, el resto en la posición 33 es preferiblemente Y, el resto en la posición 34 es preferiblemente N, el resto en la posición 70 es preferiblemente D, el resto en la posición 121 es preferiblemente F, el resto en la posición 134 es preferiblemente R, el resto en la posición 141 es preferiblemente P, el resto en la posición 146 es preferiblemente G, el resto en la posición 157 es preferiblemente L, el resto en la posición 161 es preferiblemente A, el resto en la posición 178 es preferiblemente F, el resto en la posición 179 es preferiblemente T, el resto en la posición 223 es preferiblemente E, el resto en la posición 229 es preferiblemente P, el resto en la posición 309 es preferiblemente P, y el resto en la posición 334 es preferiblemente P.

40 En realizaciones muy preferidas, se proporciona un polipéptido variante de PS4 que comprende los siguientes restos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307K/R/H, 309P, 334P. El polipéptido variante de PS4 puede comprender cada una de las siguientes mutaciones N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H307K/R, A309P y S334P.

45 De modo específico, se proporciona un polipéptido variante de PS4 que comprende las siguientes sustituciones 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307K, 309P, 334P, preferiblemente N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H307K, A309P, S334P con relación a una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophilla* mostrada como SEQ ID NO:1. En esta realización, el polipéptido variante de PS4 puede comprender una secuencia SEQ ID NO:21.

50 Se proporciona además un polipéptido variante de PS4 que comprende las siguientes sustituciones 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307R, 309P, 334P, preferiblemente N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H307R, A309P, S334P con relación a una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophilla* mostrada como SEQ ID NO:1. En esta realización, el polipéptido variante de PS4 puede comprender una secuencia SEQ ID NO:23.

55 Se proporciona además un polipéptido variante de PS4 capaz de obtenerse de un polipéptido de origen que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, en el que el polipéptido variante de PS4 comprende las siguientes sustituciones 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 309P, 334P, preferiblemente N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, A309P, S334P con relación a una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophilla* mostrada como SEQ ID NO:1. En esta realización, el polipéptido variante de PS4 puede comprender una secuencia SEQ ID NO:25.

ES 2 644 745 T3

Otras sustituciones

Una o más de otras mutaciones indicadas en la siguiente tabla pueden estar presentes también en el polipéptido variante de PS4 descrito en la presente.

Posición	Mutación	Sustitución
3	3S	A3S
26	26E, 26D	N26E, N26D
34	34N, 34G, 34A, 34S o 34T	D34N, D34G, D34A, D34S o D34T
46	46G	I46G
87	87S	G87S
121	121F, 121Y, 121W, 121H, 121A, 121M, 121S, 121T, 121D, 121E, 121L, 121K, 121V	G121F, G121Y, G121W, G121H, G121A, G121M, G121G, G121S, G121T, G121D, G121E, G121L, G121K, G121V
145	145D	N145D
146	146M, 146G	Y146M, Y146G
157	157L, 157M, 157V, 157N, 157L	I157L, I157M, I157V, I157N, I157L
158	158T, 158A, 158S	G158T, G158A, G158S
160	160D	E160D
179	179T, 179V	A179T, A179V
188	188, 188S, 188T o 188H	G188, G188S, G188T, G188H
198	198W, 198F	Y198W, Y198F
179	179T	A179T
223	223A, 223E, 223K, 223L, 223I, 223S, 223T, 223V, 223R, 223P, 223D	G223A, G223E, G223K, G223L, G223I, G223S, G223T, G223V, G223R, G223P, G223D
272	272Q	H272Q
303	303E, 303D	G303E, G303D
306	306T, 306G, 306T, 306G	H306T, H306G, H306T, H306G
316	316S, 316P, 316K, 316Q	R316S, R316P, R316K, R316Q
339	339A, 339E	W339A, W339E
353	353T	R353T

Ácidos nucleicos variantes de PS4

- 5 También se describen ácidos nucleicos de PS4 que tienen secuencias que se corresponden o que codifican las alteraciones en las secuencias de los polipéptidos variantes de PS4 para su uso en la producción de dichos polipéptidos para los objetivos descritos en la presente. Por tanto, se proporcionan ácidos nucleicos capaces de codificar cualquier secuencia de polipéptido indicada en este documento.

- 10 Los expertos en la técnica serán conscientes de la relación entre una secuencia de ácido nucleico y una secuencia de polipéptido, en particular, el código genético y la degeneración de este código, y serán capaces de construir estos ácidos nucleicos de PS4 sin dificultad. Por ejemplo, sabrán que para cada sustitución de aminoácido en la secuencia del polipéptido variante de PS4 puede haber uno o más codones que codifiquen el aminoácido sustituido. Por consiguiente, es evidente que, dependiendo de la degeneración del código genético con respecto a ese resto aminoácido concreto, pueden generarse una o más secuencias de ácidos nucleicos de PS4 que se corresponden con esa secuencia de polipéptido variante de PS4. Además, cuando el polipéptido variante de PS4 comprende más de una sustitución, por ejemplo, H307K/G70D, los correspondientes ácidos nucleicos de PS4 pueden comprender combinaciones apareadas de los codones que codifican respectivamente los dos cambios de aminoácidos.

Las secuencias de ácidos nucleicos variantes de PS4 pueden obtenerse a partir de ácidos nucleicos de origen que codifican cualquiera de los polipéptidos de origen descritos anteriormente. En particular, los ácidos nucleicos de

origen pueden comprender secuencias de tipo salvaje, por ejemplo, SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:12. Por tanto, los ácidos nucleicos variantes de PS4 pueden comprender ácidos nucleicos que codifican exoamilasas no maltogénicas de tipo salvaje, pero que codifican otro aminoácido en la posición pertinente en lugar del resto aminoácido de tipo salvaje. Las secuencias de ácidos nucleicos variantes de PS4 también pueden comprender secuencias de tipo salvaje con una o más mutaciones, por ejemplo, que codifican los polipéptidos de origen descritos anteriormente bajo el epígrafe "Combinaciones".

Se entenderá que las secuencias de ácidos nucleicos que no son idénticas a las secuencias de ácidos nucleicos variantes de PS4 concretas, pero que están relacionadas con estas, también serán útiles para los métodos y las composiciones descritos en la presente, tales como un variante, homólogo, derivado o fragmento de una secuencia de ácido nucleico variante de PS4, o un complemento o una secuencia capaz de hibridarse con estos. A menos que el contexto indique lo contrario, la expresión "ácido nucleico variante de PS4" incluye cada una de las entidades listadas anteriormente.

Pueden realizarse mutaciones en una secuencia de aminoácidos y en una secuencia de ácido nucleico mediante cualquiera de una serie de técnicas, tal como se conoce en la técnica. Pueden fabricarse con facilidad secuencias variantes empleando cualquiera de las técnicas de mutagénesis conocidas, por ejemplo, la mutagénesis dirigida específica de sitio empleando una PCR con cebadores oligonucleotídicos apropiados, mutagénesis de adición 5', mutagénesis de cebadores desapareados, etc. Como alternativa, o además, las secuencias de ácidos nucleicos variantes de PS4 pueden fabricarse *de novo*.

En realizaciones particularmente preferidas, las mutaciones se introducen en las secuencias de origen por medio de una PCR (reacción en cadena de polimerasa) empleando cebadores apropiados, tal como se ilustra en los ejemplos. Por tanto, es posible alterar la secuencia de un polipéptido introduciendo cualquier sustitución de aminoácido deseada en un polipéptido de origen, preferiblemente que tenga actividad exoamilasa no maltogénica, tal como en una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* o *Pseudomonas stutzeri* a nivel de aminoácidos o de ácido nucleico, tal como se describe. Se describe un método en el que la secuencia de una exoamilasa no maltogénica se altera alterando la secuencia de un ácido nucleico que codifica la exoamilasa no maltogénica.

Sin embargo, se apreciará, por supuesto, que no es necesario que el polipéptido variante de PS4 de hecho se obtenga realmente a partir de una secuencia de polipéptido o de ácido nucleico de tipo salvaje por medio, por ejemplo, de una mutación paso a paso. Por el contrario, cuando ya se ha establecido la secuencia del polipéptido variante de PS4, los expertos en la técnica pueden fabricar esa secuencia con facilidad a partir del tipo salvaje con todas las mutaciones, mediante medios conocidos en la técnica, por ejemplo empleando cebadores oligonucleotídicos apropiados y una PCR. De hecho, el polipéptido variante de PS4 puede fabricarse *de novo* con todas sus mutaciones, por ejemplo, mediante una metodología de síntesis de péptidos.

Sin embargo, en general, los polipéptidos y/o ácidos nucleicos variantes de PS4 se obtienen o pueden obtenerse a partir de una secuencia de "precursor". El término "precursor", tal como se emplea en la presente, significa una enzima que precede a la enzima que se modifica según los métodos y las composiciones descritos en la presente. Por tanto, un precursor incluye una enzima empleada para producir una enzima modificada. Así, el precursor puede ser una enzima que se modifica mediante mutagénesis, tal como se describe en otro punto en este documento. De modo similar, el precursor puede ser una enzima de tipo salvaje, un variante de una enzima de tipo salvaje o una enzima que ya ha sido mutada.

Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes de PS4 pueden producirse mediante cualquier medio conocido en la técnica. De modo específico, pueden ser expresados a partir de sistemas de expresión, que pueden *in vitro* o *in vivo* en la naturaleza. De modo específico, se describen plásmidos y vectores de expresión que comprenden secuencias de ácidos nucleicos de PS4 que preferiblemente sean capaces de expresar polipéptidos variantes de PS4. También se describen células y células hospedantes que comprenden y preferiblemente son transformadas con dichos ácidos nucleicos de PS4, plásmidos y vectores, y debe aclararse que estas también se incluyen en este documento.

Los polipéptidos variantes de PS4 pueden fabricarse, por ejemplo, empleando una mutagénesis dirigida específica de sitio empleando una PCR con cebadores oligonucleotídicos apropiados, mutagénesis de adición 5', mutagénesis de cebadores desapareados, etc., tal como se describe en el ejemplo 4A. Para producir los polipéptidos variantes de PS4 con mutaciones en la posición 307, por ejemplo, puede fabricarse una secuencia de ácido nucleico que se corresponde con una secuencia de pSac-pMD229, una secuencia de nucleótidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 17 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón (SEQ ID NO:14) e introducirse los cambios pertinentes. Sin embargo, los expertos en la técnica serán conscientes de que puede emplearse cualquier secuencia de partida adecuada y de que, en efecto, es posible comenzar a partir de una secuencia de exoamilasa de tipo salvaje para obtener el polipéptido variante deseado en una sola etapa o a través de otras secuencias intermedias.

En realizaciones preferidas, la secuencia del polipéptido variante de PS4 se emplea como aditivo alimentario en forma aislada. El término "aislado" significa que la secuencia está al menos sustancialmente exenta de al menos otro componente con el que la secuencia está asociada en la naturaleza y de la forma en que se encuentra en la naturaleza. En un aspecto, preferiblemente la secuencia está en forma purificada. El término "purificado" significa

que la secuencia se encuentra en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente 90% puro, o al menos aproximadamente 95% puro, o al menos aproximadamente 98% puro.

En realizaciones muy preferidas, la secuencia de ácido nucleico comprende las secuencias mostradas en SEQ ID NO:22, 24 o 26.

5 Numeración de las posiciones

Todas las posiciones mencionadas en el presente documento mediante una numeración se refieren a la numeración de una secuencia de referencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* mostrada a continuación (SEQ ID NO:1):

```

1  DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APNDWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVWP
61 RDFSSWTDGG KSGGGEGYFW HDFNKNRGYR SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPMHMNR
121 GYPDKEINLP AGQGFWRNDC ADPGNYPNDC DDGDRFIGGE SDLNTGHPQI YGMFRDELAN
181 LRSGYGAGGF RFDVFVRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVDEL WKGPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTfv DNHDTGYSpg
301 QNGGQHWWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWSHMYDWG YGDFIRQLIQ VRRTAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVAVSG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
421 GDGGGNDGGE GGLVNVNFRD DNGVTQMGS VYAVGNVSQL GNWSPASAVR LTDTSSSYPTW
481 KGSIALPDGQ NVEWKCLIRN EADATLVRQW QSGGNNQVQA AAGASTSGSF

```

10 La secuencia de referencia se deriva de la secuencia de *Pseudomonas saccharophila* que tiene el n.º de registro de SWISS-PROT P22963, pero sin la secuencia señal MSHILRAAVLAAVLLPFPALA.

El dominio de unión a almidón C-terminal EGGLVNVNFR CDNGVTQMGS VYAVGNVSQL LGNWSPASAV RLDTSSSYPT WKGSIAPDG QNVEWKCLIR NEADATLVRQ WQSGGNNQVQ AAAGASTSGS F puede deleccionarse o descartarse opcionalmente. Como alternativa, puede incluirse en la secuencia del polipéptido variante de PS4.

15 En el contexto de la presente descripción, se emplea una numeración específica de posiciones de restos aminoácidos en las enzimas exoamilasas PS4. A este respecto, mediante el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de diversas exoamilasas conocidas es posible asignar, sin ambigüedad, un número de posición de un aminoácido de la exoamilasa a cualquier posición de un resto aminoácido en cualquier enzima exoamilasa, cuya secuencia de aminoácidos sea conocida. Empleando este sistema de numeración que se origina, por ejemplo, de la secuencia de aminoácidos de la exoamilasa obtenida de *Pseudomonas saccharophila*, alineada con las secuencias de aminoácidos de una serie de otras exoamilasas conocidas, es posible indicar la posición de un resto aminoácido en una exoamilasa sin ambigüedad.

20 Por tanto, el sistema de numeración, aunque puede emplear una secuencia específica como punto de referencia de base, también es aplicable a todas las secuencias homólogas pertinentes. Por ejemplo, la numeración de las posiciones puede aplicarse a secuencias homólogas de otras especies de *Pseudomonas* o de secuencias homólogas de otras bacterias. Preferiblemente, estos homólogos tienen una homología de 60% o mayor, por ejemplo, una homología de 70% o mayor, 80% o mayor, 90% o mayor, o 95% o mayor, con la secuencia de referencia SEQ ID NO:1 anterior, o las secuencias que tienen un n.º de serie de SWISS-PROT P22963 o P13507, preferiblemente con todas estas secuencias. La homología de secuencia entre proteínas puede determinarse empleando programas de alineamiento muy conocidos y técnicas de hibridación descritas en la presente. Estas secuencias homólogas, así como los equivalentes funcionales descritos a continuación, se denominarán en este documento la "familia de PS4".

25 Además, y tal como se indicó anteriormente, el sistema de numeración empleado en este documento se remite a una secuencia de referencia SEQ ID NO:1, que se deriva de la secuencia de *Pseudomonas saccharophila* que tiene el n.º de registro de SWISS-PROT P22963, pero sin la secuencia señal MSHILRAAVLAAVLLPFPALA. Esta secuencia señal está localizada N-terminal de la secuencia de referencia y consiste en 21 restos aminoácidos. Por consiguiente, resultará trivial identificar los restos concretos que se van a mutar o sustituir en las correspondientes secuencias que comprenden la secuencia señal ni tampoco en las correspondientes secuencias que comprenden cualquier otra extensión o deleción N- o C-terminal. Con relación a las adiciones o deleciones N-terminales, todo lo que se requiere es compensar la numeración de las posiciones por el número de restos insertados o deleccionados. Por ejemplo, la posición 1 en SEQ ID NO:1 se corresponde con la posición 22 en una secuencia con la secuencia señal.

Polipéptido/enzima de origen

35 Los polipéptidos variantes de PS4 se derivan o son variantes de otra secuencia, conocida como "enzima de origen", "polipéptido de origen" o "secuencia de origen".

45 La expresión "enzima de origen", tal como se emplea en este documento, significa la enzima que tiene una

estructura química similar, preferiblemente la más similar, al variante resultante, concretamente, el polipéptido o ácido nucleico variante de PS4. La enzima de origen puede ser una enzima precursora (es decir, la enzima que realmente se muta) o puede prepararse *de novo*. La enzima de origen puede ser una enzima de tipo salvaje, o puede ser una enzima de tipo salvaje que comprende una o más mutaciones.

- 5 El término "precursor", tal como se emplea en la presente, significa una enzima que precede a la enzima que se modifica para producir la enzima. Así, el precursor puede ser una enzima que se modifica mediante mutagénesis. De modo similar, el precursor puede ser una enzima de tipo salvaje, un variante de una enzima de tipo salvaje o una enzima que ya ha sido mutada.

- 10 La expresión "de tipo salvaje" es una expresión que entienden los expertos en la técnica y significa un fenotipo que es característico de la mayoría de los miembros de una especie que aparece en la naturaleza y que contrasta con el fenotipo de un mutante. Así, en el presente contexto, la enzima de tipo salvaje es una forma de la enzima que se encuentra en la naturaleza en la mayoría de los miembros de la especie pertinente. En general, la enzima de tipo salvaje pertinente en relación con los polipéptidos variantes descritos en la presente es la enzima de tipo salvaje correspondiente que está más relacionada en términos de homología de secuencia. Sin embargo, cuando se ha empleado una secuencia de tipo salvaje concreta como base para producir un polipéptido variante de PS4 según se describe en la presente, esta será la correspondiente secuencia de tipo salvaje independientemente de la existencia de otra secuencia de tipo salvaje que esté más relacionada en términos de homología de secuencia de aminoácidos.

- 15 El polipéptido o enzima de origen puede ser cualquier polipéptido de origen adecuado. Preferiblemente, puede tener algo de actividad enzimática. Preferiblemente, esta actividad enzimática es una actividad amilasa. Más preferiblemente, el polipéptido de origen comprende una actividad exoamilasa.

- 20 La enzima de origen preferiblemente es un polipéptido que muestra preferiblemente una actividad exoamilasa no maltogénica. Preferiblemente, la enzima de origen es, en sí misma, una exoamilasa no maltogénica. Por ejemplo, la enzima de origen puede ser una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila*, tal como un polipéptido que tiene el n.º de registro de SWISS-PROT P22963, o una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri*, tal como un polipéptido que tiene el n.º de registro de SWISS-PROT P13507.

Pueden emplearse otros miembros de la familia de PS4 como enzimas de origen; estos "miembros de la familia de PS4" en general serán similares, homólogos o funcionalmente equivalentes con cualquiera de estas dos enzimas, y pueden identificarse por medio de métodos convencionales, tales como una selección con hibridación de un banco adecuado empleando sondas, o mediante análisis de la secuencia del genoma.

- 30 En particular, los equivalentes funcionales de cualquiera de estas dos enzimas, así como de otros miembros de la "familia de PS4" también pueden utilizarse como puntos de partida o polipéptidos de origen para la generación de los polipéptidos variantes de PS4, tal como se describe en la presente.

- 35 Un "equivalente funcional" de una proteína significa algo que comparte una o más, preferiblemente casi todas las funciones de esa proteína. Preferiblemente, estas funciones son funciones biológicas, preferiblemente funciones enzimáticas, tales como una actividad amilasa, preferiblemente una actividad exoamilasa no maltogénica. Estas funciones pueden incluir cualquier propiedad de la proteína, que incluye la exoespecificidad, la termoestabilidad y una manipulación mejorada, tal como firmeza, resiliencia, cohesividad, desmigajamiento y plegabilidad (tal como se describe a continuación).

- 40 Con relación a una enzima de origen, la expresión "equivalente funcional" significa preferiblemente una molécula que presenta una función similar o idéntica a una molécula de origen. La molécula de origen puede ser una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila* o una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri* o un polipéptido obtenido a partir de otras fuentes.

- 45 La expresión "equivalente funcional" con relación a una enzima de origen que es una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila*, tal como un polipéptido que tiene el n.º de registro de SWISS-PROT P22963, o una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri*, tal como un polipéptido que tiene el n.º de registro de SWISS-PROT P13507, significa que el equivalente funcional puede obtenerse a partir de otras fuentes. La enzima funcionalmente equivalente puede tener una secuencia de aminoácidos diferentes, pero presentará una actividad exoamilasa no maltogénica. En la presente se describen ejemplos de ensayos para determinar la funcionalidad y son conocidos por los expertos en la técnica.

- 50 En realizaciones muy preferidas, el equivalente funcional presentará homología de secuencia con las exoamilasas no maltogénicas de *Pseudomonas saccharophila* y de *Pseudomonas stutzeri* mencionadas anteriormente, con ambas preferiblemente. El equivalente funcional también puede presentar homología de secuencia con cualquiera de las secuencias indicadas en SEQ ID NO:1 a 14, preferiblemente SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:7 o ambas. La homología de secuencia entre dichas secuencias es preferiblemente de al menos 60%, preferiblemente 65% o mayor, preferiblemente 75% o mayor, preferiblemente 80% o mayor, preferiblemente 85% o mayor, preferiblemente 90% o mayor, preferiblemente 95% o mayor. Estas homologías de secuencia pueden generarse mediante cualquiera de una serie de programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo BLAST o FASTA, etc. Un programa informático adecuado para realizar dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of

Wisconsin, EE. UU.; Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Research*, 12:387). Los ejemplos de otros tipos de software que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan al paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* - capítulo 18), FASTA (Atschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) y el paquete de programas GENEWORKS de herramientas de comparación. BLAST y FASTA están disponibles para una búsqueda en línea y fuera de línea (véase Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, pp. 7-58 a 7-60). Sin embargo, se prefiere emplear el programa GCG Bestfit.

En otras realizaciones, los equivalentes funcionales serán capaces de hibridarse específicamente con cualquiera de las secuencias indicadas anteriormente. Los métodos para determinar si una secuencia es capaz de hibridarse con otra son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook, *et al.* (*supra*) y Ausubel, F. M., *et al.* (*supra*). En realizaciones muy preferidas, los equivalentes funcionales son capaces de hibridarse bajo condiciones rigurosas, por ejemplo, 65°C y 0,1x SSC {1x SSC = NaCl 0,15, Na₃ citrato 0,015 M, pH 7,0}.

Por ejemplo, los equivalentes funcionales que presentan homología de secuencia con las exoamilasas no maltogénicas de *Pseudomonas saccharophila* y *Pseudomonas stutzeri* son adecuados para su uso como enzimas de origen. Estas secuencias pueden diferir de la secuencia de *Pseudomonas saccharophila* en una o más posiciones. Además, también pueden emplearse exoamilasas no maltogénicas procedentes de otras cepas de *Pseudomonas* spp, tal como ATCC17686, como polipéptido de origen. Los restos del polipéptido variante de PS4 pueden insertarse en cualquiera de estas secuencias de origen para generar las secuencias de polipéptidos variantes de PS4.

Se entenderá que cuando se desee que los polipéptidos variantes de PS4 comprendan además una o más mutaciones, tal como se indicó anteriormente, las correspondientes mutaciones pueden realizarse en las secuencias de ácidos nucleicos de los equivalentes funcionales de la exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas* spp, así como de otros miembros de la "familia de PS4", para que puedan ser utilizadas como puntos de partida o polipéptidos de origen para la generación de los polipéptidos variantes de PS4, tal como se describe en la presente.

Se incluyen específicamente dentro de la expresión "polipéptidos variantes de PS4" los polipéptidos descritos en los documentos: US 60/485.413. 60/485.539 and 60/485.616; PCT/US2004/021723 and PCT/US2004/021739; US 10/886.905 and 10/866.903; US 60/608.919; US 60/612.407; US 60/485.539; PCT/IB2004/002487; US 10/886.023; US 10/886.505. US 10/886.527 y US 10/886.504; US 10/947.612. Sin embargo, no se admite que estos documentos pertenezcan a la técnica anterior.

Estos polipéptidos son adecuados para su uso en las aplicaciones descritas en la presente, en particular como aditivos alimentarios, para tratar el almidón como se describe, para preparar un producto alimentario, para fabricar un producto de panadería, para la formulación de composiciones mejoradoras, para la formulación de combinaciones, etc.

Modificación de las secuencias de origen

Las enzimas de origen pueden modificarse a nivel de aminoácidos o a nivel de ácido nucleico para generar las secuencias variantes de PS4 descritas en la presente. Por tanto, se proporciona la generación de polipéptidos variantes de PS4 mediante la introducción de uno o más correspondientes cambios de codones en la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de exoamilasa no maltogénica.

La numeración del ácido nucleico se debe realizar preferiblemente remitiéndose a la numeración de las posiciones de una secuencia de nucleótidos de una exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO:6. Como alternativa, o además, es posible remitirse a la secuencia con el n.º de registro de GenBank X16732. En realizaciones preferidas, la numeración del ácido nucleico debe remitirse a la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO:6. Sin embargo, al igual que en la numeración de restos aminoácidos, la numeración de restos de esta secuencia solo debe emplearse con objetivos de referencia. En particular, se apreciará que pueden realizarse los anteriores cambios en los codones en cualquier secuencia de ácido nucleico de la familia de PS4. Por ejemplo, pueden realizarse cambios en la secuencia en una secuencia de ácido nucleico de una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila* o *Pseudomonas stutzeri* (por ejemplo, X16732, SEQ ID NO:6, o M24516, SEQ ID NO:12).

La enzima de origen puede comprender la enzima "completa", es decir, su longitud completa tal como aparece en la naturaleza (o tal como está mutada), o puede comprender una de sus formas truncadas. El variante PS4 derivado de ello, en consiguiente, puede estar truncado de modo similar o ser "de longitud completa". El truncamiento puede realizarse en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal, preferiblemente en el extremo C-terminal. La enzima de origen o el variante de PS4 pueden carecer de una o más porciones, tales como subsecuencias, secuencias señal, dominios o restos, tanto activo como no activos, etc. Por ejemplo, la enzima de origen o el polipéptido variante de PS4 puede carecer de una secuencia señal, tal como se describió anteriormente. Como alternativa, o además, la enzima de origen o el variante de PS4 pueden carecer de uno o más dominios catalíticos o de unión.

En realizaciones muy preferidas, la enzima de origen o el variante de PS4 pueden carecer de uno o más de los dominios presentes en exoamilasas no maltogénicas, tal como el dominio de unión a almidón. Por ejemplo, los polipéptidos de PS4 puede tener la secuencia solo hasta la posición 429, con relación a la numeración de una

exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO:1. Se advertirá que este es el caso de los variantes de PS4 pSac-pMS382, pSac pMS382R y pSac-pMS382H.

5 En otras realizaciones, la enzima de origen o el variante de PS4 pueden comprender una enzima "completa", es decir, en su longitud completa tal como aparece en la naturaleza (o tal como está mutada), junto con una o más secuencias de aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal. Por ejemplo, la enzima de origen o el polipéptido variante de PS4 pueden comprender un único resto aminoácido adicional en el N-terminal o C-terminal, por ejemplo, M, A, G, etc. Preferiblemente, el resto aminoácido adicional está presente en el N-terminal. Cuando se incluyen uno o más restos adicionales, la numeración de las posiciones será compensada por la longitud de la adición.

10 Amilasa

Los polipéptidos variantes de PS4 en general comprenden una actividad amilasa.

El término "amilasa" se emplea en su sentido normal, por ejemplo, una enzima que es capaz, entre otras actividades, de catalizar la degradación del almidón. En particular, son hidrolasas que son capaces de romper los enlaces α -D-(1 \rightarrow 4) O-glicosídicos en el almidón.

15 Las amilasas son enzimas de degradación del almidón, clasificadas como hidrolasas, que rompen los enlaces α -D-(1 \rightarrow 4) O-glicosídicos en el almidón. En general, las α -amilasas (E.C. 3.2.1.1, α -D-(1 \rightarrow 4)-glucano glucohidrolasa) se definen como enzimas de acción endo que rompen los enlaces α -D-(1 \rightarrow 4) O-glicosídicos dentro de la molécula de almidón de modo aleatorio. Por contraste, las enzimas amilolíticas de acción exo, tales como las β -amilasas (E.C. 20 3.2.1.2, α -D-(1 \rightarrow 4)-glucano maltohidrolasa), y algunas amilasas específicas de producto, tales como la alfa-amilasa maltogénica (E.C. 3.2.1.133), rompen la molécula de almidón desde el extremo no reductor del sustrato. Las β -amilasas, α -glucosidasas (E.C. 3.2.1.20, α -D-glucósido glucohidrolasa), la glucoamilasa (E.C. 3.2.1.3, α -D-(1 \rightarrow 4)-glucano glucohidrolasa), y las amilasas específicas de producto pueden producir malto-oligosacáridos de una longitud específica a partir del almidón.

Exoamilasa no maltogénica

25 Los polipéptidos variantes de PS4 descritos en este documento se derivan (o son variantes) de polipéptidos que preferiblemente muestran una actividad exoamilasa no maltogénica. Preferiblemente, estas enzimas de origen son, en sí mismas, exoamilasas no maltogénicas. Los propios polipéptidos variantes de PS4, en realizaciones muy preferidas, también muestran una actividad exoamilasa no maltogénica.

30 En realizaciones muy preferidas, la expresión "enzima exoamilasa no maltogénica", tal como se emplea en este documento, debe entenderse que significa que la enzima no degrada inicialmente el almidón para producir cantidades sustanciales de maltosa, tal como se analiza según el procedimiento de determinación del producto como se describe en este documento.

35 En realizaciones muy preferidas, la exoamilasa no maltogénica comprende una exomaltotetrahidrolasa. La exomaltotetrahidrolasa (E.C.3.2.1.60) se denomina de modo más formal como glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa. Esta enzima hidroliza los enlaces 1,4-alfa-D-glucosídicos en polisacáridos amiláceos para eliminar sucesivos restos maltotetraosa de los extremos no reductores de la cadena.

Las exoamilasas no maltogénicas se describen con detalle en la patente de EE. UU. n.º 6.667.065.

Ensayos para la actividad exoamilasa no maltogénica

40 Se emplea el siguiente sistema para caracterizar polipéptidos que tienen actividad exoamilasa no maltogénica que son adecuados para su uso según los métodos y las composiciones descritos en la presente. Este sistema puede utilizarse, por ejemplo, para caracterizar los polipéptidos de origen o variantes o de PS4 descritos en la presente.

45 Como antecedentes iniciales, la amilopectina de maíz cerosa (que puede obtenerse como WAXILYS 200 en Roquette, Francia) es un almidón con un contenido muy alto en amilopectina (mayor que 90%). Se hierven 20 mg/ml del almidón de maíz ceroso durante 3 min en un tampón de MES (ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico) 50 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 6,0, y después se incuba a 50°C y se usa dentro de media hora.

50 Una unidad de la exoamilasa no maltogénica se define como la cantidad de enzima que libera productos de la hidrólisis equivalentes a 1 μ mol de azúcar reductor por min cuando se incuba a 50 °C en un tubo de ensayo con 4 ml de almidón de maíz ceroso 10 mg/ml en MES 50 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 6,0, preparado como se describió anteriormente. Los azúcares reductores se miden empleando maltosa como patrón y usando el método del ácido dinitrosalicílico de Bernfeld, *Methods Enzymol.*, (1954), 1, 149-158, u otro método conocido en la técnica para cuantificar azúcares reductores.

El patrón de productos de la hidrólisis de la exoamilasa no maltogénica se determina incubando 0,7 unidades de exoamilasa no maltogénica durante 15 o 300 min a 50°C en un tubo de ensayo con 4 ml de almidón de maíz ceroso 10 mg/ml en el tampón preparado como se describió anteriormente. La reacción se detiene sumergiendo el tubo de

ensayo durante 3 min en un baño de agua hirviendo.

Los productos de la hidrólisis se analizan y se cuantifican mediante una HPLC de intercambio aniónico empleando una columna Dionex PA 100 con acetato de sodio, hidróxido de sodio y agua como eluyentes, con detección amperométrica pulsada y con malto-oligosacáridos lineales conocidos de la glucosa a la maltoheptaosa como patrones. El factor de respuesta utilizado para la malto-octaosa a la maltodecaosa es el factor de respuesta determinado para la maltoheptaosa.

Preferiblemente, los polipéptidos variantes de PS4 tienen una actividad exoamilasa no maltogénica de modo que si una cantidad de 0,7 unidades de dicha exoamilasa no maltogénica se incuba durante 15 minutos a una temperatura de 50°C a pH 6,0 en 4 ml de una disolución acuosa de 10 mg de almidón de maíz ceroso prehervido por ml de disolución tamponada que contiene ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico 50 mM y cloruro de calcio 2 mM, entonces la enzima producirá uno o más productos de la hidrólisis que consisten en uno o más malto-oligosacáridos lineales de dos a diez unidades de D-glucopiranosilo y opcionalmente glucosa; de modo que al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80% y lo más preferiblemente al menos 85% en peso de dichos productos de la hidrólisis consisten en malto-oligosacáridos lineales de tres a diez unidades de D-glucopiranosilo, preferiblemente de malto-oligosacáridos lineales que consisten en cuatro a ocho unidades de D-glucopiranosilo.

Para facilitar la referencia y para los presentes objetivos, la característica de incubar una cantidad de 0,7 unidades de la exoamilasa no maltogénica durante 15 minutos a una temperatura de 50°C a pH 6,0 en 4 ml de una disolución acuosa de 10 mg de almidón de maíz ceroso prehervido por ml de disolución tamponada que contiene ácido 2-(N-morfolino)etansulfónico 50 mM y cloruro de calcio 2 mM puede indicarse como el "ensayo de incubación de almidón de maíz ceroso".

Así, expresado de otra forma, los polipéptidos variantes de PS4 preferidos que son exoamilasas no maltogénicas se caracterizan porque tienen la capacidad, en el ensayo de incubación de almidón de maíz ceroso, de producir uno o más productos de la hidrólisis que consisten en uno o más malto-oligosacáridos lineales de dos a diez unidades de D-glucopiranosilo y opcionalmente glucosa; de modo que al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80% y lo más preferiblemente al menos 85% en peso de dichos productos de la hidrólisis consistirán en malto-oligosacáridos lineales de tres a diez unidades de D-glucopiranosilo, preferiblemente de malto-oligosacáridos lineales que consisten en cuatro a ocho unidades de D-glucopiranosilo.

Los productos de la hidrólisis en el ensayo de incubación de almidón de maíz ceroso pueden incluir uno o más malto-oligosacáridos lineales de dos a diez unidades de D-glucopiranosilo y opcionalmente glucosa. Los productos de la hidrólisis en el ensayo de incubación de almidón de maíz ceroso también pueden incluir otros productos hidrolíticos. No obstante, las cantidades de porcentaje en peso de malto-oligosacáridos lineales de tres a diez unidades de D-glucopiranosilo se basan en la cantidad del producto de la hidrólisis que consiste en uno o más malto-oligosacáridos lineales de dos a diez unidades de D-glucopiranosilo y opcionalmente glucosa. En otras palabras, las cantidades de porcentaje en peso de malto-oligosacáridos lineales de tres a diez unidades de D-glucopiranosilo no se basan en la cantidad del producto de la hidrólisis que son distintos de uno o más malto-oligosacáridos lineales de dos a diez unidades de D-glucopiranosilo y glucosa.

Los productos de la hidrólisis pueden analizarse mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, los productos de la hidrólisis pueden analizarse mediante una HPLC de intercambio aniónico empleando una columna Dionex PA 100 con detección amperométrica pulsada y, por ejemplo, con malto-oligosacáridos lineales conocidos de la glucosa a la maltoheptaosa como patrones.

Para facilitar la referencia y para los presentes objetivos, la característica de analizar el producto o productos de la hidrólisis usando una HPLC de intercambio aniónico empleando una columna Dionex PA 100 con detección amperométrica pulsada y con malto-oligosacáridos lineales conocidos de la glucosa a la maltoheptaosa como patrones puede indicarse como "análisis mediante intercambio aniónico". Por supuesto, y tal como se ha indicado, bastarían otras técnicas analíticas, así como otras técnicas de intercambio aniónico específicas.

Así, expresado de otra forma, un polipéptido variante de PS4 preferido es un polipéptido que presenta actividad exoamilasa no maltogénica, de modo que tiene la capacidad, en el ensayo de incubación de almidón de maíz ceroso, de producir uno o más productos de la hidrólisis que consisten en uno o más malto-oligosacáridos lineales de dos a diez unidades de D-glucopiranosilo y opcionalmente glucosa, y dichos productos de la hidrólisis pueden ser analizados mediante intercambio aniónico; de modo que al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80% y lo más preferiblemente al menos 85% en peso de dichos productos de la hidrólisis consistirán en malto-oligosacáridos lineales de tres a diez unidades de D-glucopiranosilo, preferiblemente de malto-oligosacáridos lineales que consisten en cuatro a ocho unidades de D-glucopiranosilo.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "malto-oligosacárido lineal" se emplea en el sentido normal y significa 2-10 unidades de α -D-glucopiranosas unidas por medio de un enlace α -(1 \rightarrow 4).

En realizaciones muy preferidas, los polipéptidos de PS4 descritos en la presente tienen una actividad exoamilasa mejorada, preferiblemente una actividad exoamilasa no maltogénica, cuando se comparan con el polipéptido de origen, preferiblemente cuando se ensayan bajo las mismas condiciones. En particular, en realizaciones muy

preferidas, los polipéptidos variantes de PS4 tienen 10% o más, preferiblemente 20% o más, preferiblemente 50% o más actividad exoamilasa comparado con sus polipéptidos de origen, preferiblemente cuando se miden en un ensayo de almidón de maíz ceroso.

5 Los productos de la hidrólisis pueden analizarse mediante cualquier medio adecuado. Por ejemplo, los productos de la hidrólisis pueden analizarse mediante una HPLC de intercambio aniónico empleando una columna Dionex PA 100 con detección amperométrica pulsada y, por ejemplo, con malto-oligosacáridos lineales conocidos de la glucosa a la maltoheptaosa como patrones.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "malto-oligosacárido lineal" se emplea en el sentido normal y significa 2-10 unidades de α -D-glucopiranosas unidas por medio de un enlace α -(1 \rightarrow 4).

10 Propiedades de manipulación mejoradas

15 Los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente presentan propiedades mejoradas comparados con sus enzimas de origen, tales como una o más de una mejor termoestabilidad, mejor estabilidad frente al pH o mejor exoespecificidad. Los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente también presentan propiedades de manipulación mejoradas, de modo que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta uno o más de una menor firmeza, una mayor resiliencia, una mayor cohesividad, un menor desmigajamiento o una mayor plegabilidad, comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.

20 Sin pretender quedar limitado por teoría alguna, los inventores creen que las mutaciones en las posiciones concretas tienen efectos individuales y acumulativos sobre las propiedades de un polipéptido que comprende dichas mutaciones.

Termoestabilidad y estabilidad frente al pH

Preferiblemente, el polipéptido variante de PS4 es termoestable; preferiblemente, tienen mayor termoestabilidad que su enzima de origen.

25 En el trigo y otros cereales, las cadenas laterales externas en la amilopectina están en el intervalo de DP 12-19. Por tanto, la hidrólisis enzimática de las cadenas laterales de la amilopectina, por ejemplo, por los polipéptidos variantes de PS4, según se ha descrito, que tienen actividad exoamilasa no maltogénica, puede reducir notablemente sus tendencias de cristalización.

30 El almidón en el trigo y otros cereales empleados para objetivos de horneado está presente en forma de gránulos de almidón que, en general, son resistentes al ataque enzimático por las amilasas. Esta modificación del almidón principalmente está limitada al almidón dañado y avanza con mucha lentitud durante el procesamiento de la masa y el horneado inicial hasta que la gelatinización comienza a aproximadamente 60 °C. Como consecuencia de ello, solo las amilasas con un alto grado de termoestabilidad son capaces de modificar el almidón con eficacia durante el horneado. Y, en general, la eficacia de las amilasas aumenta a medida que aumenta la termoestabilidad. Esto es debido a que cuanto más termoestable sea la enzima, más tiempo puede estar activa durante el horneado y, por tanto, más efecto antienranciamiento proporcionará.

35 Por consiguiente, el uso de polipéptidos variantes de PS4, tal como se describe en la presente, cuando se añaden al almidón en cualquier etapa de su procesamiento para producir un producto alimentario, por ejemplo, antes, durante o después del horneado para producir pan, puede retrasar o impedir o frenar la retrogradación. Este uso se describe con más detalle a continuación.

40 Tal como se emplea en la presente, el término "termoestable" se refiere a la capacidad de la enzima para conservar la actividad después de su exposición a temperaturas elevadas. Preferiblemente, el polipéptido variante de PS4 es capaz de degradar el almidón a unas temperaturas de aproximadamente 55°C a aproximadamente 80°C o más. De modo adecuado, la enzima conserva su actividad después de la exposición a temperaturas de hasta aproximadamente 95°C.

45 La termoestabilidad de una enzima, tal como una exoamilasa no maltogénica, se mide por medio de su semivida. Así, los polipéptidos variantes de PS4 descritos en la presente tienen unas semividas extendidas con relación a la enzima de origen preferiblemente en 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más, preferiblemente a temperaturas elevadas de 55°C a aproximadamente 95°C o más, preferiblemente a aproximadamente 80°C.

50 Tal como se emplea en la presente, la semivida ($t_{1/2}$) es el tiempo (en minutos) durante el cual la mitad de la actividad enzimática se inactiva bajo condiciones de calor definidas. En realizaciones preferidas, la semivida se ensaya a 80 °C. Preferiblemente, la muestra se calienta durante 1-10 minutos a 80°C o mayor. Entonces se calcula el valor de la semivida midiendo la actividad amilasa residual mediante cualquier de los métodos descritos en la presente. Preferiblemente, se realiza un ensayo de la semivida como se describe con más detalle en los ejemplos.

Preferiblemente, los variantes de PS4 descritos en la presente son activos durante el horneado e hidrolizan el almidón durante y después de la gelatinización de los gránulos de almidón, que comienza a unas temperaturas de aproximadamente 55°C. Cuanto más termoestable sea la exoamilasa no maltogénica, mayor es el tiempo que puede estar activa y, por tanto, más efecto antienranciamiento proporcionará. Sin embargo, durante el horneado a temperaturas mayores que aproximadamente 85°C puede producirse la inactivación de la enzima. Si esto ocurre, la exoamilasa no maltogénica puede ser gradualmente inactivada, de modo que no exista sustancialmente actividad después del proceso de horneado en el pan final. Por tanto, preferentemente, las exoamilasas no maltogénicas adecuadas para su uso, tal como se describe, tendrán una temperatura óptima por encima de 50°C y por debajo de 98°C.

La termoestabilidad de los variantes de PS4 descritos en la presente puede mejorar empleando la modificación de proteínas para que sean más termoestables y, por tanto, más adecuadas para los usos descritos en la presente; por tanto, se incluye el uso de los variantes de PS4 modificados para que sean más termoestables por medio de la modificación de proteínas.

Preferiblemente, el polipéptido variante de PS4 es estable frente al pH; más preferiblemente, tiene una estabilidad mayor frente al pH que su polipéptido de origen cognado. Tal como se emplea en la presente, la expresión "estable frente al pH" se refiere a la capacidad de la enzima para conservar la actividad a través de un amplio intervalo de pH. Preferiblemente, el polipéptido variante de PS4 es capaz de degradar el almidón a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10,5. En una realización, el grado de estabilidad frente al pH puede ensayarse midiendo la semivida de la enzima en condiciones de pH específicas. En otra realización, el grado de estabilidad frente al pH puede ensayarse midiendo la actividad o la actividad específica de la enzima en condiciones de pH específicas. Las condiciones de pH específicas pueden ser cualquier pH de pH 5 a pH 10,5.

Así, el polipéptido variante de PS4 puede tener una semivida más larga, o una mayor actividad (dependiendo del ensayo), cuando se compara con el polipéptido de origen en condiciones idénticas. Los polipéptidos variantes de PS4 pueden tener una semivida 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o mayor cuando se comparan con sus polipéptidos de origen bajo condiciones idénticas de pH. Como alternativa, o además, pueden presentar esta actividad mayor cuando se comparan con el polipéptido de origen en condiciones idénticas de pH.

Exoespecificidad

Se sabe que algunas exoamilasas no maltogénicas pueden presentar cierto grado de actividad endoamilasa. En algunos casos, puede resultar necesario reducir o eliminar este tipo de actividad, puesto que la actividad endoamilasa puede quizás afectar negativamente a la calidad del producto de pan final produciendo una miga pegajosa o gomosa debido a la acumulación de dextrinas ramificadas.

La exoespecificidad puede medirse, de forma útil, determinando la proporción de actividad amilasa total a la actividad endoamilasa total. Esta proporción se indica en este documento como el "índice de exoespecificidad". En realizaciones preferidas, una enzima se considera una exoamilasa si presenta un índice de exoespecificidad de 20 o mayor, es decir, su actividad amilasa total (que incluye la actividad exoamilasa) es 20 veces o mayor que su actividad endoamilasa. En realizaciones muy preferidas, el índice de exoespecificidad de las exoamilasas es de 30 o mayor, 40 o mayor, 50 o mayor, 60 o mayor, 70 o mayor, 80 o mayor, 90 o mayor, o 100 o mayor. En realizaciones muy preferidas, el índice de exoespecificidad es de 150 o mayor, 200 o mayor, 300 o mayor, 400 o mayor, 500 o mayor o 600 o mayor.

La actividad amilasa total y la actividad endoamilasa pueden medirse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la actividad amilasa total puede medirse ensayando el número total de extremos reductores liberados de un sustrato de almidón. Como alternativa, el uso de un ensayo de betamilo se describe con más detalle en los ejemplos y, por conveniencia, la actividad amilasa, tal como se ensaya en los ejemplos, se describe en términos de "unidades de betamilo" en las tablas.

La actividad endoamilasa puede ensayarse empleando un kit Phadebas (Pharmacia and Upjohn). Este emplea un almidón reticulado marcado con azul (marcado con un tinte azoico); solo los cortes internos en la molécula de almidón liberan el marcador, mientras que los cortes internos no lo liberan. La liberación del tinte puede medirse mediante una espectrofotometría. Por consiguiente, el kit Phadebas mide la actividad endoamilasa y, por conveniencia, los resultados de dicho ensayo (descrito en los ejemplos) se indican en este documento como "unidades Phadebas".

Por tanto, en una realización muy preferida, el índice de exoespecificidad se expresa en términos de unidades de betamilo/unidades Phadebas, también indicado como "B/Phad".

La exoespecificidad también puede ensayarse según los métodos descritos en la técnica anterior, por ejemplo, en la publicación de patente internacional de los inventores n.º WO99/50399. Este mide la exoespecificidad por medio de la proporción entre la actividad endoamilasa a la actividad exoamilasa. Así, en un aspecto preferido, los variantes de PS4 descritos en la presente presentarán menos de 0,5 unidades endoamilasa (EAU) por unidad de actividad exoamilasa. Preferiblemente, las exoamilasas no maltogénicas que son adecuadas para su uso según la presente invención presentan menos de 0,05 EAU por unidad de actividad exoamilasa, y más preferiblemente menos de 0,01

EAU por unidad de actividad exoamilasa.

5 Los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente mostrarán exoespecificidad, por ejemplo, medida mediante los índices de exoespecificidad, tal como se describió anteriormente, lo cual resulta coherente con el hecho de ser exoamilasas. Además, preferiblemente tendrán una exoespecificidad mayor o aumentada cuando se comparan con las enzimas de origen o los polipéptidos de los cuales proceden. Así, por ejemplo, los polipéptidos variantes de PS4 pueden tener un índice de exoespecificidad 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o mayor cuando se comparan con sus polipéptidos de origen, preferiblemente en condiciones idénticas. Pueden tener 1,5x o mayor, 2x o mayor, 5 x o mayor, 10 x o mayor, 50 x o mayor, 100 x o mayor, cuando se comparan con sus polipéptidos de origen, preferiblemente en condiciones idénticas.

10 Propiedades de manipulación mejoradas

Los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente comprenden una o más propiedades de manipulación mejoradas con respecto a un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje. Las propiedades de manipulación mejoradas pueden comprender, en realizaciones preferidas, unas propiedades de horneado mejoradas.

15 Así, los variantes de PS4 son de tal forma que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta una manipulación mejorada o, preferiblemente, una propiedad de horneado mejorada, comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje. La propiedad de manipulación u horneado puede seleccionarse del grupo que consiste en firmeza, resiliencia, cohesividad, desmigajamiento y plegabilidad.

20 Estas propiedades de manipulación pueden ensayarse mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, la firmeza, la resiliencia y la cohesividad pueden determinarse ensayando rebanadas de pan mediante el análisis del perfil de texturas empleando, por ejemplo, un analizador de texturas, según se describe en los ejemplos.

Firmeza

25 Los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente son de tal forma que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta una menor firmeza comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.

La firmeza, en realizaciones alternativas, se correlaciona inversamente con la blandura del producto alimentario; así, una mayor blandura puede reflejar una menor firmeza y viceversa.

La firmeza se mide preferiblemente mediante el "protocolo de evaluación de la firmeza" indicado en el ejemplo 13.

30 Así, los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente son de tal forma que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o superior de menor firmeza comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje. Un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 puede tener un 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o superior de menor firmeza comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.

35

Resiliencia

Los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente son de tal forma que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta una mayor resiliencia comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.

40 La resiliencia se mide preferiblemente mediante el "protocolo de evaluación de la resiliencia" indicado en el ejemplo 14.

45 Así, los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente son de tal forma que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o superior de mayor resiliencia comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje. Un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 puede tener un 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o superior de mayor resiliencia comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.

Cohesividad

50 Los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente son de tal forma que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta una mayor cohesividad comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.

La cohesividad se mide preferiblemente mediante el "protocolo de evaluación de la cohesividad" indicado en el

ejemplo 15.

5 Así, los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente son de tal forma que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o superior de mayor cohesividad comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje. Un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 puede tener un 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o superior de mayor cohesividad comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.

Desmigado

10 Los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente son de tal forma que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta un menor desmigajamiento comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.

El desmigajamiento se mide preferiblemente mediante el "protocolo de evaluación del desmigajamiento" indicado en el ejemplo 16.

15 Así, los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente son de tal forma que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o superior de menor desmigajamiento comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje. Un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 puede tener un 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o superior de menor desmigajamiento comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.

20 *Plegabilidad*

Los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente son de tal forma que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta una mayor plegabilidad comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.

25 La plegabilidad se mide preferiblemente mediante el "protocolo de evaluación de la plegabilidad" indicado en el ejemplo 17.

30 Así, los variantes de PS4 descritos en la presente preferiblemente son de tal forma que un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 presenta un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o superior de mayor plegabilidad comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje. Un producto alimentario tratado con el polipéptido variante de PS4 puede tener un 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o superior de mayor plegabilidad comparado con un producto alimentario que ha sido tratado con un polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.

Se describe específicamente el uso de los polipéptidos variantes de PS4 descritos en la presente en combinación con una xilanasas para mejorar la plegabilidad.

Usos de los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes de PS4

35 Los polipéptidos variantes de PS4, ácidos nucleicos, células hospedantes, vectores de expresión, etc., pueden usarse en cualquier aplicación para la cual pueda emplearse una amilasa. En particular, pueden emplearse para sustituir cualquier exoamilasa no maltogénica. Pueden emplearse para suplementar la actividad amilasa o exoamilasa no maltogénica, por sí solos o en combinación con otras amilasas o exoamilasas no maltogénicas conocidas.

40 Las secuencias de variantes de PS4 descritas en la presente pueden emplearse en diversas aplicaciones en la industria alimentaria, tales como productos de panadería y bebidas, también pueden emplearse en otras aplicaciones, tales como una composición farmacéutica, o incluso en la industria química. En particular, los ácidos nucleicos y polipéptidos variantes de PS4 son útiles para diversas aplicaciones industriales, que incluyen el horneado (según se describe en el documento WO 99/50399) y la estandarización de harinas (mejora o potenciación del volumen). Pueden utilizarse para producir maltotetraosa a partir de almidón y otros sustratos.

Por tanto, se describe un método para preparar un producto alimentario, comprendiendo dicho método: (a) obtener una exoamilasa no maltogénica; (b) introducir una mutación en una cualquiera o más de las posiciones de la exoamilasa no maltogénica tal como se indica en este documento; (c) mezclar el polipéptido resultante con un ingrediente alimentario.

50 Los polipéptidos variantes de PS4 pueden utilizarse para potenciar el volumen de productos de panadería, tales como el pan. Sin pretender quedar limitado por teoría alguna, los inventores creen que esto es consecuencia de la reducción en la viscosidad de la masa durante el calentamiento (tal como el horneado) como consecuencia del acortamiento de las moléculas de amilosa que provoca la exoamilasa. Esto permite que el dióxido de carbono generado por la fermentación aumente el tamaño del pan con menos impedimentos.

Así, los productos alimentarios que comprenden o que están tratados con los polipéptidos variantes de PS4 se expanden en volumen cuando se comparan con productos que no han sido tratados de este modo o que han sido tratados con los polipéptidos de origen. En otras palabras, los productos alimentarios tienen un mayor volumen de aire por volumen de producto alimentario. Como alternativa, o además, los productos alimentarios tratados con los polipéptidos variantes de PS4 tienen una menor densidad o proporción de peso (o masa) por volumen. En realizaciones particularmente preferidas, los polipéptidos variantes de PS4 se emplean para potenciar el volumen del pan. La potenciación o expansión del volumen resulta beneficiosa, porque reduce la gomosidad o la feculencia de los alimentos. Los consumidores prefieren alimentos ligeros y así se potencia la experiencia del cliente. En realizaciones preferidas, el uso de los polipéptidos variantes de PS4 potencia el volumen en 10%, 20%, 30% 40%, 50% o más.

El uso de los polipéptidos variantes de PS4 para aumentar el volumen de los alimentos se describe en detalle en los ejemplos.

Usos alimentarios

Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes de PS4 descritos en la presente pueden utilizarse como alimento o en la preparación de alimentos. En particular, pueden añadirse a un alimento, concretamente, como un aditivo alimentario. El término "alimento" pretende incluir alimentos preparados, así como ingredientes para un alimento, tal como una harina. En un aspecto preferido, el alimento es para consumo humano. El alimento puede estar en forma de una disolución o como un sólido, dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes de PS4 pueden emplearse como ingrediente alimentario. Tal como se emplea en la presente, la expresión "ingrediente alimentario" incluye una formulación, que es o que puede añadirse a composiciones alimentarias o alimentos funcionales, e incluyen formulaciones que pueden emplearse a niveles bajos en una amplia diversidad de productos que requieren, por ejemplo, una acidificación o una emulsión. El ingrediente alimentario puede estar en forma de disolución o como un sólido, dependiendo del uso y/o del modo de aplicación y/o del modo de administración.

Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes de PS4 descritos en la presente pueden ser o pueden añadirse a suplementos alimentarios. Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes de PS4 descritos en la presente pueden ser o pueden añadirse a alimentos funcionales. Tal como se emplea en la presente, la expresión "alimento funcional" significa un alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutricional y/o de satisfacción del gusto, sino que también es capaz de suministrar otro efecto beneficioso al consumidor. Aunque no existe una definición legal de alimento funcional, la mayoría de las partes que tienen interés en esta área están de acuerdo en que son alimentos comercializados que tienen unos efectos para la salud específicos.

Los polipéptidos variantes de PS4 también pueden utilizarse para la fabricación de un producto alimentario o una composición alimentaria. Las composiciones alimentarias típicas incluyen productos lácteos, productos cárnicos, productos de aves de corral, productos de pescado y productos de masa. El producto de masa puede ser cualquier producto de masa procesada, que incluye masas fritas, refritas, asadas, horneadas, cocidas al vapor y hervidas, tales como pan cocido al vapor y tortas de arroz. En realizaciones muy preferidas, el producto alimentario es un producto de panadería.

Preferiblemente, la composición alimentaria es un producto de panadería. Los productos de panadería típicos incluyen pan, tal como rebanadas, panecillos, bollos, bases para pizza, etc., pasteles, pretzels, tortillas, tartas, galletas, magdalenas, galletas saladas, etc.

Los productos alimentarios preferiblemente se benefician de una o más de las propiedades de manipulación u horneado mejoradas de los polipéptidos variantes de PS4 descritos en la presente. La propiedad de manipulación u horneado mejorada puede seleccionarse del grupo que consiste en firmeza mejorada, resiliencia mejorada, cohesividad mejorada, desmigajamiento mejorada y plegabilidad mejorada.

Por tanto, se describe un método para modificar un aditivo alimentario que comprende una exoamilasa no maltogénica, y dicho método comprende introducir una mutación en una cualquiera o más de las posiciones de la exoamilasa no maltogénica tal como se indica en este documento. El mismo método puede utilizarse para modificar un ingrediente alimentario, o un suplemento alimentario, un producto alimentario o una composición alimentaria.

50 Retrogradación/enranciamiento

Se describe el uso de proteínas variantes de PS4 que son capaces de retrasar el enranciamiento de medios con almidón, tales como geles de almidón. Los polipéptidos variantes de PS4 son especialmente capaces de retrasar la retrogradación perjudicial del almidón.

La mayoría de los gránulos de almidón están compuestos de una mezcla de dos polímeros: una amilosa fundamentalmente lineal y una amilopectina muy ramificada. La amilopectina es una molécula ramificada muy grande que consiste en cadenas de unidades de α -D-glucopiranosilo unidas por enlaces (1-4), en la que dichas

cadenas están unidas por enlaces α -D-(1-6) para formar ramificaciones. La amilopectina está presente en todos los almidones naturales, y constituye aproximadamente 75% de los almidones más comunes. La amilosa es fundamentalmente una cadena lineal de unidades de α -D-glucopiranosilo con enlaces (1-4) que tienen pocas ramificaciones α -D-(1-6). La mayoría de los almidones contienen aproximadamente 25% de amilosa.

5 Los gránulos de almidón calentados en presencia de agua sufren una transición de fase de orden-desorden denominada gelatinización, en la que el líquido es captado por los gránulos que se van hinchando. Las temperaturas de gelatinización varían según los diferentes almidones. Tras el enfriamiento del pan recién horneado, la fracción de amilosa, dentro de horas, sufre una retrogradación para desarrollar una red. Este proceso resulta beneficioso porque crea una estructura de miga deseable con un grado bajo de firmeza y unas propiedades de cortado mejoradas. La
10 cristalización de la amilopectina se produce de modo más gradual dentro de los gránulos de almidón gelatinizados durante días después del horneado. En este proceso, se cree que la amilopectina refuerza la red de amilosa en la cual están incrustados los gránulos de almidón. Este reforzamiento conduce a una mayor firmeza de la miga del pan. Este reforzamiento es una de las causas principales de que el pan se enrancie.

15 Se sabe que la calidad de los productos horneados se deteriora de modo gradual durante el almacenaje. Como consecuencia de la recristalización del almidón (también denominada retrogradación), la capacidad de retención de agua de la miga cambia con importantes implicaciones sobre las propiedades organolépticas y dietéticas. La miga pierde blandura y elasticidad y se hace firme y se desmiga. El aumento en la firmeza de la miga se emplea a menudo como medida del proceso de enranciamiento del pan.

20 La velocidad de retrogradación perjudicial de la amilopectina depende de la longitud de las cadenas laterales de la amilopectina. Por tanto, la hidrólisis enzimática de las cadenas laterales de la amilopectina, por ejemplo, por los polipéptidos variantes de PS4 que tienen actividad exoamilasa no maltogénica, puede reducir notablemente sus tendencias de cristalización.

25 Por consiguiente, el uso de polipéptidos variantes de PS4, tal como se describe en la presente, cuando se añaden al almidón en cualquier etapa de su procesamiento para producir un producto alimentario, por ejemplo, antes, durante o después del horneado para producir pan, puede retrasar o impedir o frenar la retrogradación. Este uso se describe con más detalle a continuación.

30 Por tanto, se describe un método para mejorar la capacidad de una exoamilasa no maltogénica para prevenir el enranciamiento, preferiblemente la retrogradación perjudicial, de un producto de masa, y dicho método comprende introducir una mutación en una cualquiera o más de las posiciones de la exoamilasa no maltogénica tal como se indica en este documento.

Ensayos para la medición de la retrogradación (incluyendo el enranciamiento)

35 Para la evaluación del efecto anti-enranciamiento de los polipéptidos variantes de PS4 que tienen actividad exoamilasa no maltogénica descritos en la presente, la firmeza de la miga puede medirse 1, 3 y 7 días después del horneado por medio de un analizador de la textura de alimentos universal Instron 4301 o un equipo similar conocido en la técnica.

40 Otro método que se ha empleado tradicionalmente en la técnica y que se usa para evaluar el efecto sobre la retrogradación del almidón de un polipéptido variante de PS4 que tiene actividad exoamilasa no maltogénica se basa en la calorimetría de barrido diferencial (DSC). En este caso, se mide la entalpía de fusión de la amilopectina retrogradada en la miga del pan o en la miga de un sistema modelo de masa horneada con o sin enzimas (control). El equipo de DSC aplicado en los ejemplos descritos es un Mettler-Toledo DSC 820 puesto en marcha con un gradiente de temperatura de 10°C por min de 20 a 95°C. Para la preparación de las muestras se pesan 10-20 mg de masa y se trasladan a bandejas de aluminio Mettler-Toledo que después se sellan herméticamente.

45 Los sistemas modelo de masas empleados en los ejemplos descritos contienen harina de trigo convencional y cantidades óptimas de agua o tampón con o sin la exoamilasa variante de PS4 no maltogénica. Se mezclan en un farinógrafo Brabender de 10 o 50 g durante 6 o 7 min, respectivamente. Se colocan muestras de las masas en tubos de ensayo de vidrio (15*0,8 cm) con una tapa. Estos tubos de ensayo se someten a un proceso de horneado en un baño de agua que comienza con una incubación de 30 min a 33°C, seguido de un calentamiento de 33 a 95°C con un gradiente de 1,1°C por min y, por último, una incubación de 5 min a 95°C. Después, los tubos se conservan en un termostato a 20°C antes del análisis por DSC.

50 En realizaciones preferidas, los variantes de PS4 descritos en la presente tienen una entalpía de fusión reducida, comparados con el control. En realizaciones muy preferidas, los variantes de PS4 tienen un 10% o superior de entalpía de fusión reducida. Preferiblemente, tienen un 20% o superior, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o superior de entalpía de fusión reducida cuando se comparan con el control.

Preparación de productos de almidón

55 Se proporciona el uso de polipéptidos variantes de PS4 para la preparación de productos alimentarios, en particular, productos de almidón. El método comprende formar el producto de almidón añadiendo una enzima exoamilasa no

maltogénica, tal como un polipéptido variante de PS4, a un medio de almidón. Si el medio de almidón es una masa, entonces la masa se prepara mezclando harina, agua, la exoamilasa no maltogénica que es un polipéptido variante de PS4 y, opcionalmente, otros ingredientes y aditivos posibles.

5 El término "almidón" significa el almidón *per se* o uno de sus componentes, en especial la amilopectina. La expresión "medio de almidón" significa cualquier medio adecuado que comprende almidón. La expresión "producto de almidón" significa cualquier producto que contiene o que está basado o se deriva del almidón. Preferiblemente, el producto de almidón contiene o está basado o se deriva de almidón obtenido a partir de harina de trigo. El término "harina", tal como se emplea en la presente, es un sinónimo de harina finamente molida de trigo u otras semillas. Sin embargo, preferiblemente el término significa harina obtenida del trigo *per se* y no de otras semillas. Así, y a menos que se indique lo contrario, las referencias a "harina de trigo", tal como se emplea en la presente, preferiblemente son referencias a la harina de trigo *per se*, así como a la harina de trigo cuando está presente en un medio, tal como una masa.

15 Una harina preferida es la harina de trigo o la harina de centeno o mezclas de harina de trigo y centeno. Sin embargo, también se contemplan masas que comprenden harina derivada de otros tipos de cereales, tales como, por ejemplo, de arroz, maíz, cebada y durra. Preferiblemente, el producto de almidón es un producto de panadería. Más preferiblemente, el producto de almidón es un producto de pan. Aún más preferiblemente, el producto de almidón es un producto de pan farináceo horneado. La expresión "producto de pan farináceo horneado" se refiere a cualquier producto horneado basado en una masa que puede obtenerse mezclando harina, agua y un agente de levado bajo condiciones de formación de masas. Por supuesto, pueden añadirse otros componentes a la mezcla de la masa.

20 Así, si el producto de almidón es un producto de pan farináceo horneado, entonces el proceso comprende mezclar, en cualquier orden adecuado, harina, agua y un agente de levado bajo condiciones de formación de masas y después añadir un polipéptido variante de PS4 en forma de una premezcla. El agente de levado puede ser un agente de levado químico, tal como bicarbonato de sodio o cualquier cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero).

25 La exoamilasa no maltogénica variante de PS4 puede añadirse junto con cualquier ingrediente de la masa, que incluye el agua o la mezcla de ingredientes de la masa o con cualquier aditivo o mezcla de aditivos. La masa puede prepararse mediante cualquier método de preparación de masas convencional que sea habitual en la industria panadera o en cualquier otra industria que fabrique productos basados en una masa de harina.

30 El horneado de productos farináceos del pan, tal como, por ejemplo, pan blanco, pan fabricado a partir de harina de centeno y harina de trigo tamizadas, panecillos y similares, generalmente se realiza horneando la masa del pan a unas temperaturas del horno en el intervalo de 180 a 250°C durante aproximadamente 15 a 60 minutos. Durante el proceso del horneado, predomina un gradiente pronunciado de temperatura (200 → 120°C) en las capas exteriores de la masa en donde se desarrolla la corteza característica del producto horneado. Sin embargo, debido al consumo de calor por la generación de vapor, la temperatura de la miga solo es de aproximadamente 100°C al final del proceso de horneado.

35 Por tanto, se describe un proceso para fabricar un producto de pan, que comprende: (a) proporciona un medio de almidón; (b) añadir al medio de almidón un polipéptido variante de PS4 según se describe en este documento; y (c) aplicar calor al medio de almidón durante o después de la etapa (b) para producir un producto de pan. También se describe un proceso para fabricar un producto de pan, que comprende añadir, a un medio de almidón, un polipéptido variante de PS4 según se describe.

40 El polipéptido variante de PS4 de exoamilasa no maltogénica puede añadirse como una preparación líquida o como una composición pulverulenta seca que comprende la enzima como único componente activo o mezclada con uno o más ingredientes de la masa o aditivos de la masa adicionales.

45 Composición mejoradora

Se describen composiciones mejoradoras, que incluyen composiciones para mejorar el pan y composiciones para mejorar la masa. Estas comprenden un polipéptido variante de PS4, opcionalmente junto con otro ingrediente u otra enzima, o ambos.

50 También se proporciona el uso de dichas composiciones mejoradoras del pan y de la masa en el horneado. En otro aspecto, se proporciona un producto horneado o masa obtenida a partir de la composición mejoradora del pan o la composición mejoradora de la masa. En otro aspecto, se describe un producto horneado o masa obtenido a partir del uso de una composición mejoradora del pan o una composición mejoradora de la masa.

Preparación de la masa

55 Puede prepararse una masa mezclando harina, agua, una composición mejoradora de la masa que comprende un polipéptido variante de PS4 (tal como se describió anteriormente) y, opcionalmente, otros ingredientes y aditivos.

- La composición mejoradora de la masa puede añadirse junto con cualquier ingrediente de la masa, que incluye la harina, el agua u otros ingredientes o aditivos opcionales. La composición mejoradora de la masa puede añadirse antes de la harina o del agua o de otros ingredientes o aditivos opcionales. La composición mejoradora de la masa puede añadirse después de la harina o del agua o de otros ingredientes o aditivos opcionales. La masa puede prepararse mediante cualquier método de preparación de masas convencional que sea habitual en la industria panadera o en cualquier otra industria que fabrique productos basados en una masa de harina.
- La composición mejoradora de la masa puede añadirse como una preparación líquida o en forma de una composición de polvo seco que comprende la composición como único componente activo o mezclada con uno o más ingredientes de la masa o aditivos de la masa adicionales.
- La cantidad de la exoamilasa no maltogénica de polipéptido variante de PS4 que se añade normalmente es una cantidad que da como resultado la presencia en la masa terminada de 50 a 100.000 unidades por kg de harina, preferiblemente de 100 a 50.000 unidades por kg de harina. Preferiblemente, la cantidad está en el intervalo de 200 a 20.000 unidades por kg de harina. Como alternativa, la exoamilasa no maltogénica de polipéptido variante de PS4 se añade en una cantidad que da como resultado la presencia en la masa terminada de 0,02-50 ppm de enzima basada en la harina (0,02-50 mg de enzima por kg de harina), preferiblemente de 0,2-10 ppm.
- En el presente contexto, una unidad de la exoamilasa no maltogénica se define como la cantidad de enzima que libera productos de la hidrólisis equivalentes a 1 μmol de azúcar reductora por min cuando se incuba a 50 °C en un tubo de ensayo con 4 ml de almidón de maíz ceroso 10 mg/ml en MES 50 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 6,0, tal como se describirá a continuación.
- La masa, tal como se describe en la presente, en general comprende harina de trigo o harina de trigo y/o otros tipos de harinas o almidón tal como harina de maíz, almidón de maíz, harina de arroz, harina de cebada, harina de avena, harina de soja, harina de sorgo, harina de patata, o almidón de patata. La masa puede ser fresca, congelada o parcialmente horneada.
- La masa puede ser una masa levada o una masa que va a ser sometida a levado. La masa puede llevarse de diversas formas, tales como añadiendo agentes de levado químicos, por ejemplo, bicarbonato de sodio, o añadiendo un fermento (masa fermentada), pero se prefiere levar la masa añadiendo un cultivo de levaduras adecuado, tal como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero), por ejemplo, una cepa disponible en el mercado de *S. cerevisiae*.
- La masa puede comprender grasas, tales como grasas granuladas o manteca. La masa puede comprender además otro emulgente, tal como mono- o diglicéridos, ésteres de azúcares de ácidos grasos, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, poli(estearatos de oxietileno) o lisolecitina.
- También se describe una premezcla que comprende harina junto con la combinación descrita en la presente. La premezcla puede contener otros aditivos mejoradores de la masa y/o mejoradores del pan, por ejemplo, cualquiera de los aditivos, incluyendo las enzimas, mencionados en la presente.
- Otros ingredientes o aditivos de la masa
- Para mejorar aún más las propiedades del producto horneado e impartir cualidades distintivas al producto horneado, pueden incorporarse a la masa otros ingredientes de la masa y/o aditivos de la masa. Generalmente, estos otros componentes añadidos pueden incluir ingredientes de la masa, tales como sal, semillas, grasas y aceites, azúcar o edulcorante, fibra dietética, fuentes de proteína, tales como leche en polvo, gluten de soja o huevos, y aditivos de la masa, tales como emulgentes, otras enzimas, hidrocoloides, agentes aromatizantes, agentes oxidantes, minerales y vitaminas.
- Los emulgentes son útiles como reforzadores de la masa y ablandadores de la miga. Como reforzadores de la masa, los emulgentes pueden proporcionar tolerancia con respecto al tiempo de reposo y tolerancia al choque durante el levado. Además, los reforzadores de la masa mejorarán la tolerancia de una masa concreta a las variaciones en el tiempo de fermentación. La mayoría de los reforzadores de la masa también pueden mejorar la subida en el horno, lo cual significa el aumento del volumen desde los productos levados hasta los productos horneados. Por último, los reforzadores de la masa emulsionarán cualquier grasa presente en la mezcla de la receta.
- Los emulgentes adecuados incluyen lecitina, poli(estearato de oxietileno), mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres del ácido acético de mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres del ácido láctico de mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres del ácido cítrico de mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres del ácido diacetiltartárico de mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres de sacarosa de ácidos grasos comestibles, estearoil-2-lactilato de sodio y estearoil-2-lactilato de calcio.
- El ingrediente o aditivo de la masa adicional puede añadirse junto con cualquier ingrediente de la masa, que incluye la harina, el agua u otros ingredientes o aditivos opcionales, o la composición mejoradora de la masa. El ingrediente o aditivo de la masa adicional puede añadirse antes de la harina, el agua, otros ingredientes o aditivos opcionales, o

la composición mejoradora de la masa. El ingrediente o aditivo de la masa adicional puede añadirse después de la harina, el agua, otros ingredientes o aditivos opcionales, o la composición mejoradora de la masa.

El ingrediente o aditivo de la masa adicional puede ser, de modo conveniente, una preparación líquida. Sin embargo, el ingrediente o aditivo de la masa adicional puede estar, de modo conveniente, en forma de una composición seca.

- 5 Preferiblemente, el ingrediente o aditivo de la masa adicional es al menos 1% del peso del componente de harina de la masa. Más preferiblemente, el ingrediente o aditivo de la masa adicional es al menos 2%, preferiblemente al menos 3%, preferiblemente al menos 4%, preferiblemente al menos 5%, preferiblemente al menos 6%. Si el aditivo es una grasa, entonces generalmente la grasa puede estar presente en una cantidad del 1 al 5%, generalmente del 1 al 3%, más generalmente a aproximadamente 2%.

10 Otras enzimas

Pueden emplearse una o más enzimas adicionales en combinación con los polipéptidos variantes de PS4. Estas combinaciones, por ejemplo, pueden añadirse al alimento, a la preparación de la masa, a la composición alimentaria o a la composición de almidón.

- 15 Estas otras enzimas pueden seleccionarse, por ejemplo, de cualquier combinación de las siguientes: (a) Novamyl o uno de sus variantes, homólogos o mutantes que tengan actividad alfa-amilasa maltogénica; (b) una xilanasas, tal como GRINDAMYL™ POWERBake 900 (Danisco A/S); (c) una α -amilasa bacteriana, tal como Max-Life U4 (Danisco A/S); y (d) una lipasa, tal como GRINDAMYL™ POWERBake 4050 (Danisco A/S).

- 20 En una realización, un polipéptido variante de PS4 según la invención se emplea en combinación con al menos una enzima seleccionada de la lista que consiste en oxidorreductasas, hidrolasas, lipasas, estererasas, glicosidasas, amilasas, pululanastas, xilanasas, celulasas, hemicelulasas, enzimas que degradan el almidón, proteasas y lipooxigenasas. En una realización preferida, la composición comprende al menos un variante de PS4 y una amilasa maltogénica de *Bacillus*, tal como se describe en el documento WO91/04669. Una realización preferida comprende un variante de PS4 y harina.

- 25 Otras enzimas que pueden añadirse a la masa incluyen oxidorreductasas, hidrolasas, tales como lipasas y estererasas, así como glicosidasas, tales como α -amilasa, pululanasa, y xilanasas. Las oxidorreductasas, tales como, por ejemplo, la glucosa oxidasa y la hexosa oxidasa, pueden utilizarse para reforzar la masa y controlar el volumen de los productos horneados, y las xilanasas y otras hemicelulasas pueden añadirse para mejorar las propiedades de manipulación de la masa, la firmeza de la miga y el volumen del pan. Las lipasas son útiles como reforzadores de la masa y ablandadores de la miga, y las α -amilasas y otras enzimas amilolíticas pueden incorporarse a la masa para controlar el volumen del pan y reducir aún más la firmeza de la miga.

- 30 Otras enzimas que pueden utilizarse pueden seleccionarse del grupo que consiste en una celulasa, una hemicelulasa, una enzima que degrada el almidón, una proteasa, y una lipooxigenasa.

- 35 Los ejemplos de oxidorreductasas útiles incluyen oxidasas, tales como la enzima oxidante de maltosa, una glucosa oxidasa (EC 1.1.3.4), carbohidrato oxidasa, glicerol oxidasa, piranosa oxidasa, galactosa oxidasa (EC 1.1.3.10) y hexosa oxidasa (EC 1.1.3.5). Estas enzimas pueden emplearse para reforzar la masa y controlar el volumen de los productos horneados.

- 40 Entre las enzimas que degradan el almidón, las amilasas son particularmente útiles como aditivos mejoradores de la masa. La α -amilasa degrada el almidón en dextrinas que son aún más degradadas por la β -amilasa para producir maltosa. Los ejemplos de amilasas adecuadas incluyen la alfa-amilasa maltogénica denominada también glucano 1,4- α -maltohidrolasa (EC 3.2.1.133) de *Bacillus stearothermophilus* (tal como Novamyl™ (Novozymes)), α -amilasa (EC 3.2.1.1) de *Bacillus amyloliquefaciens* (tal como Max Life U4 (Danisco A/S)), amilasa de *B. flavothermus* (documento US 20050048611A1), variantes de amilasas fúngicas con inserciones de alfa-amilasa (EC 3.2.1.133) de *Bacillus stearothermophilus* (documento WO2005019443), híbridos de amilasa según se describe en el documento US20060147581A1, y sus variantes, homólogos y derivados que tienen actividad alfa-amilasa maltogénica. En una realización preferida, un polipéptido variante de PS4 puede combinarse con amilasas, en particular, amilasas maltogénicas. Una alfa-amilasa maltogénica (glucano 1,4- α -maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar la amilosa y la amilopectina para producir maltosa en la configuración alfa. Otras enzimas que degradan el almidón útiles que pueden añadirse a una composición de masa incluyen glucoamilasas y pululanastas.

- 50 Preferiblemente, la enzima adicional es al menos una xilanasas y/o al menos una amilasa. El término "xilanasas", tal como se emplea en la presente, se refiere a xilanasas (EC 3.2.1.32) que hidrolizan enlaces xilosídicos. También puede añadirse una lipasa. Los ejemplos de xilanasas adecuadas incluyen las xilanasas de panadería (EC 3.2.1.8) procedentes, por ejemplo, de *Bacillus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Thermomyces sp.* o *Trichoderma sp.* (tales como GRINDAMYL™ POWERBake 900 (Danisco A/S)) y xilanasas que pertenecen a la familia 10 u 11, por ejemplo, de *Thermomyces lanuginosus* (previamente denominado *Humicola insolens*), *Aspergillus aculeatus* (documento WO 94/21785), *Bacillus halodurans* (documento WO 2005/059084), *Bacillus sp.* (documento EP 0 720 649 B1), *B. agadeherens* (documento US 5.770.424), y sus variantes, homólogos y derivados.

El término "amilasa", tal como se emplea en la presente, se refiere a amilasas, tales como α -amilasas (EC 3.2.1.1), β -amilasas (EC 3.2.1.2) y γ -amilasas (EC 3.2.1.3).

5 La enzima adicional puede añadirse junto con cualquier ingrediente de la masa, que incluye la harina, el agua u otros ingredientes o aditivos opcionales, o la composición mejoradora de la masa. La enzima adicional puede añadirse antes de la harina, el agua, otros ingredientes o aditivos opcionales, o la composición mejoradora de la masa. La enzima adicional puede añadirse después de la harina, el agua, otros ingredientes o aditivos opcionales, o la composición mejoradora de la masa. La enzima adicional puede ser, de modo conveniente, una preparación líquida. Sin embargo, la composición puede estar, de modo conveniente, en forma de una composición seca.

10 Algunas enzimas de la composición mejoradora de la masa son capaces de interactuar entre sí bajo condiciones de masa hasta un punto en que el efecto de la mejora de las propiedades reológicas y/o de facilidad de tratamiento en la máquina de una masa de harina y/o la calidad del producto fabricado a partir de la masa mediante las enzimas no solo es aditivo, sino que el efecto es sinérgico.

15 Con relación a la mejora en el producto fabricado a partir de la masa (producto terminado), puede descubrirse que la combinación produce un efecto sinérgico sustancial con respecto a la estructura de la miga. Además, con respecto al volumen específico del producto horneado, puede descubrirse un efecto sinérgico.

20 La enzima adicional puede ser una lipasa (EC 3.1.1) capaz de hidrolizar enlaces éster carboxílico para liberar carboxilato. Los ejemplos de lipasas incluyen, pero no se limitan a triacilglicerol lipasa (EC 3.1.1.3), galactolipasa (EC 3.1.1.26), fosfolipasa A1 (EC 3.1.1.32), fosfolipasa A2 (EC 3.1.1.4) y lipoproteína lipasa A2 (EC 3.1.1.34). De modo más específico, las lipasas adecuadas incluyen lipasas de *Mucor miehei*, *F. venenatum*, *H. lanuginosa*, *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, *F. oxysporum*, glicolipasas de *Fusarium heterosporum* (tal como GRINDAMYL™ POWERBake 4050 (Danisco A/S)) y sus variantes, homólogos y derivados.

Otros usos

25 Los variantes de PS4 son adecuados para la producción de jarabes de maltosa y jarabes con alto contenido en maltosa. Estos productos tienen un interés considerable en la producción de ciertos dulces debido a su baja higroscopicidad, baja viscosidad, buena termoestabilidad y un sabor suave, no muy dulce, de la maltosa. El proceso industrial para producir jarabes de maltosa comprende licuar el almidón, después realizar una sacarificación con una enzima productora de maltosa y, opcionalmente, con una enzima que rompe los puntos de ramificación 1.6 en la amilopectina, por ejemplo, alfa-1.6-amiloglucosidasa.

30 Los variantes de PS4 descritos en la presente pueden añadirse a una composición de detergente y, así, ser un componente de esta. La composición de detergente puede formularse, por ejemplo, como una composición de detergente de lavado a mano o a máquina, que incluye una composición de aditivo de detergente adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición suavizante del tejido añadida en el enjuagado, o puede formularse como una composición de detergente para su uso en operaciones de limpieza de superficies duras domésticas generales, o puede formularse para operaciones de lavado de vajillas a mano o a máquina. En un aspecto específico, se describe un aditivo de detergente que comprende el variante de PS4. El aditivo de detergente, así como la composición de detergente, puede comprender una o más enzimas adicionales, tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanasa, una oxidasa, por ejemplo, una lacasa y/o una peroxidasa. En general, las propiedades de la enzima o enzimas elegidas deben ser compatibles con el detergente seleccionado (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la enzima o enzimas deben estar presentes en cantidades eficaces.

45 El variante de PS4 también puede utilizarse para la producción de materiales lignocelulósicos, tales como pulpa, papel y cartón, a partir de residuos de papel y cartón reforzados con almidón, en especial cuando la reelaboración de la pulpa se produce a un pH mayor que 7 y cuando las amilasas pueden facilitar la disgregación del material de residuos a través de la degradación del almidón de refuerzo. Los variantes de PS4 pueden ser especialmente útiles en un proceso para producir una pulpa para fabricar papel a partir de papel impreso revestido con almidón. El proceso puede realizarse como se describe en el documento WO 95/14807, y comprende las siguientes etapas: a) disgregar el papel para producir una pulpa, b) realizar un tratamiento con una enzima que degrada el almidón antes, durante o después de la etapa a), y c) separar las partículas de tinta de la pulpa después de las etapas a) y b). El variante de PS4 también puede ser muy útil para modificar un almidón, cuando se emplea un almidón modificado enzimáticamente para la fabricación de papel junto con cargas alcalinas, tales como carbonato de calcio, caolín y arcillas. Con los variantes de PS4 descritos en la presente es posible modificar el almidón en presencia de la carga, permitiendo así un proceso integrado más sencillo. Un variante de PS4 también puede ser muy útil en el desaprestado de tejidos. En la industria de procesamiento de tejidos, las amilasas se emplean tradicionalmente como sustancias auxiliares en el proceso de desaprestado para facilitar la eliminación del apresto que contiene almidón que ha servido como revestimiento protector sobre los hilos de la trama durante la operación de tejido. La eliminación completa del revestimiento de apresto después de la operación de tejido es importante para asegurar unos resultados óptimos en los procesos posteriores, en los que el tejido se desengrasa, se blanquea y se tiñe. Se prefiere la degradación enzimática del almidón, porque no implica ningún efecto perjudicial sobre el material de las

fibras. El variante de PS4 puede emplearse por sí solo o en combinación con una celulosa cuando se desaprasta un tejido que contiene celulosa.

El variante de PS4 también puede ser una amilasa elegida para la producción de edulcorantes a partir del proceso "tradicional" del almidón A para la conversión del almidón en jarabes de fructosa, que normalmente consiste en tres procesos enzimáticos consecutivos, v.gr., un proceso de licuefacción, seguido de un proceso de sacarificación y un proceso de isomerización. Durante el proceso de licuefacción, el almidón es degradado para producir dextrinas por una amilasa a unos valores de pH entre 5,5 y 6,2 y a unas temperaturas de 95-160°C durante un periodo de aproximadamente 2 horas. Para asegurar una estabilidad enzimática óptima bajo estas condiciones, se añade 1 mM de calcio (40 ppm de iones calcio libres). Después del proceso de licuefacción, las dextrinas se convierten en dextrosa mediante la adición de una glucoamilasa y una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa. Antes de esta etapa, el pH se reduce hasta un valor por debajo de 4,5, manteniendo la temperatura alta (por encima de 95°C), y la actividad licuante de la amilasa se desnaturaliza. La temperatura disminuye hasta 60°C, y se añade la glucoamilasa y la enzima desramificante. El proceso de sacarificación se desarrolla durante 24-72 horas.

15 Composiciones de detergente para lavado y usos

Los variantes de α -amilasa analizados en la presente pueden formularse en composiciones de detergentes para su uso en composiciones de limpieza de vajilla u otras composiciones de limpieza, por ejemplo. Estas pueden ser geles, polvos o líquidos. Las composiciones pueden comprender el variante de α -amilasa solo, otras enzimas amilolíticas, otras enzimas limpiadoras y otros componentes habituales en las composiciones limpiadoras.

20 Así, una composición de detergente para el lavado de vajillas puede comprender un tensioactivo. El tensioactivo puede ser aniónico, no iónico, catiónico, anfótero o una mezcla de estos tipos. El detergente puede contener del 0% a aproximadamente 90% en peso de un tensioactivo no iónico, tal como alcoholes de cadena lineal propoxilados y etoxilados no formadores de espuma o formadores de poca espuma.

25 En aplicaciones de detergentes, los variantes de α -amilasa se emplean habitualmente en una composición líquida que contiene propilenglicol. El variante de α -amilasa puede solubilizarse en propilenglicol, por ejemplo, haciéndolo circular en una disolución de propilenglicol al 25% en volumen/volumen que contiene cloruro de calcio al 10%.

30 La composición de detergente para el lavado de vajillas puede contener sales reforzantes de detergentes de tipo inorgánico y/u orgánico. Los reforzantes de detergentes pueden subdividirse en los tipos que contienen fósforo y que no contienen fósforo. La composición de detergente habitualmente contiene de aproximadamente 1% a aproximadamente 90% de reforzantes de detergentes. Los ejemplos de reforzantes de detergentes alcalinos inorgánicos que contienen fósforo, cuando están presentes, incluyen las sales hidrosolubles, en especial pirofosfatos, ortofosfatos y polifosfatos de metal alcalino. Un ejemplo de un reforzante de detergente alcalino orgánico que contiene fósforo, cuando está presente, incluye las sales hidrosolubles de fosfonatos. Los ejemplos de reforzantes inorgánicos que no contienen fósforo, cuando están presentes, incluyen carbonatos, boratos y silicatos de metal alcalino hidrosolubles, así como los diversos tipos de aluminosilicatos amorfos o cristalinos hidrosolubles, de los cuales las zeolitas son sus representantes más conocidos.

Los ejemplos de reforzantes orgánicos adecuados incluyen los metales alcalinos; amonio y amonio sustituido; citratos; succinatos; malonatos; sulfonatos de ácido graso; carboximetoxisuccinatos; poliactatos de amonio; carboxilatos; policarboxilatos; aminopolicarboxilatos; poliactilcarboxilatos; y polihidroxisulfonatos.

40 Otros reforzantes orgánicos adecuados incluyen los polímeros y copolímeros de alto peso molecular conocidos por tener propiedades reforzantes, por ejemplo, poli(ácido acrílico), poli(ácido maleico) y copolímeros de poli(ácido acrílico)/poli(ácido maleico) apropiados, y sus sales.

45 La composición limpiadora puede contener agentes blanqueantes de tipo cloro/bromo o de tipo oxígeno. Los ejemplos de blanqueantes de tipo cloro/bromo inorgánicos son hipoclorito e hipobromito de litio, sodio o calcio, así como fosfato de trisodio clorado. Los ejemplos de blanqueantes de tipo cloro/bromo orgánicos son N-bromo- y N-cloro-imidas heterocíclicas, tales como ácidos tricloroisocianúrico, tribromoisocianúrico, dibromoisocianúrico y dicloroisocianúrico y sus sales con cationes hidrosolubilizantes, tales como potasio y sodio. También son adecuados los compuestos de hidantoína.

50 La composición limpiadora puede contener blanqueantes de oxígeno, por ejemplo, en forma de una persal inorgánica, opcionalmente con un precursor del blanqueado o como un compuesto de peroxiácido. Los ejemplos típicos de compuestos blanqueantes peroxídicos adecuados son perboratos de metal alcalino, tanto tetrahidratos como monohidratos, percarbonatos de metal alcalino, persilicatos y perfosfatos. Los materiales activadores adecuados incluyen tetraacetiletilendiamina (TAED) y triacetato de glicerol. También pueden estar presentes sistemas de activación del blanqueado enzimáticos, tales como perborato o percarbonato, triacetato de glicerol y perhidrolasa, tal como se describe en el documento WO 2005/056783, por ejemplo.

55 La composición de limpieza puede estabilizarse empleando agentes estabilizantes convencionales para la enzima o enzimas, por ejemplo, un poliol, tal como, por ejemplo, propilenglicol, un azúcar o un alcohol de azúcar, ácido láctico,

ácido bórico o un derivado de ácido bórico (por ejemplo, un éster borato aromático). La composición limpiadora también puede contener otros ingredientes de detergentes convencionales, por ejemplo, material desfloculante, material de carga, depresores de la espuma, agentes anticorrosión, agentes suspensores de la suciedad, agentes secuestrantes, agentes antirredépósito de la suciedad, agentes deshidratantes, tintes, bactericidas, agentes fluorescentes, espesantes y perfumes.

Por último, los variantes de α -amilasa pueden utilizarse en detergentes para el lavado de vajillas convencionales, por ejemplo, en cualquiera de los detergentes descritos en las siguientes publicaciones de patente, con la consideración de que se empleen los variantes de α -amilasa descritos en la presente en lugar o además de cualquier α -amilasa descrita en las patentes y solicitudes publicadas listadas: CA 2006687, GB 2200132, GB 2234980, GB 2228945, DE 3741617, DE 3727911, DE 4212166, DE 4137470, DE 3833047, DE 4205071, WO 93/25651, WO 93/18129, WO 93/04153, WO 92/06157, WO 92/08777, WO 93/21299, WO 93/17089, WO 93/03129, EP 481547, EP 530870, EP 533239, EP 554943, EP 429124, EP 346137, EP 561452, EP 318204, EP 318279, EP 271155, EP 271156, EP 346136, EP 518719, EP 518720, EP 518721, EP 516553, EP 561446, EP 516554, EP 516555, EP 530635, EP 414197, y patentes de EE. UU. n.ºs 5.112.518; 5.141.664; y 5.240.632.

Según la realización, uno o más variantes de α -amilasa pueden constituir generalmente un componente de una composición de detergente. Como tal, puede ser incluido en la composición de detergente en forma de un granulado no productor de polvo, un líquido estabilizado o una enzima protegida. Los gránulos no productores de polvo pueden producirse, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.106.991 y 4.661.452 y pueden ser revestidos opcionalmente mediante métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de materiales de revestimiento cerosos son productos de poli(óxido de etileno); polietilenglicol (PEG) con pesos molares promedio de 1.000 a 20.000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados, en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que aparecen de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Se indican ejemplos de materiales de revestimiento formadores de película adecuados para su aplicación por medio de técnicas de lecho fluido, por ejemplo, en la patente del Reino Unido n.º 1483591. Las preparaciones de enzimas líquidas pueden estabilizarse, por ejemplo, añadiendo un poliol, tal como propilenglicol, un azúcar o un alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. En la técnica se conocen bien otros estabilizantes de enzimas. Las enzimas protegidas pueden prepararse según el método descrito en los documentos US 5.879.920 (Genencor International, Inc.) o EP 238216, por ejemplo. Los polioles han sido reconocidos desde hace tiempo como estabilizantes de proteínas, y también se han empleado para mejorar la solubilidad de proteínas. Véase, por ejemplo, Kaushik *et al.*, "Why is trehalose an exceptional protein stabilizer? An analysis of the thermal stability of proteins in the presence of the compatible osmolyte trehalose", *J. Biol. Chem.*, 278:26458-26465 (2003) y las referencias citadas en dicho documento; y M. Conti *et al.*, "Capillary isoelectric focusing: the problem of protein solubility," *J. Chromatography*, 757:237-245 (1997).

La composición de detergente puede tener cualquier forma convencional, por ejemplo, geles, polvos, gránulos, pastas o líquidos. Un detergente líquido puede ser acuoso, y generalmente contiene hasta aproximadamente 70% de agua, y de 0% a aproximadamente 30% de disolvente orgánico, y también puede estar en forma de un tipo de gel compacto que contiene solo aproximadamente 30% de agua.

La composición de detergente comprende uno o más tensioactivos, cada uno de los cuales puede ser aniónico, no iónico, catiónico o bipolar. El detergente habitualmente contendrá del 0% a aproximadamente 50% de tensioactivo aniónico, tal como alquilbencensulfonato lineal (LAS); α -olefinsulfonato (AOS); sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso) (AS); etoxisulfato de alcohol (AEOS o AES); alcansulfonatos secundarios (SAS); ésteres de metilo de α -sulfoácido graso; ácido alquil- o alqueniilsuccínico; o jabón. La composición también puede contener del 0% a aproximadamente 40% de tensioactivo no iónico, tal como etoxilatos de alcohol (AEO o AE), etoxilatos de alcohol carboxilados, etoxilato de nonilfenol, alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, o amida de ácido graso de polihidroxialquilo, según se describe en el documento WO 92/06154, por ejemplo.

La composición de detergente puede comprender además una o más enzimas diferentes, tales como una lipasa, cutinasa, proteasa, celulasa, peroxidasa y/o lacasa en cualquier combinación.

El detergente puede contener de aproximadamente 1% a aproximadamente 65% de un reforzador de detergente o agente complejante, tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, citrato, ácido nitrilotriacético (NTA), ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminapentaacético (DTMPA), ácido alquil- o alqueniilsuccínico, silicatos solubles o silicatos laminados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst). El detergente también puede estar sin reforzar, es decir, fundamentalmente exento de reforzador de detergente. Las enzimas pueden utilizarse en cualquier composición compatible con la estabilidad de la enzima. Las enzimas pueden protegerse frente a componentes en general perjudiciales por medio de formas conocidas de encapsulación, mediante granulación o secuestro en hidrogeles, por ejemplo. Las enzimas y, de modo específico, las α -amilasas, con o sin los dominios de unión a almidón, no se limitan a aplicaciones de lavado de tejidos y lavado de vajillas, sino que pueden emplearse en limpiadores de superficies y para la producción de etanol a partir de almidón o biomasa.

El detergente puede comprender uno o más polímeros. Los ejemplos incluyen carboximetilcelulosa (CMC),

polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), policarboxilatos, tales como poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico.

5 El detergente puede contener un sistema blanqueante, que puede comprender una fuente de H_2O_2 , tal como perborato o percarbonato, opcionalmente combinada con un activador del blanqueado formador de perácido, tal como TAED o nonanoiloxibencensulfonato (NOBS). Como alternativa, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos de tipo amida, imida o sulfona, por ejemplo. El sistema blanqueante también puede ser un sistema blanqueante enzimático, en el que una perhidrolasa activa el peróxido, tal como el descrito en el documento WO 2005/056783.

10 Las enzimas de la composición de detergente pueden estabilizarse empleando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo un poliol, tal como propilenglicol o glicerol; un azúcar o un alcohol de azúcar; ácido láctico; ácido bórico o un derivado de ácido bórico, tal como un éster borato aromático; y la composición puede formularse como se describe en los documentos WO 92/19709 y WO 92/19708, por ejemplo.

15 El detergente también puede contener otros ingredientes de detergentes convencionales, tales como acondicionadores del tejido, que incluyen arcillas, potenciadores de la espuma, supresores de la espuma, agentes anticorrosión, agentes suspensores de la suciedad, agentes antirredpósito de la suciedad, tintes, bactericidas, abrillantadores ópticos o perfume, por ejemplo. El pH (medido en una disolución acuosa a la concentración de uso) habitualmente es neutro o alcalino, por ejemplo, un pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 11,0.

20 El variante de α -amilasa puede incorporarse en concentraciones que se emplean de modo convencional en detergentes. En la presente se contempla que, en la composición de detergente, el variante de α -amilasa puede añadirse en una cantidad que se corresponde con 0,00001-1,0 mg (calculados como proteína enzimática pura) del variante de α -amilasa por litro de licor de lavado. Las formas concretas de composiciones detergentes que comprenden los variantes de α -amilasa pueden formularse para que incluyan:

25 (1) Una composición de detergente formulada como un granulado que tiene una densidad en masa de al menos 600 g/l que comprende alquilbencensulfonato lineal (calculado como el ácido) de aproximadamente 7% a aproximadamente 12%; etoxisulfato de alcohol (por ejemplo, alcohol C_{12-18} , óxido de etileno 1-2 (EO)) o sulfato de alquilo (por ejemplo, C_{16-18}) de aproximadamente 1% a aproximadamente 4%; etoxilato de alcohol (por ejemplo, alcohol C_{14-15} , 7 EO) de aproximadamente 5% a aproximadamente 9%; carbonato de sodio (por ejemplo, Na_2CO_3) de aproximadamente 14% a aproximadamente 20%; silicato soluble de aproximadamente 2 a aproximadamente 6%; zeolita (por ejemplo, $NaAlSiO_4$) de aproximadamente 15% a aproximadamente 22%; sulfato de sodio (por ejemplo, Na_2SO_4) de 0% a aproximadamente 6%; citrato de sodio/ácido cítrico (por ejemplo, $C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$) de aproximadamente 0% a aproximadamente 15%; perborato de sodio (por ejemplo, $NaBO_3 \cdot H_2O$) de aproximadamente 11% a aproximadamente 18%; TAED de aproximadamente 2% a aproximadamente 6%; carboximetilcelulosa (CMC) de 0% a aproximadamente 2%; polímeros (por ejemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, PVP, PEG) al 0-3%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1% de proteína; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, supresores de la espuma, perfumes, abrillantador óptico, fotoblanqueantes) al 0-5%.

35 (2) Una composición de detergente formulada como un granulado que tiene una densidad en masa de al menos 600 g/l que comprende alquilbencensulfonato lineal (calculado como el ácido) de aproximadamente 6% a aproximadamente 11%; etoxisulfato de alcohol (por ejemplo, alcohol C_{12-18} , 1-2 EO) o sulfato de alquilo (por ejemplo, C_{16-18}) de aproximadamente 1% a aproximadamente 3%; etoxilato de alcohol (por ejemplo, alcohol C_{14-15} , 7 EO) de aproximadamente 5% a aproximadamente 9%; carbonato de sodio (por ejemplo, Na_2CO_3) de aproximadamente 15% a aproximadamente 21%; silicato soluble de aproximadamente 1 a aproximadamente 4%; zeolita (por ejemplo, $NaAlSiO_4$) de aproximadamente 24% a aproximadamente 34%; sulfato de sodio (por ejemplo, Na_2SO_4) de aproximadamente 4% a aproximadamente 10%; citrato de sodio/ácido cítrico (por ejemplo, $C_6H_5Na_3O_7/C_6H_8O_7$) de 0% a aproximadamente 15%; carboximetilcelulosa (CMC) de 0% a aproximadamente 2%; polímeros (por ejemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, PVP, PEG) al 1-6%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; ingredientes minoritarios (por ejemplo, supresores de la espuma, perfume) al 0-5%.

40 (3) Una composición de detergente formulada como un granulado que tiene una densidad en masa de al menos 600 g/l que comprende alquilbencensulfonato lineal (calculado como el ácido) de aproximadamente 5% a aproximadamente 9%; etoxilato de alcohol (por ejemplo, alcohol C_{12-15} , 7 EO) de aproximadamente 7% a aproximadamente 14%; jabón como ácido graso (por ejemplo, ácido graso C_{16-22}) de aproximadamente 1 a aproximadamente 3%; carbonato de sodio (como Na_2CO_3) de aproximadamente 10% a aproximadamente 17%; silicato soluble de aproximadamente 3% a aproximadamente 9%; zeolita (por ejemplo, $NaAlSiO_4$) de aproximadamente 23% a aproximadamente 33%; sulfato de sodio (por ejemplo, Na_2SO_4) de 0% a aproximadamente 4%; perborato de sodio (por ejemplo, $NaBO_3 \cdot H_2O$) de aproximadamente 8% a aproximadamente 16%; TAED de aproximadamente 2% a aproximadamente 8%; fosfonato (por ejemplo, EDTMPA) de 0% a aproximadamente 1%; carboximetilcelulosa (CMC) de 0% a aproximadamente 2%; polímeros (por ejemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, PVP, PEG) al 0-3%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; ingredientes minoritarios (por ejemplo, supresores de la espuma, perfumes, abrillantador óptico, fotoblanqueantes) al 0-5%.

55 (4) Una composición de detergente formulada como un granulado que tiene una densidad en masa de al menos 600

- g/l que comprende alquilbencensulfonato lineal (calculado como el ácido) de aproximadamente 8% a aproximadamente 12%; etoxilato de alcohol (por ejemplo, alcohol C₁₂₋₁₅, 7 EO) de aproximadamente 10% a aproximadamente 25%; carbonato de sodio (como Na₂CO₃) de aproximadamente 14% a aproximadamente 22%; silicato soluble de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%; zeolita (por ejemplo, NaAlSiO₄) de aproximadamente 25% a aproximadamente 35%; sulfato de sodio (por ejemplo, Na₂SO₄) de 0% a aproximadamente 10%; carboximetilcelulosa (CMC) de 0% a aproximadamente 2%; polímeros (por ejemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, PVP, PEG) al 1-3%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, supresores de la espuma, perfume) al 0-5%.
- 5
- (5) Una composición de detergente líquida acuosa que comprende alquilbencensulfonato lineal (calculado como el ácido) de aproximadamente 15% a aproximadamente 21%; etoxilato de alcohol (por ejemplo, alcohol C₁₂₋₁₅, 7 EO, o alcohol C₁₂₋₁₅, 5 EO) de aproximadamente 12% a aproximadamente 18%; jabón como ácido graso (por ejemplo, ácido oleico) de aproximadamente 3% a aproximadamente 13%; ácido alquenilsuccínico (C₁₂₋₁₄) de 0% a aproximadamente 13%; aminoetanol de aproximadamente 8% a aproximadamente 18%; ácido cítrico de aproximadamente 2% a aproximadamente 8%; fosfonato de 0% a aproximadamente 3%; polímeros (por ejemplo, PVP, PEG) de 0% a aproximadamente 3%; borato (por ejemplo, B₄O₇) de 0% a aproximadamente 2%; etanol de 0% a aproximadamente 3%; propilenglicol de aproximadamente 8% a aproximadamente 14%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, dispersantes, supresores de la espuma, perfumes, abrillantador óptico) al 0-5%.
- 10
- 15
- (6) Una composición de detergente líquida acuosa que comprende alquilbencensulfonato lineal (calculado como el ácido) de aproximadamente 15% a aproximadamente 21%; etoxilato de alcohol (por ejemplo, alcohol C₁₂₋₁₅, 7 EO, o alcohol C₁₂₋₁₅, 5 EO) al 3-9%; jabón como ácido graso (por ejemplo, ácido oleico) de aproximadamente 3% a aproximadamente 10%; zeolita (como NaAlSiO₄) de aproximadamente 14% a aproximadamente 22%; citrato de potasio de aproximadamente 9% a aproximadamente 18%; borato (por ejemplo, B₄O₇) de 0% a aproximadamente 2%; carboximetilcelulosa (CMC) de 0% a aproximadamente 2%; polímeros (por ejemplo, PVP, PEG) de 0% a aproximadamente 3%; polímeros de anclaje (por ejemplo, copolímero de metacrilato de laurilo/ácido acrílico, proporción molar de 25:1, PM 3800) de 0% a aproximadamente 3%; glicerol de 0% a aproximadamente 5%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, dispersantes, supresores de la espuma, perfumes, abrillantadores ópticos) al 0-5%.
- 20
- 25
- (7) Una composición de detergente formulada como un granulado que tiene una densidad en masa de al menos 600 g/l que comprende sulfato de alcohol graso de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%; monoetanolamida de ácido graso etoxilado de aproximadamente 3% a aproximadamente 9%; jabón como ácido graso al 0-3%; carbonato de sodio (por ejemplo, Na₂CO₃) de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%; silicato soluble de aproximadamente 1% a aproximadamente 4%; zeolita (por ejemplo, NaAlSiO₄) de aproximadamente 20% a aproximadamente 40%; sulfato de sodio (por ejemplo, Na₂SO₄) de aproximadamente 2% a aproximadamente 8%; perborato de sodio (por ejemplo, NaBO₃·H₂O) de aproximadamente 12% a aproximadamente 18%; TAED de aproximadamente 2% a aproximadamente 7%; polímeros (por ejemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, PEG) de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, abrillantador óptico, supresores de la espuma, perfume) al 0-5%.
- 30
- 35
- (8) Una composición de detergente formulada como un granulado que comprende alquilbencensulfonato lineal (calculado como el ácido) de aproximadamente 8% a aproximadamente 14%; monoetanolamida de ácido graso etoxilado de aproximadamente 5% a aproximadamente 11%; jabón como ácido graso de 0% a aproximadamente 3%; carbonato de sodio (por ejemplo, Na₂CO₃) de aproximadamente 4% a aproximadamente 10%; silicato soluble de aproximadamente 1% a aproximadamente 4%; zeolita (por ejemplo, NaAlSiO₄) de aproximadamente 30% a aproximadamente 50%; sulfato de sodio (por ejemplo, Na₂SO₄) de aproximadamente 3% a aproximadamente 11%; citrato de sodio (por ejemplo, C₆H₅Na₃O₇) de aproximadamente 5% a aproximadamente 12%; polímeros (por ejemplo, PVP, copolímero de ácido maleico/acrílico, PEG) de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, supresores de la espuma, perfume) al 0-5%.
- 40
- 45
- (9) Una composición de detergente formulada como un granulado que comprende alquilbencensulfonato lineal (calculado como el ácido) de aproximadamente 6% a aproximadamente 12%; tensioactivo no iónico de aproximadamente 1% a aproximadamente 4%; jabón como ácido graso de aproximadamente 2% a aproximadamente 6%; carbonato de sodio (por ejemplo, Na₂CO₃) de aproximadamente 14% a aproximadamente 22%; zeolita (por ejemplo, NaAlSiO₄) de aproximadamente 18% a aproximadamente 32%; sulfato de sodio (por ejemplo, Na₂SO₄) de aproximadamente 5% a aproximadamente 20%; citrato de sodio (por ejemplo, C₆H₅Na₃O₇) de aproximadamente 3% a aproximadamente 8%; perborato de sodio (por ejemplo, NaBO₃·H₂O) de aproximadamente 4% a aproximadamente 9%; activador del blanqueado (por ejemplo, NOBS o TAED) de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%; carboximetilcelulosa (CMC) de 0% a aproximadamente 2%; polímeros (por ejemplo, policarboxilato o PEG) de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, abrillantador óptico, perfume) al 0-5%.
- 50
- 55
- (10) Una composición de detergente líquida acuosa que comprende alquilbencensulfonato lineal (calculado como el ácido) de aproximadamente 15% a aproximadamente 23%; etoxisulfato de alcohol (por ejemplo, alcohol C₁₂₋₁₅, 2-3
- 60

- EO) de aproximadamente 8% a aproximadamente 15%; etoxilato de alcohol (por ejemplo, alcohol C₁₂₋₁₅, 7 EO, o alcohol C₁₂₋₁₅, 5 EO) de aproximadamente 3% a aproximadamente 9%; jabón como ácido graso (por ejemplo, ácido láurico) de 0% a aproximadamente 3%; aminoetanol de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%; citrato de sodio de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%; hidrótopo (por ejemplo, toluensulfonato de sodio) de aproximadamente 2% a aproximadamente 6%; borato (por ejemplo, B₄O₇) de 0% a aproximadamente 2%; carboximetilcelulosa de 0% a aproximadamente 1%; etanol de aproximadamente 1% a aproximadamente 3%; propilenglicol de aproximadamente 2% a aproximadamente 5%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, polímeros, dispersantes, perfumes, abrillantadores ópticos) al 0-5%.
- 5 (11) Una composición de detergente líquida acuosa que comprende alquilbencensulfonato lineal (calculado como el ácido) de aproximadamente 20% a aproximadamente 32%; etoxilato de alcohol (por ejemplo, alcohol C₁₂₋₁₅, 7 EO, o alcohol C₁₂₋₁₅, 5 EO) al 6-12%; aminoetanol de aproximadamente 2% a aproximadamente 6%; ácido cítrico de aproximadamente 8% a aproximadamente 14%; borato (por ejemplo, B₄O₇) de aproximadamente 1% a aproximadamente 3%; polímero (por ejemplo, copolímero de ácido maleico/acrílico, polímero de anclaje, tal como
- 10 copolímero de metacrilato de laurilo/ácido acrílico) de 0% a aproximadamente 3%; glicerol de aproximadamente 3% a aproximadamente 8%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, hidrótopos, dispersantes, perfumes, abrillantadores ópticos) al 0-5%.
- 15 (12) Una composición de detergente formulada como un granulado que tiene una densidad en masa de al menos 600 g/l que comprende tensioactivo aniónico (alquilbencensulfonato lineal, sulfato de alquilo, α-olefinsulfonato, ésteres metílicos de α-sulfoácidos grasos, alcansulfonatos, jabón) de aproximadamente 25% a aproximadamente 40%; tensioactivo no iónico (por ejemplo, etoxilato de alcohol) de aproximadamente 1% a aproximadamente 10%; carbonato de sodio (por ejemplo, Na₂CO₃) de aproximadamente 8% a aproximadamente 25%; silicatos solubles de aproximadamente 5% a aproximadamente 15%; sulfato de sodio (por ejemplo, Na₂SO₄) de 0% a aproximadamente 5%; zeolita (NaAlSiO₄) de aproximadamente 15% a aproximadamente 28%; perborato de sodio (por ejemplo, NaBO₃-H₂O) de 0% a aproximadamente 20%; activador del blanqueado (TAED o NOBS) de aproximadamente 0% a aproximadamente 5%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, perfume, abrillantadores ópticos) al 0-3%.
- 20 (13) Composiciones de detergentes según se describe en las composiciones 1)-12) *supra*, en las que todo o parte del alquilbencensulfonato lineal está sustituido por sulfato de alquilo (C_{12-C18}).
- 25 (14) Una composición de detergente formulada como un granulado que tiene una densidad en masa de al menos 600 g/l que comprende sulfato de alquilo (C_{12-C18}) de aproximadamente 9% a aproximadamente 15%; etoxilato de alcohol de aproximadamente 3% a aproximadamente 6%; amida de ácido graso de polihidroxialquilo de aproximadamente 1% a aproximadamente 5%; zeolita (por ejemplo, NaAlSiO₄ de aproximadamente 10% a aproximadamente 20%; disilicato laminado (por ejemplo, SK56 de Hoechst) de aproximadamente 10% a aproximadamente 20%; carbonato de sodio (por ejemplo, Na₂CO₃) de aproximadamente 3% a aproximadamente 12%; silicato soluble de 0% a aproximadamente 6%; citrato de sodio de aproximadamente 4% a aproximadamente 8%; percarbonato de sodio de aproximadamente 13% a aproximadamente 22%; TAED de aproximadamente 3% a aproximadamente 8%; polímeros (por ejemplo, policarboxilatos y PVP) de 0% a aproximadamente 5%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, abrillantador óptico, fotoblanqueante, perfume, supresores de la espuma, perfume) al 0-5%.
- 30 (15) Una composición de detergente formulada como un granulado que tiene una densidad en masa de al menos 600 g/l que comprende sulfato de alquilo (C_{12-C18}) de aproximadamente 4% a aproximadamente 8%; etoxilato de alcohol de aproximadamente 11% a aproximadamente 15%; jabón de aproximadamente 1% a aproximadamente 4%; zeolita MAP o zeolita A de aproximadamente 35% a aproximadamente 45%; carbonato de sodio (como Na₂CO₃) de aproximadamente 2% a aproximadamente 8%; silicato soluble de 0% a aproximadamente 4%; percarbonato de sodio de aproximadamente 13% a aproximadamente 22%; TAED al 1-8%; carboximetilcelulosa (CMC) de 0% a aproximadamente 3%; polímeros (por ejemplo, policarboxilatos y PVP) de 0% a aproximadamente 3%; enzimas (calculadas como la enzima pura) al 0,0001-0,1%; e ingredientes minoritarios (por ejemplo, abrillantador óptico, fosfonato, perfume) al 0-3%.
- 35 (16) Las formulaciones de detergentes según se describen en 1)-15) *supra*, que contienen un perácido estabilizado o encapsulado como un componente adicional o como sustituto para sistemas blanqueantes que ya han sido especificados.
- 40 (17) Composiciones de detergentes según se han descrito anteriormente en 1), 3), 7), 9) y 12), en las que el perborato es reemplazado por percarbonato.
- 45 (18) Composiciones de detergentes según se han descrito anteriormente en 1), 3), 7), 9), 12), 14) y 15), que contienen además un catalizador de manganeso.
- 50 (19) Una composición de detergente formulada como un líquido detergente no acuoso que comprende un tensioactivo no iónico líquido, tal como, por ejemplo, alcohol primario alcoxlado lineal, un sistema reforzante (por
- 55

ejemplo, fosfato), una o más enzimas y un álcali. El detergente también puede comprender un tensioactivo aniónico y/o un sistema blanqueante.

En otra realización, puede incorporarse la 2,6-β-D-fructano hidrolasa en composiciones detergentes y emplearse para la eliminación/limpieza de biopelículas presentes en el hogar y/o en la industria textil/de lavado de ropa.

5 La composición de detergente puede formularse, por ejemplo, como una composición de detergente de lavado a mano o a máquina, que incluye una composición aditiva para el lavado de ropa adecuada para el pretratamiento de tejidos manchados y una composición suavizante del tejido añadida en el enjuagado, o puede formularse como una composición de detergente para su uso en operaciones de limpieza de superficies duras domésticas generales, o puede formularse para operaciones de lavado de vajillas a mano o a máquina.

10 En un aspecto específico, la composición de detergente puede comprender 2,6-β-D-fructano hidrolasa, uno más variantes de α-amilasa, y una o más enzimas limpiadoras distintas, tales como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, una carbohidrasa, una celulasa, una pectinasa, una mananasa, una arabinasa, una galactanasa, una xilanas, una oxidasa, una lacasa y/o una peroxidasa y/o sus combinaciones. En general, las propiedades de la enzima o enzimas elegidas deben ser compatibles con el detergente seleccionado (por ejemplo, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la enzima o enzimas deben estar
15 presentes en cantidades eficaces.

Proteasas: Las proteasas adecuadas incluyen las de origen animal, vegetal o microbiano. También son adecuados los mutantes químicamente modificados o de proteínas modificadas. La proteasa puede ser una serina proteasa o una metaloproteasa, por ejemplo, una proteasa microbiana alcalina o una proteasa similar a la tripsina. Los ejemplos de proteasas alcalinas son las subtilisinas, en especial las procedentes de *Bacillus* sp., por ejemplo, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309 (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.287.841), subtilisina 147, y subtilisina 168 (véase, por ejemplo, el documento WO 89/06279). Los ejemplos de proteasas similares a la tripsina son la tripsina (por ejemplo, de origen porcino o bovino), y las proteasas de *Fusarium* (véanse, por ejemplo, los documentos WO 89/06270 y WO 94/25583). Los ejemplos de proteasas útiles también incluyen, pero no se limitan a los variantes descritos en los documentos WO 92/19729 y WO 98/20115. Las enzimas de proteasa disponibles en el mercado adecuadas incluyen Alcalase®, Savinase®, Esperase®, y Kannase™ (Novozymes, anteriormente Novo Nordisk A/S); Maxatase®, Maxacal™, Maxapem™, Properase™, Purafect®, Purafect OxP™, FN2™, y FN3™ (Genencor International, Inc.).

Lipasas: Las lipasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes químicamente modificados o de proteínas modificadas. Los ejemplos de lipasas útiles incluyen, pero no se limitan a las lipasas de *Humicola* (sinónimo de *Thermomyces*), por ejemplo, *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) (véanse, por ejemplo, los documentos EP 258068 y EP 305216) y *H. insolens* (véase, por ejemplo, el documento WO 96/13580); una lipasa de *Pseudomonas* (por ejemplo, de *P. alcaligenes* o *P. pseudoalcaligenes*; véase, por ejemplo, el documento EP 218 272), *P. cepacia* (véase, por ejemplo, el documento EP 331 376), *P. stutzeri* (véase, por ejemplo, el documento GB 1.372.034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. cepa SD 705 (véanse, por ejemplo, los documentos WO 95/06720 y WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (véase, por ejemplo, el documento WO 96/12012); una lipasa de *Bacillus* (por ejemplo, de *B. subtilis*; véase, por ejemplo, Dartois *et al.*, Biochemica Biophysica Acta, 1131:253-360 (1993)), *B. stearothermophilus* (véase, por ejemplo, el documento JP 64/744992), o *B. pumilus* (véase, por ejemplo, el documento WO 91/16422). Otros variantes de lipasas contemplados para su uso en las formulaciones incluyen los descritos, por ejemplo, en los documentos: WO 92/05249, WO 94/01541, WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079, WO 97/07202, EP 407225, y EP 260105. Algunas enzimas de lipasa disponibles en el mercado incluyen Lipolase® y Lipolase® Ultra (Novozymes, anteriormente Novo Nordisk A/S).

Poliesterasas: Las poliesterasas útiles incluyen, pero no se limitan a las descritas en los documentos WO 01/34899 (Genencor International, Inc.) y WO 01/14629 (Genencor International, Inc.), y pueden incluirse en cualquier combinación con otras enzimas analizadas en la presente.

Amilasas: Las composiciones pueden combinarse con otras α-amilasas, tal como como una α-amilasa no variante. Estas pueden incluir amilasas disponibles en el mercado, tales como, pero sin limitarse a Duramyl®, Termamyl™, Fungamyl® y BAN™ (Novozymes, anteriormente Novo Nordisk A/S), Rapidase®, y Purastar® (Genencor International, Inc.).

Celulasas: Pueden añadirse celulasas a las composiciones. Las celulasas adecuadas incluyen las de origen bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes químicamente modificados o de proteínas modificadas. Las celulasas adecuadas incluyen celulasas de los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por ejemplo, las celulasas fúngicas producidas por *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* y *Fusarium oxysporum* descritas en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.435.307; 5.648.263; 5.691.178; 5.776.757; y documento WO 89/09259, por ejemplo. Los ejemplos de celulasas contempladas para su uso son las que imparten un beneficio de cuidado del color al tejido. Los ejemplos de dichas celulasas son las celulasas descritas en los documentos EP 0495257; EP 531 372; WO 99/25846 (Genencor International, Inc.), WO 96/34108 (Genencor International, Inc.), WO 96/11262; WO 96/29397; y WO 98/08940, por ejemplo. Otros ejemplos son los variantes de celulasa, tales

como los descritos en los documentos WO 94/07998; WO 98/12307; WO 95/24471; PCT/DK98/00299; EP 531 315; las patentes de EE. UU. n.ºs 5.457.046; 5.686.593; y 5.763.254. Las celulasas disponibles en el mercado incluyen Celluzyme® y Carezyme® (Novozymes, anteriormente Novo Nordisk A/S); Clazinase™ y Puradax® HA (Genencor International, Inc.); y KAC-500(B)™ (Kao Corporation).

- 5 Peroxidasas/oxidasas: Las peroxidasas/oxidasas adecuadas contempladas para su uso en las composiciones incluyen las de origen vegetal, bacteriano o fúngico. Se incluyen los mutantes químicamente modificados o de proteínas modificadas. Los ejemplos de peroxidasas útiles incluyen las peroxidasas de *Coprinus*, por ejemplo, de *C. cinereus*, y sus variantes, tales como los descritos en los documentos WO 93/24618, WO 95/10602, y WO 98/15257.

- 10 La enzima o enzimas detergentes pueden incluirse en una composición de detergente añadiendo aditivos separados que contienen una o más enzimas, o añadiendo un aditivo combinado que comprende todas estas enzimas. Un aditivo de detergente, es decir, un aditivo separado o un aditivo combinado, puede formularse como un granulado, líquido, suspensión, etc. Las formulaciones de aditivos de detergentes granulados adecuadas incluyen los granulados no productores de polvo.

- 15 Los granulados no productores de polvo pueden producirse, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE. UU. n.ºs 4.106.991 y 4.661.452, y opcionalmente pueden revestirse mediante métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de materiales de revestimiento cerosos son productos de poli(óxido de etileno) (por ejemplo, polietilenglicol, PEG) con pesos molares promedio de 1.000 a 20.000; nonilfenoles etoxilados que tienen de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos etoxilados, en los que el alcohol contiene de 12 a 20 átomos de carbono y en los que aparecen de 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoholes grasos; ácidos grasos; y mono-, di- y triglicéridos de ácidos grasos. Se indican ejemplos de materiales de revestimiento formadores de película adecuados para su aplicación por medio de técnicas de lecho fluido en el documento GB-1483591, por ejemplo. Las preparaciones de enzimas líquidas pueden estabilizarse, por ejemplo, añadiendo un poliol, tal como propilenglicol, un azúcar o un alcohol de azúcar, ácido láctico o ácido bórico según métodos establecidos. Las enzimas protegidas pueden prepararse según el método descrito en el documento EP 238 216.

- 25 La composición de detergente puede estar en cualquier forma conveniente, por ejemplo, una barra, un comprimido, un gel, un polvo, un gránulo, una pasta o un líquido. Un detergente líquido puede ser acuoso, y generalmente contiene hasta aproximadamente 70% de agua, y de 0% a aproximadamente 30% de disolvente orgánico. También se contemplan los geles detergentes compactos contienen 30% o menos de agua. La composición de detergente comprende uno o más tensioactivos, que pueden ser no iónicos, incluyendo semipolares, aniónicos, catiónicos o bipolares, o cualquiera de sus combinaciones. Los tensioactivos generalmente están presentes a un nivel del 0,1% al 60% en peso.

- 30 Cuando se incluye, el detergente generalmente contendrá de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% de un tensioactivo aniónico, tal como alquilbencensulfonato lineal, α -olefinsulfonato, sulfato de alquilo (sulfato de alcohol graso), etoxisulfato de alcohol, alcansulfonato secundario, éster de metilo de α -sulfoácido graso, ácido alquil- o alqueniilsuccínico o jabón.

- 35 Cuando se incluye, el detergente generalmente contendrá de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% de un tensioactivo no iónico, tal como etoxilato de alcohol, etoxilato de nonilfenol, alquilpoliglicósido, óxido de alquildimetilamina, monoetanolamida de ácido graso etoxilado, monoetanolamida de ácido graso, amida de ácido graso de polihidroalquilo o derivados de N-acil-N-alquilo de glucosamina ("glucamidas").

- 40 El detergente puede contener de 0% a aproximadamente 65% de un reforzador de detergente o agente complejante, tal como zeolita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminapentaacético, ácido alquil- o alqueniilsuccínico, silicatos solubles o silicatos laminados (por ejemplo, SKS-6 de Hoechst).

- 45 El detergente puede comprender uno o más polímeros. Los ejemplos son carboximetilcelulosa (CMC), polivinilpirrolidona (PVP), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poli(vinilpiridin-N-óxido), polivinilimidazol, policarboxilatos, por ejemplo, poli(acrilatos), copolímeros de ácido maleico/acrílico y copolímeros de metacrilato de laurilo/ácido acrílico.

- 50 El detergente puede contener un sistema blanqueante, que puede comprender una fuente de H₂O₂, tal como perborato o percarbonato, que puede combinarse con un activador del blanqueado formador de perácido (por ejemplo, tetraacetiletildiamina o nonanoiloxibencensulfonato). Como alternativa, el sistema blanqueante puede comprender peroxiácidos (por ejemplo, peroxiácidos de tipo amida, imida o sulfona). El sistema blanqueante también puede ser un sistema blanqueante enzimático.

- 55 La enzima o enzimas de la composición de detergente pueden estabilizarse empleando agentes estabilizantes convencionales, por ejemplo, un poliol (por ejemplo, propilenglicol o glicerol), un azúcar o un alcohol de azúcar, ácido láctico, ácido bórico, un derivado de ácido bórico (por ejemplo, éster borato aromático), o un derivado de ácido fenilborónico (por ejemplo, un ácido 4-formilfenilborónico). La composición puede formularse como se describe en los documentos WO 92/19709 y WO 92/19708.

El detergente también puede contener otros ingredientes de detergentes convencionales, tales como, por ejemplo, acondicionadores del tejido, que incluyen arcillas, potenciadores de la espuma, supresores de la espuma, agentes anticorrosión, agentes suspensores de la suciedad, agentes antirredósito de la suciedad, tintes, bactericidas, abrillantadores ópticos, hidrótropos, inhibidores de las manchas o perfumes.

- 5 Se contempla que, en las composiciones de detergentes, los variantes de enzimas puedan añadirse en una cantidad que se corresponde con aproximadamente 0,01 a aproximadamente 100 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavado, en particular de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 5,0 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavado, o aún más en concreto de 0,1 a aproximadamente 1,0 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavado.

10 Composiciones para el procesamiento del almidón y usos

En otro aspecto, pueden utilizarse composiciones con los variantes de α -amilasa descritos para la licuefacción y/o la sacarificación del almidón. El procesamiento del almidón es útil para producir edulcorantes, para producir alcohol para combustible o para beber (concretamente, alcohol potable), para producir una bebida, para procesar el azúcar de caña o para producir compuestos orgánicos deseados, por ejemplo, ácido cítrico, ácido itacónico, ácido láctico, ácido glucónico, cetonas, aminoácidos, antibióticos, enzimas, vitaminas y hormonas. La conversión del almidón en jarabes de fructosa normalmente consiste en tres procesos enzimáticos consecutivos: un proceso de licuefacción, un proceso de sacarificación y un proceso de isomerización. Durante el proceso de licuefacción, un variante de α -amilasa degrada el almidón para producir dextrinas a un pH de entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 6,2 y a unas temperaturas de aproximadamente 95°C a aproximadamente 160°C durante un periodo de aproximadamente 2 horas. Generalmente se añade aproximadamente 1 mM de calcio (40 ppm de iones calcio libres) para optimizar la estabilidad de la enzima bajo estas condiciones. Otros variantes de α -amilasa pueden requerir condiciones diferentes.

Después del proceso de licuefacción, las dextrinas pueden convertirse en dextrosa mediante la adición de una glucoamilasa (por ejemplo, AMG™) y, opcionalmente, una enzima desramificante, tal como una isoamilasa o una pululanasa (por ejemplo, Promozyne®). Antes de esta etapa, el pH se reduce hasta un valor por debajo de 4,5, manteniendo la temperatura alta (por encima de 95°C), y la actividad licuante del variante de α -amilasa se desnaturaliza. La temperatura disminuye hasta 60°C, y puede añadirse una glucoamilasa y una enzima desramificante. El proceso de sacarificación se desarrolla generalmente durante aproximadamente 24 a aproximadamente 72 horas.

Después del proceso de sacarificación, el pH aumenta hasta un valor en el intervalo de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0, por ejemplo, pH 7,5, y el calcio se retira mediante intercambio iónico. El jarabe de dextrosa después se convierte en un jarabe con alto contenido en fructosa empleando una glucosa isomerasa inmovilizada (tal como Sweetzyme®), por ejemplo.

El variante de α -amilasa puede proporcionar al menos una propiedad enzimática mejorada para realizar el proceso de licuefacción. Por ejemplo, el variante de α -amilasa puede tener una mayor actividad o puede tener menos necesidad del calcio. Se necesita de la adición de calcio libre para asegurar una estabilidad adecuadamente alta de la α -amilasa; sin embargo, el calcio libre inhibe muy intensamente la actividad de la glucosa isomerasa. Por consiguiente, el calcio debe retirarse antes de la etapa de isomerización, por medio de una operación en una unidad cara, hasta un punto en que se reduzca el nivel de calcio libre hasta por debajo de 3-5 ppm. Pueden ahorrarse costes si dicha operación pudiera evitarse, y el proceso de licuefacción pudiese realizarse sin la adición de iones de calcio libres. Así, los variantes de α -amilasa que no requieren iones calcio o que tengan menos necesidad del calcio son particularmente ventajosos. Por ejemplo, un variante de α -amilasa menos dependiente del calcio, que sea estable y muy activo a bajas concentraciones de calcio libre (<40 ppm) puede utilizarse en la composición y los procedimientos. Este variante de α -amilasa debe tener un pH óptimo en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,5, por ejemplo, un pH de aproximadamente 4,5 a un pH de aproximadamente 5,5. Los variantes de α -amilasa pueden emplearse por sí solos para proporcionar una hidrólisis específica o pueden combinarse con otras amilasas para proporcionar un "cóctel" con un amplio espectro de actividad.

El almidón que va a ser procesado puede ser un almidón de calidad altamente refinada, por ejemplo, al menos 90%, al menos 95%, al menos 97%, o al menos 99,5% puro. Como alternativa, el almidón puede ser un almidón más bruto que contiene materiales que comprenden semillas integrales trituradas, que incluyen fracciones que no son almidón, tales como residuos de germen y fibras. El material bruto, tal como semillas integrales, se muele para abrir la estructura y permitir su posterior procesamiento. Son adecuados dos procesos de molienda: molienda en húmedo y en seco. Además, pueden aplicarse sémola de maíz y sémola de maíz molida. Las semillas molidas secas comprenden cantidades significativas de compuestos de carbohidratos que no son almidón, además del almidón.

55 Cuando dicho material heterogéneo se procesa mediante cocimiento a chorro, a menudo solo se logra una gelatinización parcial del almidón. Por consiguiente, los variantes de α -amilasa que presentan una elevada actividad hacia el almidón no gelatinizado se aplican, de modo ventajoso, en un proceso que comprende la licuefacción y/o la sacarificación de almidón molido seco cocido a chorro.

Un variante de α -amilasa que presente una actividad de hidrólisis mayor durante el proceso de licuefacción aumenta,

de modo ventajoso, la eficacia de la etapa de sacarificación (véase el documento WO 98/22613) y la necesidad de utilizar una glucoamilasa durante la etapa de sacarificación. La glucoamilasa está presente, de modo ventajoso, en una cantidad no mayor o incluso menor que 0,5 unidades de actividad glucoamilasa (AGU)/g DS (es decir, unidades de actividad glucoamilasa por gramo de sólidos secos). La glucoamilasa puede proceder de una cepa de *Aspergillus* sp., *Talaromyces* sp., *Pachykytospora* sp., o *Trametes* sp., cuyos ejemplos son *Aspergillus niger*, *Talaromyces emersonii*, *Trametes cingulata*, or *Pachykytospora papyracea*. En una realización, el proceso también comprende el uso de un dominio de unión a carbohidratos del tipo descrito en el documento WO 98/22613.

En otro aspecto, el proceso puede comprender la hidrólisis de una suspensión de almidón gelatinizado o granular, en particular la hidrólisis del almidón granular para producir un hidrolizado de almidón soluble a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial del almidón granular. Además de ponerse en contacto con un variante de α -amilasa, el almidón puede ponerse en contacto con una o más enzimas seleccionadas del grupo que consiste en una α -amilasa fúngica (EC 3.2.1.1), una β -amilasa (EC 3.2.1.2), y una glucoamilasa (EC 3.2.1.3). En una realización, puede añadirse otra enzima amilolítica o enzima desramificante, tal como una isoamilasa (EC 3.2.1.68), o una pululanasa (EC 3.2.1.41) al variante de α -amilasa.

En una realización, el proceso se realiza a una temperatura por debajo de la temperatura de gelatinización inicial. Estos procesos a menudo se realizan al menos a 30°C, al menos a 31°C, al menos a 32°C, al menos a 33°C, al menos a 34°C, al menos a 35°C, al menos a 36°C, al menos a 37°C, al menos a 38°C, al menos a 39°C, al menos a 40°C, al menos a 41°C, al menos a 42°C, al menos a 43°C, al menos a 44°C, al menos a 45°C, al menos a 46°C, al menos a 47°C, al menos a 48°C, al menos a 49°C, al menos a 50°C, al menos a 51°C, al menos a 52°C, al menos a 53°C, al menos a 54°C, al menos a 55°C, al menos a 56°C, al menos a 57°C, al menos a 58°C, al menos a 59°C, o al menos a 60°C. El pH al cual se lleva a cabo el proceso puede estar en el intervalo de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,0, de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6,0, o de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 5,0. Un aspecto contempla un proceso que comprende una fermentación con una levadura, por ejemplo, para producir etanol a una temperatura de aproximadamente 32°C, tal como de 30°C a 35°C. En otro aspecto, el proceso comprende la sacarificación y fermentación simultáneas con una levadura para producir etanol o con otro organismo de fermentación adecuado para producir un compuesto orgánico deseado, por ejemplo, a una temperatura de 30°C a 35°C, por ejemplo, a aproximadamente 32°C. En los anteriores procesos de fermentación, el contenido en etanol alcanza al menos aproximadamente 7%, al menos aproximadamente 8%, al menos aproximadamente 9%, al menos aproximadamente 10%, al menos aproximadamente 11%, al menos aproximadamente 12%, al menos aproximadamente 13%, al menos aproximadamente 14%, al menos aproximadamente 15%, o al menos aproximadamente 16% de etanol.

La suspensión de almidón para ser empleada en cualquiera de los anteriores aspectos puede tener de aproximadamente 20% a aproximadamente 55% de sólidos secos de almidón granular, de aproximadamente 25% a aproximadamente 40% de sólidos secos de almidón granular, o de aproximadamente 30% a aproximadamente 35% de sólidos secos de almidón granular. El variante de enzima convierte el almidón soluble en un hidrolizado de almidón soluble del almidón granular en una cantidad de al menos 85%, al menos 86%, al menos 87%, al menos 88%, al menos 89%, al menos 90%, al menos 91 %, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, o al menos 99%.

En otra realización, el variante de α -amilasa se emplea en un proceso para la licuefacción o la sacarificación de un almidón gelatinizado que incluye, pero no se limita a la gelatinización mediante cocimiento con chorro. El proceso puede comprender una fermentación para producir un producto de la fermentación, por ejemplo, etanol. Este proceso para producir etanol a partir de un material que contiene almidón mediante fermentación comprende: (i) licuar el material que contiene almidón con un variante de α -amilasa; (ii) sacarificar la masa licuada obtenida; y (iii) fermentar el material obtenido en la etapa (ii) en presencia de un organismo fermentador. Opcionalmente, el proceso comprende además la recuperación del etanol. Los procesos de sacarificación y fermentación pueden realizarse como un proceso de sacarificación y fermentación simultáneas (SSF). Durante la fermentación, el contenido en etanol alcanza al menos aproximadamente 7%, al menos aproximadamente 8%, al menos aproximadamente 9%, al menos aproximadamente 10% tal como al menos aproximadamente 11%, al menos aproximadamente 12%, al menos aproximadamente 13%, al menos aproximadamente 14%, al menos aproximadamente 15%, o al menos aproximadamente 16% de etanol.

El almidón que se va a procesar en los anteriores aspectos puede obtenerse de tubérculos, raíces, tallos, legumbres, cereales o semillas integrales. De modo más específico, el almidón granular puede obtenerse de maíz, mazorcas, trigo, cebada, zahina, sagú, yuca, tapioca, sorgo, arroz, guisantes, judías, plátanos o patatas. Se contemplan en especial los tipos cerosos y no cerosos de maíz y cebada.

Tal como se emplea en la presente, el término "licuefacción" o "licuar" significa un proceso mediante el cual el almidón se convierte en dextrinas de cadena más corta y menos viscosas. En general, este proceso implica la gelatinización del almidón simultáneamente o después de la adición de un variante de α -amilasa. Pueden añadirse opcionalmente enzimas inductoras de la licuefacción adicionales. Tal como se emplea en la presente, la expresión "licuefacción primaria" se refiere a una etapa de licuefacción en la que la temperatura de la suspensión aumenta hasta su temperatura de gelatinización o a una temperatura cercana a esta. Después del aumento de la temperatura, la suspensión se envía a través de un intercambiador de calor o chorro para alcanzar unas

temperaturas de aproximadamente 90-150°C, por ejemplo, 100-110°C. Después de la aplicación a una temperatura en el intercambiador de calor o chorro, la suspensión se mantiene a esa temperatura durante un periodo de 3-10 minutos. Esta etapa de mantener la suspensión a 90-150°C se denomina licuefacción primaria.

5 Tal como se emplea en la presente, la expresión "licuefacción secundaria" se refiere a la etapa de licuefacción posterior a la licuefacción primaria (calentamiento hasta 90-150°C), cuando se deja que la suspensión se enfríe hasta la temperatura ambiente. Esta etapa de enfriamiento puede ser de 30 minutos a 180 minutos, por ejemplo, de 90 minutos a 120 minutos. Tal como se emplea en la presente, la expresión "minutos de licuefacción secundaria" se refiere al tiempo que ha transcurrido desde el inicio de la licuefacción secundaria hasta el momento en que se miden los equivalentes de dextrosa (DE).

10 Otro aspecto contempla el uso adicional de una β -amilasa en la composición que comprende el variante de α -amilasa. Las β -amilasas (EC 3.2.1.2) son amilasas maltogénicas de acción en exo, que catalizan la hidrólisis de los enlaces 1,4- α -glucosídicos para producir amilosa, amilopectina y polímeros de glucosa relacionados, liberando con ello maltosa. Las β -amilasas han sido aisladas a partir de diversas plantas y microorganismos (Fogarty *et al.*, PROGRESS IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, vol. 15, pp. 112-115, 1979). Estas β -amilasas se caracterizan por tener unas temperaturas óptimas en el intervalo de 40°C a 65°C, y un pH óptimo en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0. Las β -amilasas contempladas incluyen, pero no se limitan a las β -amilasas de la cebada Spezyme® BBA 1500, Spezyme® DBA, Optimalt™ ME, Optimalt™ BBA (Genencor International, Inc.); y Novozym™ WBA (Novozymes A/S).

20 Otra enzima cuyo uso se contempla en la composición es la glucoamilasa (EC 3.2.1.3). Las glucoamilasas proceden de un microorganismo o una planta. Por ejemplo, las glucoamilasas pueden tener un origen fúngico o bacteriano. Los ejemplos de glucoamilasas bacterianas son las glucoamilasas de *Aspergillus*, en particular, la glucoamilasa G1 o G2 de *A. niger* (Boel *et al.* (1984), EMBO J., 3(5): 097-1102), o sus variantes, tales como los descritos en los documentos WO 92/00381 y WO 00/04136; la glucoamilasa de *A. awamori* (documento WO 84/02921); la glucoamilasa de *A. oryzae* (Agric. Biol., Chem., (1991), 55(4):941-949), o sus variantes o fragmentos.

25 Otros variantes de glucoamilasa de *Aspergillus* contemplados incluyen variantes para potenciar la termoestabilidad: G137A y G139A (Chen *et al.* (1996), Prot. Eng., 9:499-505); D257E y D293E/Q (Chen *et al.* (1995), Prot. Eng., 8:575-582); N182 (Chen *et al.* (1994), Biochem. J., 301:275-281); enlaces disulfuro, A246C (Fierobe *et al.* (1996), Biochemistry, 35:8698-8704); y la introducción de restos Pro en las posiciones A435 y S436 (Li *et al.* (1997), Protein Eng., 10:1199-1204). Otras glucoamilasas contempladas incluyen las glucoamilasas de *Talaromyces*, en particular las procedentes de *T. emersonii* (documento WO 99/28448), *T. leycettanus* (patente de EE. UU. n.º RE 32.153), *T. duponti*, o *T. thermophilus* (patente de EE. UU. n.º 4.587.215). Las glucoamilasas bacterianas contempladas incluyen las glucoamilasas procedentes del género *Clostridium*, en particular *C. thermoamylolyticum* (documento EP 135138) y *C. thermohydrosulfuricum* (documento WO 86/01831). Las glucoamilasas adecuadas incluyen las glucoamilasas derivadas de *Aspergillus oryzae*, tal como una glucoamilasa que presenta 50%, 55%, 60%, 65%, 35 70%, 75%, 80%, 85%, o incluso 90% de homología con la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO:2 en el documento WO 00/04136. También son adecuadas glucoamilasas disponibles en el mercado, tales como AMG 200L; AMG 300 L; SAN™ SUPER y AMG™ E (Novozymes); OPTIDEX® 300 (Genencor International, Inc.); AMIGASE™ y AMIGASE™ PLUS (de DSM); G-ZYME® G900 (Enzyme Bio-Systems); y GZYME® G990 ZR (glucoamilasa de *A. niger* y bajo contenido en proteasas). Las glucoamilasas pueden añadirse en una cantidad de 40 0,02-2,0 AGU/g DS o 0,1-1,0 AGU/g DS, por ejemplo, 0,2 AGU/g DS.

En la composición pueden incluirse otros variantes de enzima. Pueden emplearse dos o más variantes de α -amilasa por sí solos o en combinación con otras enzimas analizadas en la presente. Por ejemplo, una tercera enzima puede ser otra α -amilasa, por ejemplo, una α -amilasa de levadura u otro variante de α -amilasa. Estas pueden ser α -amilasas de *Bacillus* o α -amilasas no procedentes de *Bacillus*.

45 Otra enzima que puede añadirse opcionalmente es una enzima desramificante, tal como una isoamilasa (EC 3.2.1.68) o una pululanasa (EC 3.2.1.41). La isoamilasa hidroliza los enlaces de las ramificaciones α -1,6-D-glucosídicos para producir amilopectina y dextrinas de límite- β y pueden distinguirse de las pululanasa por la incapacidad de la isoamilasa de atacar al pululano y por la acción limitada de la isoamilasa sobre las dextrinas de límite- α . Las enzimas desramificantes pueden añadirse en cantidades eficaces conocidas por los expertos en la 50 técnica.

La composición exacta de los productos del proceso depende de la combinación de enzimas aplicadas, así como del tipo de almidón granular procesado. El hidrolizado soluble puede ser maltosa con una pureza de al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95,0%, al menos aproximadamente 95,5%, al menos aproximadamente 96,0%, al menos aproximadamente 96,5%, al menos 55 aproximadamente 97,0%, al menos aproximadamente 97,5%, al menos aproximadamente 98,0%, al menos aproximadamente 98,5%, al menos aproximadamente 99,0% o al menos aproximadamente 99,5%. Como alternativa, el hidrolizado de almidón soluble es glucosa, o el hidrolizado de almidón tiene un DE (porcentaje de glucosa de sólidos secos solubilizados totales) de al menos 94,5%, al menos 95,0%, al menos 95,5%, al menos 60 96,0%, al menos 96,5%, al menos 97,0%, al menos 97,5%, al menos 98,0%, al menos 98,5%, al menos 99,0% o al menos 99,5%. En una realización, un proceso para fabricar helados, tartas, dulces, fruta enlatada, emplea un jarabe

especial que contiene una mezcla de glucosa, maltosa, DP3 y DPn.

5 Son adecuados dos procesos de molienda: molienda en húmedo y en seco. En la molienda en seco, el grano completo se muele y se emplea. La molienda en húmedo proporciona una buena separación del germen y la harina (gránulos de almidón y proteína) y normalmente se emplea cuando el hidrolizado de almidón se utiliza para la producción de jarabes. La molienda en seco y en húmedo son muy conocidas en la técnica del procesamiento del almidón y también se contemplan para su uso con las composiciones y los métodos descritos. El proceso puede realizarse en un sistema de ultrafiltración, en el que el retenido se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón bruto y agua, y en el que el permeado es el hidrolizado de almidón soluble. Otro método es el proceso realizado en un reactor de membrana continua con membranas de ultrafiltración, en el que el retenido se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón bruto y agua, y en el que el permeado es el hidrolizado de almidón soluble. También se contempla el proceso realizado en un reactor de membrana continua con membranas de microfiltración, en el que el retenido se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón bruto y agua, y en el que el permeado es el hidrolizado de almidón soluble.

15 En un aspecto, el hidrolizado de almidón soluble del proceso se somete a una conversión a jarabe con base de almidón con alto contenido en fructosa (HFSS), tal como jarabe de maíz con alto contenido en fructosa (HFCS). Esta conversión puede lograrse empleando una glucosa isomerasa, en particular una glucosa isomerasa inmovilizada sobre un soporte sólido. Las isomerasas contempladas incluyen los productos comerciales Sweetzyme®, IT (Novozymes A/S); G-zyme® IMG1, y G-zyme® G993, Ketomax®, G-zyme® G993, G-zyme® G993 líquido, y GenSweet® IGI.

20 En otro aspecto, el hidrolizado de almidón soluble del proceso puede emplearse para la producción de combustible o etanol potable. En el proceso del tercer aspecto, la fermentación puede realizarse de modo simultáneo o separado/secuencial con la hidrólisis de la suspensión de almidón granular. Cuando la fermentación se realiza de modo simultáneo con la hidrólisis, la temperatura puede ser de entre 30°C y 35°C, en particular entre 31°C y 34°C. El proceso puede llevarse a cabo en un sistema de ultrafiltración, en el que el retenido se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón bruto, levaduras, nutrientes para levaduras y agua, y en el que el permeado es un líquido que contiene etanol. También se contempla que el proceso se lleve a cabo en un reactor de membrana continua con membranas de ultrafiltración, en el que el retenido se mantiene en recirculación en presencia de enzimas, almidón bruto, levaduras, nutrientes para levaduras y agua, y en el que el permeado es un líquido que contiene etanol.

30 El hidrolizado de almidón soluble del proceso también puede utilizarse para la producción de un producto de fermentación, que comprende fermentar el almidón tratado para producir un producto de fermentación, tal como ácido cítrico, glutamato de monosodio, ácido glucónico, gluconato de sodio, gluconato de calcio, gluconato de potasio, glucono delta-lactona, o eritorbato de sodio.

35 La actividad amilolítica del variante de α -amilasa puede determinarse empleando almidón de patata como sustrato. Este método se base en la degradación del almidón de patata modificado por la enzima, y tras la reacción se mezclan muestras de la disolución de almidón/enzima con una disolución de yodo. Al principio se forma un color azul negruzco, pero durante la degradación del almidón, el color azul se va haciendo más débil y gradualmente se convierte en un marrón rojizo, que se compara con un patrón de vidrio coloreado.

Producción de etanol

40 El polipéptido variante de PS4 puede emplearse, en general, para convertir el almidón en azúcares que después pueden procesarse en etanol u otros productos de valor añadido, tales como edulcorante de maíz con alto contenido en fructosa. Así, se describe el uso de polipéptidos variantes de PS4 para la producción de etanol y, específicamente, de bioetanol, que, en este documento, debe considerarse como cualquier etanol producido por la fermentación de biomasa.

45 El etanol producido de esta manera puede utilizarse como combustible o bebida, o puede utilizarse en un proceso de fermentación para producir compuestos orgánicos, tales como ácido cítrico, ácido ascórbico, lisina, ácido glutámico. Estos se describen con más detalle a continuación.

50 El etanol (o alcohol etílico) es muy conocido por ser la base de bebidas alcohólicas, tales como licores, cerveza y vino. Además, el etanol tiene muchos usos en la producción de productos químicos industriales, compuestos farmacéuticos y como combustible para el transporte.

55 El etanol puede ser producido a partir de casi cualquier materia prima que contenga azúcar o carbohidratos. Como tal, el etanol puede fabricarse a partir de una amplia diversidad de materiales biológicos. Los 3 tipos principales de materia prima de biomasa empleados para producir etanol incluyen cultivos de azúcar, tal como caña de azúcar; cultivos de almidón, que incluyen trigo y maíz, y materiales celulósicos, tales como restos de cosechas (paja, etc.), y residuos forestales. La producción de etanol a partir de fuentes fácilmente disponibles de celulosa proporciona una fuente de combustible renovable y estable.

La tecnología de procesamiento que se emplea con más frecuencia es la molienda de semillas en seco. En este

proceso, las semillas primero se muelen hasta una consistencia de harina de semillas. La harina después se mezcla con agua y amilasa y hace pasar a través de hornos en donde el almidón en las semillas se licúa. Después de la adición de la glucoamilasa, el almidón licuado se convierte en azúcares fermentables. Después se añade levadura a la masa para fermentar los azúcares para producir etanol. Después de la fermentación, la masa se somete a un proceso de destilación y deshidratación en el que el alcohol se retira de los sólidos y el agua. En la práctica, aproximadamente dos terceras partes de cada tonelada de semillas se convierte en etanol para combustible. El resto de los subproductos (residuos finos y semillas de destilería húmedas) son un pienso para ganado con alto contenido en proteínas que es particularmente adecuado para animales, tales como ganado vacuno u ovejas.

El etanol también puede fabricarse a partir de fuentes que contienen celulosa, tal como pulpa de madera. La materia prima basada en celulosa está compuesta de residuos agrícolas, hierbas y madera y otra biomasa de bajo valor, tal como residuos municipales (por ejemplo, papel reciclado, restos de podas, etc.). El etanol puede producirse a partir de la fermentación de cualquiera de estas materias primas celulósicas. Sin embargo, la celulosa debe convertirse primero en azúcares antes de la conversión en etanol mediante un tratamiento con una enzima adecuada, tal como celulasa.

Cuando el etanol sale de la planta procesadora, en teoría puede emplearse como combustible de automoción en sí mismo o puede mezclarse con gasolina a una proporción de 85 a 15 para formar el denominado "combustible de etanol puro". Sin embargo, de modo más habitual, el etanol se mezcla con gasolina a concentraciones de 7 al 10% en volumen. El etanol puede emplearse como potenciador del octanaje. El etanol, como fuente de combustible, es más respetuoso con el medioambiente que los productos derivados del petróleo. Se sabe que el uso de etanol mejora la calidad del aire y probablemente reduce los niveles de ozono locales y la niebla contaminada. Además, la utilización del etanol en lugar de la gasolina puede tener una importancia estratégica para amortiguar el impacto de cambios repentinos en el suministro de energía no renovable y petroquímica.

Aplicaciones para la fabricación de cerveza

El etanol (o alcohol etílico) es muy conocido por ser la base de bebidas alcohólicas, tales como licores, cerveza y vino. Así, los polipéptidos variantes de PS4 descritos en la presente pueden utilizarse para la fabricación de cerveza. Todas las cervezas se fabrican empleando un proceso basado en una fórmula simple.

El proceso de fabricación de cerveza implica el uso de semillas malteadas, que, dependiendo de la región, pueden ser tradicionalmente cebada, trigo o, a veces, centeno. La malta se fabrica dejando germinar una semilla, tras lo cual se seca en un horno y a veces se tuesta. El proceso de germinación crea una serie de enzimas, en particular α -amilasa y β -amilasa, que se emplean para convertir el almidón de la semilla en azúcar. Dependiendo de la cantidad de tostado, la malta tendrá un color oscuro e influye mucho en el color y el sabor de la cerveza.

La malta se tritura para romper el grano de la semilla, aumentar su superficie específica y separar los trozos más pequeños de las cáscaras. El material molido resultante se mezcla con agua calentada en una cuba denominada "cuba de maceración" para un proceso denominado "macerado". Durante este proceso, las enzimas naturales dentro de la malta degradan la mayor parte del almidón en azúcares que desempeñan un papel crucial en el proceso de fermentación. La maceración habitualmente dura de 1 a 2 horas y, durante este tiempo, diversos momentos de reposo de la temperatura (periodos de espera) activan diferentes enzimas dependiendo del tipo de malta utilizada, su nivel de modificación y el gusto del cervecero. La actividad de estas enzimas convierte los almidones de las semillas en dextrinas y, después, en azúcares fermentables, tales como como maltosa. La cuba de maceración en general contiene un "fondo falso" ranurado u otra forma de colector que actúa como colador para la separación del líquido de las semillas.

Un reposo del macerado de 120°F a 130°F (de 49°C a 55°C) activa diversas proteinasas, que degradan las proteínas que, de otro modo, podría hacer que la cerveza se enturbie. Pero es indispensable tener cuidado, puesto que el copete de la cerveza también está compuesto principalmente de proteínas, así que un reposo demasiado agresivo para las proteínas podría producir una cerveza que no pudiese formar copete. Este reposo en general se emplea sólo con maltas poco modificadas (es decir, poco malteadas) que son cada vez menos populares en Alemania y la República Checa, o en semillas no malteadas, tales como maíz y arroz, que se emplean mucho en las cervezas estadounidenses. Un reposo del macerado a 60°C o 140°F activa la beta-glucanasa, que degrada los beta-glucanos gomosos en el macerado, haciendo que los azúcares fluyan con más libertad en momentos posteriores del proceso. En el proceso de maceración moderno pueden añadirse beta-glucanasas de origen fúngico comerciales como suplemento. Por último, se emplea una temperatura de reposo del macerado de 149 a 160°F (de 65 a 71°C) para convertir los almidones en la malta a azúcares, que entonces pueden ser utilizados por las levaduras en momentos posteriores del proceso de fabricación de la cerveza. Cuando se realiza este último reposo en el extremo inferior del intervalo se producen más azúcares de orden inferior que son más fermentables por las levaduras. Esto, a su vez, crea una cerveza con menos cuerpo y mayor contenido en alcohol. Un reposo cercano al extremo superior del intervalo crea más azúcares de orden superior que son menos fermentables por las levaduras, así que se produce una cerveza con más cuerpo y menos alcohol.

Después de la maceración, el líquido resultante se cuela de las semillas en un proceso denominado drenaje. Antes del drenaje, la temperatura del macerado puede aumentar de 165°F a 170°F (aproximadamente 75°C) (etapa

conocida como "mashout") para desactivar las enzimas. Puede rociarse más agua sobre las semillas para extraer más azúcares (un proceso denominado lavado).

5 En este momento, el líquido se denomina mosto. El mosto se traslada a un tanque grande conocido como "caldero", en el que se hierve con lúpulo y, a veces, otros ingredientes, tales como hierbas o azúcares. El proceso de hervido sirve para terminar los procesos enzimáticos, precipitar las proteínas, isomerizar las resinas del lúpulo, concentrar y esterilizar el mosto. El lúpulo añade sabor, aroma y amargor a la cerveza. Al final del hervido, el mosto con lúpulo se decanta para aclararlo en un recipiente denominado "whirlpool" (remolino) y el mosto aclarado después se enfría.

10 El mosto después se traslada a un "recipiente de fermentación", en el que se añade o se "siembra" la levadura. La levadura convierte los azúcares de la malta en alcohol, dióxido de carbono y otros componentes a través de un proceso denominado glicólisis. Después de una semana a tres semanas, la cerveza reciente (o "verde") se traslada a tanques de acondicionamiento. Después de un acondicionamiento durante una semana a varios meses, la cerveza a menudo se filtra para eliminar las levaduras y las partículas. La "cerveza clara" entonces está lista para servir o envasar.

15 Por tanto, uno o más de los polipéptidos variantes de PS4 descritos en la presente puede añadirse en cualquier etapa del proceso de fabricación de cerveza para complementar la actividad amilasa generada de modo natural.

Aplicaciones para piensos animales

En una realización, el polipéptido variante de PS4 es capaz de degradar el almidón resistente.

Tal como se emplea en la presente, el término "degradar" se refiere a la hidrólisis o degradación parcial o completa del almidón resistente para producir glucosa y/u oligosacáridos, tales como maltosa y/o dextrinas.

20 El polipéptido variante de PS4 puede degradar el almidón resistente residual que no ha sido completamente degradado por una amilasa de los animales. Como ejemplo, el polipéptido variante de PS4 puede emplearse para ayudar a la amilasa de un animal (por ejemplo, la amilasa pancreática) a mejorar la degradación del almidón resistente. La α -amilasa pancreática es excretada en el sistema digestivo por los animales. La α -amilasa pancreática degrada el almidón del pienso. Sin embargo, una parte del almidón, el almidón resistente, no es completamente
25 degradado por la α -amilasa pancreática y, por tanto, no es absorbido en el intestino delgado (véase la definición de almidón resistente). El polipéptido variante de PS4, en algunas realizaciones, es capaz de ayudar a la α -amilasa pancreática a degradar el almidón en el sistema digestivo y, por tanto, aumenta la utilización del almidón por el animal.

30 La capacidad de una enzima para degradar el almidón resistente puede analizarse, por ejemplo, mediante un método desarrollado y descrito por Megazyme International Ireland Ltd. para la medición del contenido en almidón resistente, almidón solubilizado y almidón total de una muestra (procedimiento de ensayo del almidón resistente, AOAC método 2002.02, AACC método 32-40).

Por consiguiente, los polipéptidos variantes de PS4 pueden ser ingeridos por un animal con objetivo beneficioso y, por tanto, pueden incorporarse en piensos para animales.

35 Por tanto, se describe el uso de un polipéptido variante de PS4 como componente para su uso en un pienso que comprende almidón, o para su uso en una composición mejoradora del pienso, en el que el polipéptido variante de PS4 es capaz de degradar el almidón resistente. También se describe un pienso que comprende un almidón y un polipéptido variante de PS4. También se describe un método para degradar el almidón resistente en un pienso, que comprende poner en contacto dicho almidón resistente con un polipéptido variante de PS4.

40 También se describe el uso de un polipéptido variante de PS4 para la preparación de un pienso que comprende almidón, para degradar el almidón resistente. Además, se describe el uso de un polipéptido variante de PS4 para la preparación de un pienso para mejorar el valor calorífico de dicho pienso. Se describe el uso de una enzima para la preparación de un pienso para mejorar el rendimiento del animal. En otra realización, se describe un proceso para preparar un pienso que comprende mezclar un almidón y una enzima de polipéptido variante de PS4.

45 Como ejemplo, el uso de un componente que comprende polipéptidos variantes de PS4 y que es capaz de degradar el almidón resistente resulta ventajoso, porque se produce un notable aumento en la degradación del almidón y/o de los productos de la degradación del almidón en un animal. Además, dicho uso resulta ventajoso, porque se produce un notable aumento en la digeribilidad del almidón y/o de los productos de la degradación del almidón en un animal. Además, dicho uso resulta ventajoso porque proporciona un medio para potenciar la eficacia de obtener energía de
50 un pienso por parte de un animal. Además, dicho uso resulta ventajoso porque proporciona un medio para potenciar la biodisponibilidad del almidón resistente.

Piensos para animales

Los piensos animales para los cuales resulta adecuado el uso de los polipéptidos variantes de PS4 pueden formularse para que satisfagan las necesidades específicas de grupos animales concretos y para que proporcionen

los carbohidratos, grasas, proteínas y otros nutrientes necesarios en una forma que pueda ser metabolizada por el animal.

Preferiblemente, el pienso para animales es un pienso para cerdos o aves de corral.

5 Tal como se emplea en la presente, el término "cerdo" se refiere a omnívoros no rumiantes, tales como cerdos o jabalíes. Generalmente, el pienso para cerdos incluye aproximadamente 50% de carbohidratos, aproximadamente 20% de proteínas y aproximadamente 5% de grasas. Un ejemplo de un pienso para cerdos de alto contenido energético se basa en maíz que a menudo se combina con suplementos para piensos, por ejemplo, proteínas, minerales, vitaminas y aminoácidos, tales como lisina y triptófano. Los ejemplos de piensos para cerdos incluyen productos de proteína animal, productos marinos, productos lácteos, productos de semillas y productos de proteína vegetal, todos los cuales pueden comprender además aromas naturales, aromas artificiales, micro- y macrominerales, grasas animales, grasas vegetales, vitaminas, conservantes o medicaciones, tales como antibióticos.

15 Debe entenderse que, en la presente memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, cuando se remite a un "pienso para cerdos", esta referencia incluye los piensos "de transición" o "de iniciación" (empleados para destetar a los cochinitos) y piensos "de engorde" o "de crecimiento" (empleados después de la etapa de transición para el crecimiento del cerdo hasta una edad y/o tamaño adecuados para el mercado).

20 Tal como se emplea en la presente, la expresión "aves de corral" se refiere a aves, tales como pollos, pollos para asar, gallinas, gallos, capones, pavos, patos, aves de caza, pularda o pollitos. Los piensos para aves de corral pueden denominarse piensos "completos" porque contienen todas las proteínas, energía, vitaminas, minerales y otros nutrientes necesarios para el crecimiento adecuado, la producción de huevos y la salud de las aves. Sin embargo, los piensos para aves de corral pueden comprender además vitaminas, minerales o medicaciones, tales como coccidioestatos (por ejemplo monensina sodio, lasalocida, amprolio, salinomocina y sulfaquinoxalina) y/o antibióticos (por ejemplo, penicilina, bacitracina, clortetraciclina y oxitetraciclina).

25 Los pollos jóvenes o pollos para asar, los pavos y los patos criados para la producción de carne se alimentan de modo diferente de las pulardas destinadas a la producción de huevos. Los pollos para asar, los patos y los pavos tienen cuerpos más grandes y ganan peso con más rapidez que las gallinas de tipo ponedoras. Por tanto, estas aves reciben dietas con mayor contenido en proteínas y niveles energéticos.

30 Debe entenderse que, en la presente memoria descriptiva, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, cuando se remite a un "pienso para aves de corral", esta referencia incluye los piensos "de iniciación" (después de la eclosión), piensos "de engorde", "de crecimiento" o "de desarrollo" (de 6-8 semanas de edad hasta que se alcanza el tamaño del sacrificio) y piensos "para ponedoras" (durante la producción de huevos).

Los piensos para animales pueden formularse para que satisfagan las necesidades nutricionales del animal con respecto, por ejemplo, a la producción de carne, la producción de leche, la producción de huevos, la reproducción y la respuesta al estrés. Además, los piensos para animales se formulan para mejorar la calidad del estiércol.

35 En un aspecto preferido, el pienso para animales contiene un material en crudo, tal como una legumbre, por ejemplo, guisantes o soja, o un cereal, por ejemplo, trigo, maíz, centeno o cebada. De modo adecuado, el material en crudo puede ser patata.

Composiciones de piensos

40 Los polipéptidos variantes de PS4 pueden emplearse en piensos para el consumo animal por medio de la aplicación indirecta o directa de los polipéptidos variantes de PS4 al pienso, solos o en combinación con otros ingredientes, tales como ingredientes alimentarios.

45 Los ingredientes alimentarios típicos pueden incluir uno cualquiera o más de un aditivo, tal como una grasa animal o vegetal, un aliño natural o sintético, un antioxidante, un modificador de la viscosidad, un aroma y/o aceite esencial, un tinte y/o un colorante, vitaminas, minerales, aminoácidos naturales y/o no naturales, nutrientes, otras enzimas (que incluyen enzimas genéticamente manipuladas), un agente ligante, tal como goma de guar o goma de xantano, un tampón, un emulgente, un lubricante, un adyuvante, un agente suspensor, un conservante, un agente de revestimiento o un agente solubilizante y similares.

50 Los ejemplos de métodos de aplicación incluyen, pero no se limitan al revestimiento del pienso con un material que comprende el polipéptido variante de PS4, la aplicación directa mediante el mezclado del polipéptido variante de PS4 con el pienso, la pulverización del polipéptido variante de PS4 sobre la superficie del pienso, o la inmersión del pienso en una preparación del polipéptido variante de PS4.

El polipéptido variante de PS4 se aplica preferiblemente mezclándolo con un pienso o pulverizándolo sobre partículas de pienso para el consumo animal. Como alternativa, el polipéptido variante de PS4 puede incluirse en la emulsión de un pienso o en el interior de productos sólidos mediante inyección o remoción.

El polipéptido variante de PS4 puede aplicarse para que esté disperso, esté revestido y/o esté impregnado en un pienso. También pueden emplearse mezclas con otros ingredientes y estas pueden aplicarse por separado, de modo simultáneo o secuencial. De modo similar, pueden aplicarse al pienso agentes quelantes, agentes ligantes, emulgentes y otros aditivos, tales como micro- y macrominerales, aminoácidos, vitaminas, grasas animales, grasas vegetales, conservantes, aromas, colorantes, de modo simultáneo (en una mezcla o por separado) o secuencial.

Cantidad del polipéptido variante de PS4

La cantidad óptima del polipéptido variante de PS4 que se va a usar dependerá del pienso que se va a tratar y/o del método de poner en contacto el pienso con el polipéptido variante de PS4 y/o el uso previsto del mismo. La cantidad de polipéptido variante de PS4 debe ser una cantidad suficiente para que sea eficaz para degradar sustancialmente el almidón resistente después de su ingestión y durante la digestión del pienso.

De modo ventajoso, el polipéptido variante de PS4 seguirá siendo eficaz después de la ingestión del pienso para el consumo animal y durante la digestión del pienso hasta que se obtenga una digestión más completa del pienso, es decir, se libera un valor calorífico mayor del pienso.

Combinaciones de amilasa

Se describen, en particular, combinaciones de polipéptidos variantes de PS4 con amilasas, en particular, amilasas maltogénicas. La alfa-amilasa maltogénica (glucano 1,4-a-maltohidrolasa, E.C. 3.2.1.133) es capaz de hidrolizar la amilosa y la amilopectina para obtener maltosa en la configuración alfa.

Una alfa-amilasa maltogénica de *Bacillus* (documento EP 120 693) está disponible en el mercado con el nombre comercial de Novamyl (Novo Nordisk A/S, Dinamarca) y se emplea mucho en la industria panadera como agente antienranciamiento debido a su capacidad para reducir la retrogradación del almidón. El Novamyl se describe en detalle en la publicación de patente internacional WO 91/04669. La alfa-amilasa maltogénica Novamyl comparte varias características con las ciclodextrina glucanotransferasas (CGTasas), que incluyen una homología de secuencia (Henrissat B., Bairoch A., *Biochem. J.*, 316, 695-696 (1996)) y la formación de productos de la transglicosilación (Christophersen, C., *et al.*, 1997, *Starch*, vol. 50, n.º 1, 39-45).

En realizaciones muy preferidas, se describen combinaciones que comprenden polipéptidos variantes de PS4 junto con Novamyl o cualquiera de sus variantes. Estas combinaciones son útiles para la producción de alimentos, tales como alimentos horneados. El Novamyl puede comprender, en particular, Novamyl 1500 MG.

Otros documentos que describen el Novamyl y sus usos incluyen Christophersen, C., Pedersen, S., y Christensen, T., (1993), Method for production of maltose and a limit dextrin, the limit dextrin, and use of the limit dextrin, Dinamarca, y documento WO 95/10627. También se describe en la patente de EE. UU. n.º 4.598.048 y la patente de EE. UU. n.º 4.604.355. Cualquiera de los polipéptidos de Novamyl descritos en estos documentos puede emplearse en combinaciones con cualquiera de los polipéptidos variantes de PS4 descritos en la presente.

Pueden emplearse variantes, homólogos y mutantes del Novamyl para las combinaciones, con la condición de que conserven la actividad alfa-amilasa. Por ejemplo, cualquiera de los variantes de Novamyl descritos en la patente de EE. UU. n.º 6.162.628 puede emplearse en combinación con los polipéptidos variantes de PS4 descritos en la presente. En particular, puede emplearse cualquiera de los polipéptidos descritos en ese documento, específicamente los variantes de SEQ ID NO:1 del documento US 6.162.628 en una o más posiciones que se corresponden con Q13, I16, D17, N26, N28, P29, A30, S32, Y33, G34, L35, K40, M45, P73, V74, D76 N77, D79, N86, R95, N99, I100, H103, Q119, N120, N131, S141, T142, A148, N152, A163, H169, N171, G172, I174, N176, N187, F188, A192, Q201, N203, H220, N234, G236, Q247, K249, D261, N266, L268, R272, N275, N276, V279, N280, V281, D285, N287, F297, Q299, N305, K316, N320, L321, N327, A341, N342, A348, Q365, N371, N375, M378, G397, A381, F389, N401, A403, K425, N436, S442, N454, N468, N474, S479, A483, A486, V487, S493, T494, S495, A496, S497, A498, Q500, N507, I510, N513, K520, Q526, A555, A564, S573, N575, Q581, S583, F586, K589, N595, G618, N621, Q624, A629, F636, K645, N664 y/o T681.

Secuencias de aminoácidos

La invención emplea un ácido nucleico variante de PS4, y las secuencias de aminoácidos de dichos ácidos nucleicos variantes de PS4 se incluyen en los métodos y las composiciones descritos en la presente.

Tal como se emplea en la presente, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónima del término "polipéptido" y/o del término "proteína". En algunos casos, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónima del término "péptido". En algunos casos, la expresión "secuencia de aminoácidos" es sinónima del término "enzima".

La secuencia de aminoácidos puede prepararse/aislarse a partir de una fuente adecuada, o puede fabricarse de modo sintético o puede prepararse mediante el uso de técnicas de ADN recombinante.

La enzima de variante de PS4 descrita en la presente puede emplearse junto con otras enzimas. Así, se describe además una combinación de enzimas, en la que la combinación comprende una enzima de polipéptido variante de

PS4 descrita en la presente y otra enzima, que en sí misma puede ser otra enzima de polipéptido variante de PS4.

Secuencia de nucleótidos del variante de PS4

Tal como se indicó anteriormente, se describen secuencias de nucleótidos que codifican enzimas de variantes de PS4 que tienen las propiedades específicas descritas.

5 La expresión "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico", tal como se emplea en la presente, se refiere a una secuencia oligonucleotídica o secuencia polinucleotídica, y sus variantes, homólogos, fragmentos y derivados (tales como sus porciones). La secuencia de nucleótidos puede tener un origen genómico, sintético o recombinante, y puede ser bicatenaria o monocatenaria y representar la hebra sentido o antisentido.

10 La expresión "secuencia de nucleótidos", tal como se emplea en este documento, incluyen ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN. Preferiblemente significa ADN, más preferiblemente una secuencia de ADNc que codifica un polipéptido variante de PS4.

15 Generalmente, una secuencia de nucleótidos de un variante de PS4 se prepara empleando técnicas de ADN recombinante (concretamente, ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa, la secuencia de nucleótidos puede sintetizarse, entera o en parte, empleando métodos químicos muy conocidos en la técnica (véase Caruthers M.H. *et al.* (1980), Nuc. Acids Res. Symp. Ser., 215-223, y Horn T. *et al.* (1980), Nuc. Acids Res. Symp. Ser., 225-232).

Preparación de secuencias de ácidos nucleicos

20 Una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima que tiene las propiedades específicas definidas en la presente (por ejemplo, un polipéptido variante de PS4) o una enzima que es adecuada para su modificación, tal como una enzima de origen, puede identificarse y/o aislarse y/o purificarse a partir de cualquier célula u organismo que produce dicha enzima. En la técnica se conocen diversos métodos para la identificación y/o el aislamiento y/o la purificación de secuencias de nucleótidos. Como ejemplo, pueden emplearse técnicas de amplificación con PCR para preparar más de una secuencia, después de haber identificado y/o aislado y/o purificado una secuencia adecuada.

25 Como otro ejemplo, puede construirse un banco de ADN genómico y/o ADNc empleando ADN cromosómico o ARN mensajero del organismo que produce la enzima. Si la secuencia de aminoácidos de la enzima o una parte de la secuencia de aminoácidos de la enzima es conocida, pueden sintetizarse sondas oligonucleotídicas marcadas y emplearse para identificar clones que codifican la enzima a partir del banco genómico preparado a partir del organismo. Como alternativa, puede emplearse una sonda oligonucleotídica marcada que contiene secuencias homólogas con otro gen de enzima conocido para identificar los clones que codifican la enzima. En este último caso, se emplea una hibridación y unas condiciones de lavado de menor rigurosidad.

30 Como alternativa, los clones que codifican la enzima pueden identificarse insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando una bacteria negativa a la enzima con el banco de ADN genómico resultante, y después cultivando la bacteria transformada en placas de agar que contienen un sustrato para una enzima (concretamente, maltosa), permitiendo con ello que los clones expresen la enzima que se va a identificar.

35 En otra alternativa, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima puede prepararse de modo sintético por medio de métodos convencionales establecidos, por ejemplo, el método de fosforamidita descrito por Beucage S.L. *et al.* (1981), Tetrahedron Letters, 22, p. 1859-1869, o el método descrito por Matthes *et al.* (1984), EMBO J., 3, pp. 801-805. En el método de fosforamidita, los oligonucleótidos se sintetizan, por ejemplo, en un sintetizador de ADN automático, se purifica, se reasocian, se acoplan y se clonan en vectores apropiados.

40 La secuencia de nucleótidos puede tener un origen genómico y sintético mixto, un origen sintético y de ADNc mixto, o un origen genómico y de ADNc mixto, y se prepara acoplando fragmentos de origen sintético, genómico o de ADNc (según sea apropiado) según técnicas convencionales. Cada fragmento acoplado se corresponde con diversas partes de la secuencia de nucleótidos completa. La secuencia de ADN también puede prepararse mediante una reacción en cadena con polimerasa (PCR) empleando cebadores específicos, por ejemplo, tal como se describe en el documento US 4.683.202 o en Saiki R. K. *et al.* (Science (1988), 239, pp. 487-491).

Variantes/homólogos/derivados

45 También se describe el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de una enzima o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifique dicha enzima, tal como un polipéptido variante de PS4 o un ácido nucleico variante de PS4. A menos que el contexto indique lo contrario, la expresión "ácido nucleico variante de PS4" incluye cada una de las entidades de ácidos nucleicos descritas a continuación y, de modo similar, la expresión "ácido nucleico variante de PS4" incluye cada una de las entidades de polipéptidos o aminoácidos descritas a continuación.

En la presente, el término "homólogo" significa una entidad que presenta cierta homología con las secuencias de aminoácidos en cuestión y las secuencias de nucleótidos en cuestión. En la presente, el término "homología" es igual que "identidad".

5 En el presente contexto, una secuencia homóloga incluye una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos 75, 80, 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a la secuencia en cuestión. Generalmente, los homólogos comprenden los mismos sitios activos, etc., que la secuencia de aminoácidos en cuestión. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, restos aminoácidos que tienen funciones/propiedades químicas similares), en el contexto de este documento se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

10 En el presente contexto, una secuencia homóloga incluye una secuencia de nucleótidos que puede ser al menos 75, 80, 85 o 90% idéntica, preferiblemente al menos 95, 96, 97, 98 o 99% idéntica a una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima de polipéptido variante de PS4 (tal como un ácido nucleico variante de PS4). Generalmente, los homólogos comprenden las mismas secuencias que codifican los sitios activos, etc., que la secuencia en cuestión. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, restos aminoácidos que tienen funciones/propiedades químicas similares), en el contexto de este documento se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de homología pueden realizarse de modo visual o, de modo más habitual, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el mercado pueden calcular el porcentaje de homología entre dos o más secuencias.

20 El porcentaje de homología puede calcularse a lo largo de secuencia contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el correspondiente aminoácido en la otra secuencia, procediendo de resto a resto. Esto se denomina alineamiento "sin huecos". Generalmente, estos alineamientos sin huecos se realizan solo a lo largo de un número relativamente pequeño de restos.

25 Aunque es un método muy sencillo y coherente, no toma en cuenta que, por ejemplo, en un par de secuencias, por los demás idénticas, una inserción o deleción provoca que los siguientes aminoácidos estén fuera del alineamiento, y así potencialmente provoca una mayor reducción en el porcentaje de homología cuando se realiza un alineamiento global. Por consiguiente, la mayoría de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineamientos óptimos que toman en cuenta las posibles inserciones y deleciones sin penalizar de modo indebido la puntuación global de homología. Esto se logra insertando "huecos" en el alineamiento de las secuencias para intentar maximizar la homología local.

30 Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones de hueco" a cada hueco que se produce en el alineamiento, de modo que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con el menor número de huecos posible (que refleja el mayor emparejamiento entre las dos secuencias comparadas) logra una puntuación mayor que un alineamiento con muchos huecos. Se emplean generalmente los "costes de huecos afines" que cobran un coste relativamente alto por la existencia de un hueco y una penalización menor por cada resto posterior en el hueco. Este es el sistema de puntuación de huecos que se emplea más habitualmente. Por supuesto, unas elevadas penalizaciones de huecos producen alineamientos óptimos con menos huecos. La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar la penalización de huecos. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores por defecto cuando se emplean dichos programas para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se emplea el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalización de hueco por defecto para secuencias de aminoácidos es de -12 para un hueco y de -4 para cada extensión.

45 Por tanto, el cálculo del porcentaje máximo de homología requiere, en primer lugar, la producción de un alineamiento óptimo, tomando en cuenta las penalizaciones de hueco. Un programa informático adecuado para realizar dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Devereux *et al.*, 1984, *Nuc. Acids Research*, 12, p. 387). Los ejemplos de otros tipos de software que pueden realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no se limitan al paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed., capítulo 18), FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.*, 403-410) y el paquete de programas GENWORKS de herramientas de comparación. BLAST y FASTA están disponibles para una búsqueda en línea y fuera de línea (véase Ausubel *et al.*, 1999, *Short Protocols in Molecular Biology*, pp. 7-58 a 7-60).

Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere emplear el programa GCG Bestfit. Una nueva herramienta, denominada BLAST 2 Sequences, también está disponible para comparar secuencias de proteínas y de nucleótidos (véase FEMS Microbiol. Lett., 1999, 174(2):247-250; FEMS Microbiol. Lett., 1999, 177(1):187-188, y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

55 Aunque el porcentaje final de homología puede medirse en términos de identidad, el propio proceso de alineamiento generalmente no se basa en comparaciones de parejas de todo o nada. Por el contrario, en general se emplea una matriz de puntuación de similitud a escala que asigna puntuaciones a cada comparación apareada basándose en la similitud química o la distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz, que se emplea habitualmente, es la matriz

BLOSUM62, la matriz por defecto del paquete de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin en general emplean los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos personalizada si esta se suministra (véase el manual del usuario para más detalles). Para algunas aplicaciones, se prefieren utilizar los valores por defecto públicos para el paquete GCG o, en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

Como alternativa, el porcentaje de homología puede calcularse empleando la característica de alineamiento múltiple en DNASIS™ (Hitachi Software), basado en un algoritmo análogo a CLUSTAL (Higgins D.G. y Sharp P.M. (1988), *Gene*, 73(1), 237-244).

Cuando el software ya ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el porcentaje de homología, preferiblemente el porcentaje de identidad de secuencia. El software generalmente lo realiza como parte de la comparación de las secuencias y genera un resultado numérico.

Las secuencias también pueden tener deleciones, inserciones o sustituciones de restos aminoácidos que producen un cambio silencioso y dan como resultado una sustancia equivalente desde el punto de vista funcional. Pueden realizarse sustituciones de aminoácidos deliberadas basándose en la similitud de las propiedades de los aminoácidos (tales como la polaridad, la carga, la solubilidad, la hidrofobicidad, la hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los restos) y, por tanto, resulta útil agrupar a los aminoácidos en grupos funcionales. Los aminoácidos pueden agruparse basándose solo en las propiedades de su cadena lateral. Sin embargo, es útil incluir también los datos de mutación. Es probable que los conjuntos de aminoácidos que se obtienen de esta forma estén conservados por razones estructurales. Estos conjuntos pueden describirse en forma de un diagrama de Venn (Livingstone C.D. y Barton G.J. (1993), "Protein sequence alignments: a strategy for the hierarchical analysis of residue conservation", *Comput. Appl. Biosci.*, 9:745-756; Taylor W.R. (1986), "The classification of amino acid conservation", *J. Theor. Biol.*, 119, 205-218). Pueden realizarse sustituciones conservativas, por ejemplo, según la siguiente tabla que describe un agrupamiento de diagrama de Venn generalmente aceptado para aminoácidos.

Conjunto		Subconjunto	
Hidrófobos	FWYHKMILVAGC	Aromáticos	FWYH
		Alifáticos	ILV
Polares	WYHKREDCSTNQ	Cargados	HKRED
		Con carga positiva	HKR
		Con carga negativa	ED
Pequeños	VCAGSPTND	Minúsculos	AGS

También se describen secuencias que comprenden las sustituciones homólogas (sustitución y reemplazamiento son términos que se emplean en la presente para indicar el intercambio de un resto aminoácido existente por un resto alternativo) que puedan producirse, es decir, una sustitución por un aminoácido semejante, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. También pueden producirse sustituciones no homólogas, es decir, de un resto de una clase por otro de otra o, como alternativa, que implique la inclusión de aminoácidos no naturales, tales como ornitina (denominada en lo sucesivo Z), ácido diaminobutírico ornitina (denominada en lo sucesivo B), norleucina ornitina (denominada en lo sucesivo O), piridilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre dos restos aminoácidos cualesquiera de la secuencia, que incluyen grupos alquilo, tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos, tales como restos glicina o β-alanina. Otra forma de variación que implica la presencia de uno o más restos aminoácidos en forma peptoide, es muy conocida por los expertos en la técnica. Para evitar dudas, la "forma peptoide" significa restos aminoácidos variantes en los que el grupo sustituyente del α-carbono está en el átomo de nitrógeno del resto y no en el α-carbono. Los procesos para preparar péptidos en forma peptoide son conocidos en la técnica, por ejemplo, Simon R.J. *et al.*, *PNAS* (1992), 89(20), 9367-9371; y Horwell D.C., *Trends Biotechnol.* (1995), 13(4), 132-134.

Las secuencias de nucleótidos descritas en la presente y que son adecuadas para su uso en los métodos y la composiciones descritos en la presente (tales como los ácidos nucleicos variantes de PS4) pueden incluir nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen una serie de tipos diferentes de modificaciones en los oligonucleótidos. Estas incluyen esqueletos de metilfosfonato y fosforotioato y/o la adición de cadenas de polilisina o acridina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los objetivos de este documento, debe entenderse que las secuencias de nucleótidos descritas en la presente pueden modificarse mediante cualquier método disponible en la técnica. Estas modificaciones pueden realizarse para potenciar la actividad *in vivo* o la vida de las secuencias de nucleótidos.

También se describe el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias con las secuencias presentadas en la presente, o cualquiera de sus derivados o fragmentos. Si la secuencia es complementaria con uno de sus

fragmentos, entonces esa secuencia puede utilizarse como sonda para identificar secuencias codificadoras similares en otros organismos, etc.

5 Pueden obtenerse polinucleótidos que no son 100% homólogos con las secuencias variantes de PS4 mediante una serie de formas. Otros variantes de las secuencias descritas en la presente pueden obtenerse, por ejemplo, sondando bancos de ADN fabricados a partir de una gama de individuos, por ejemplo, individuos de diferentes poblaciones. Además, pueden obtenerse otros homólogos y estos y sus fragmentos serán capaces, en general, de hibridarse selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente. Estas secuencias pueden obtenerse sondando bancos de ADNc fabricados a partir de bancos de ADN genómico procedente de otras especies, y sondando dichos bancos con sondas que comprenden toda o parte de una
10 cualquiera de las secuencias en el listado de secuencias adjunto bajo condiciones de rigurosidad intermedia a alta. Se aplican consideraciones similares a la obtención de homólogos y variantes alélicas de especies de los variantes de las secuencias polipeptídicas o de nucleótidos descritas en la presente.

15 Los variantes y homólogos de raza/especie también pueden obtenerse empleando una PCR degenerada, que emplea cebadores diseñados para dirigirse a secuencias diana dentro de los variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos de varios variantes/homólogos. Los alineamientos de las secuencias pueden realizarse empleando un software informático conocido en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp se emplea mucho.

20 Los cebadores empleados en una PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se emplearán en condiciones de rigurosidad más bajas que las empleadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia individuales frente a secuencias conocidas.

25 Como alternativa, dichos polinucleótidos pueden obtenerse mediante mutagénesis específica dirigida a sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede resultar útil, por ejemplo, cuando sean necesarios cambios silenciosos en la secuencia de codones para optimizar las preferencias de codones de una célula hospedante concreta en la que se están expresando las secuencias polinucleotídicas. Pueden desearse otros cambios en la secuencia para introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción o para alterar la propiedad o la función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

30 Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos), tales como los ácidos nucleicos variantes de PS4 descritos en este documento, pueden emplearse para producir un cebador, por ejemplo, un cebador de PCR, un cebador para una reacción de amplificación alternativa, una sonda, por ejemplo, marcada con un marcador revelador por medios convencionales empleando marcadores radiactivos o no radiactivos, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Estos cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán una longitud de al menos 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 o 40 nucleótidos, y también se incluyen dentro del término polinucleótidos.

35 Los polinucleótidos, tales como sondas y polinucleótidos de ADN, pueden producirse de modo recombinante, sintético o mediante cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse mediante técnicas convencionales. En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, que implican una fabricación discontinua de la secuencia de ácido nucleico deseada resto a resto. Las técnicas para lograr esto empleando técnicas automáticas están fácilmente disponibles en la técnica.

40 Los polinucleótidos más largos se producirán, en general, empleando medios recombinantes, por ejemplo, empleando técnicas de clonación de PCR (reacción en cadena con polimerasa). Los cebadores pueden diseñarse para que contengan sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados, de modo que el ADN amplificado pueda clonarse en un vector de clonación adecuado. Preferiblemente, las secuencias variantes, etc., son al menos tan biológicamente activas como las secuencias presentadas en la presente.

45 Tal como se emplea en la presente, "biológicamente activo" se refiere a una secuencia que tiene una función estructural similar (pero no necesariamente en el mismo grado) y/o una función reguladora similar (pero no necesariamente en el mismo grado) y/o una función bioquímica similar (pero no necesariamente en el mismo grado) que la secuencia natural.

Hibridación

50 También se describen secuencias que son complementarias con las secuencias de ácidos nucleicos de los variantes de PS4 o secuencias que son capaces de hibridarse con las secuencias variantes de PS4 o con secuencias que son complementarias con estas.

55 El término "hibridación", tal como se emplea en la presente, incluye "el proceso mediante el cual una hebra de un ácido nucleico se une con una hebra complementaria a través del apareamiento de sus bases", así como al proceso de amplificación cuando se realiza con tecnologías de la reacción en cadena con polimerasa (PCR). Por tanto, se describe el uso de secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridarse con las secuencias que son complementarias con las secuencias presentadas en la presente, o cualquiera de sus derivados o fragmentos.

El término "variante" también incluye secuencias que son complementarias con secuencias que son capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente.

5 Preferiblemente, el término "variante" incluye secuencias que son complementarias con secuencias que son capaces de hibridarse bajo condiciones rigurosas (por ejemplo, 50°C y 0,2x SSC {1x SSC = NaCl 0,15 M, Na₃citrato 0,015 M, pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente. Más preferiblemente, el término "variante" incluye secuencias que son complementarias con secuencias que son capaces de hibridarse bajo condiciones muy rigurosas (por ejemplo, 65°C y 0,1x SSC {1x SSC = NaCl 0,15 M, Na₃citrato 0,015 M, pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente.

10 También se describen secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos de los variantes de PS4 (que incluyen secuencias complementarias con las presentadas en la presente), así como secuencias de nucleótidos que son complementarias con secuencias que pueden hibridarse con las secuencias de nucleótidos de los variantes de PS4 (que incluyen secuencias complementarias con las presentadas en la presente). También se describen secuencias polinucleotídicas que son capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente bajo condiciones de rigurosidad intermedia a máxima.

15 En un aspecto preferido, se describen secuencias de nucleótidos que pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico variante de PS4, o con su complemento, bajo condiciones rigurosas (por ejemplo, 50°C y 0,2x SSC). Más preferiblemente, las secuencias de nucleótidos pueden hibridarse con la secuencia de nucleótidos de un variante de PS4, o con su complemento, bajo condiciones muy rigurosas (por ejemplo, 65°C y 0,1x SSC).

20 Mutagénesis específica dirigida a sitio

Tras haber aislado una secuencia de nucleótidos que codifica una enzima, o tras haber identificado una secuencia de nucleótidos putativa que codifica una enzima, puede resultar deseable mutar la secuencia para preparar una enzima. Por consiguiente, una secuencia variante de PS4 puede prepararse a partir de una secuencia de origen. Las mutaciones pueden introducirse empleando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean a los sitios de mutación deseados.

25 Un método adecuado se describe en Morinaga *et al.* (Biotechnology (1984), 2, pp. 646-649). Otro método para introducir mutaciones en secuencias de nucleótidos que codifican enzimas se describe en Nelson y Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, pp. 147-151). Otro método se describe en Sarkar y Sommer (Biotechniques (1990), 8, pp. 404-407, "The megaprimer method of site directed mutagenesis").

30 En un aspecto, la secuencia para su uso en los métodos y las composiciones descritos en la presente es una secuencia recombinante, es decir, una secuencia que se ha preparado empleando técnicas de ADN recombinante. Estas técnicas de ADN recombinante están dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Estas técnicas se explican en la bibliografía, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, tomos 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

35 En un aspecto, la secuencia para su uso en los métodos y las composiciones descritos en la presente es una secuencia sintética, es decir, una secuencia que se ha preparado mediante síntesis química o enzimática *in vitro*. Estas incluyen, pero no se limitan a secuencias preparadas con la utilización de codones óptima para organismos hospedantes, tales como las levaduras metilotrópicas *Pichia* y *Hansenula*.

40 La secuencia de nucleótidos para su uso en los métodos y las composiciones descritos en la presente puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede emplearse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos, en forma de la enzima, dentro y/o desde una célula hospedante compatible. La expresión puede controlarse empleando secuencias de control, por ejemplo, secuencias reguladoras. La enzima producida por una célula hospedante recombinante mediante la expresión de la secuencia de nucleótidos puede segregarse o puede estar contenida dentro de la célula dependiendo de la secuencia y/o del vector empleado. Las secuencias codificadoras pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de la sustancia codificada por las secuencias a través de la membrana de una célula procarionota o eucariota concreta.

Expresión de polipéptidos y ácidos nucleicos de PS4

50 Los polinucleótidos y ácidos nucleicos de PS4 pueden incluir ADN y ARN de origen natural y sintético, y estos ADN o ARN pueden contener desoxi- o didesoxinucleótidos o ribonucleótidos modificados o no modificados, o sus análogos. El ácido nucleico de PS4 puede existir como ADN o ARN monocatenario o bicatenario, un heterodúplex de ARN/ADN o un copolímero de ARN/ADN, en el que el término "copolímero" se refiere a una única hebra de ácido nucleico que comprende ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. El ácido nucleico de PS4 también puede tener codones optimizados para aumentar aún más la expresión.

55 El término "sintético", tal como se emplea en la presente, define a lo producido mediante síntesis química o enzimática *in vitro*. Incluye, pero no se limita a ácidos nucleicos de PS4 preparados con la utilización de codones óptima para organismos hospedantes, tales como las levaduras metilotrópicas *Pichia* y *Hansenula*.

Los polinucleótidos, por ejemplo, los polinucleótidos variantes de PS4 descritos en la presente, pueden incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede emplearse para replicar el ácido nucleico en una célula hospedante compatible. El vector que comprende la secuencia polinucleotídica puede transformarse en una célula hospedante adecuada. Los hospedantes adecuados pueden incluir células bacterianas, de levadura, de insecto y fúngicas.

La expresión "célula transformada" incluye células que han sido transformadas mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. La transformación generalmente se produce mediante la inserción de una o más secuencias de nucleótidos en una célula que va a ser transformada. La secuencia de nucleótidos insertada puede ser una secuencia de nucleótidos heteróloga (es decir, una secuencia que no es natural en la célula que se va a transformar). Además, o como alternativa, la secuencia de nucleótidos insertada puede ser una secuencia de nucleótidos homóloga (es decir, una secuencia que es natural en la célula que se va a transformar), de modo que la célula recibe una o más copias extra de una secuencia de nucleótidos que ya está presente en su interior.

Así, en otra realización, se proporciona un método para fabricar polinucleótidos y polipéptidos variantes de PS4 mediante la introducción de un polinucleótido en un vector replicable, la introducción del vector en una célula hospedante compatible, y el cultivo de la célula hospedante en condiciones que provoquen la replicación del vector. El vector puede ser recuperado de la célula hospedante.

Construcciones de expresión

El ácido nucleico de PS4 puede unirse operativamente a elementos reguladores transcripcionales y traduccionales activos en una célula hospedante de interés. El ácido nucleico de PS4 también puede codificar una proteína de fusión que comprende secuencias señal tales como, por ejemplo, las derivadas del gen de glucoamilasa de *Schwanniomyces occidentalis*, el gen de tipo factor α de reproducción de *Saccharomyces cerevisiae* y la TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae*. Como alternativa, el ácido nucleico de PS4 puede codificar una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a membrana.

Vector de expresión

El ácido nucleico de PS4 puede expresarse en los niveles deseados en un organismo hospedante empleando un vector de expresión.

Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de PS4 puede ser cualquier vector que sea capaz de expresar el gen que codifica el ácido nucleico de PS4 en el organismo hospedante seleccionado, y la elección del vector dependerá de la célula hospedante en la que se va a introducir. Así, el vector puede ser un vector de replicación autónoma, es decir, un vector que existe como una entidad episómica, cuya replicación es independiente de la replicación cromosómica, tal como, por ejemplo, un plásmido, un bacteriófago o un elemento episómico, un minicromosoma o un cromosoma artificial. Como alternativa, el vector puede ser un vector que, cuando se introduce en una célula hospedante, se integre en el genoma de la célula hospedante y se replique junto con el cromosoma.

Componentes del vector de expresión

El vector de expresión generalmente incluye los componentes de un vector de clonación, tales como, por ejemplo, un elemento que permite la replicación autónoma del vector en el organismo hospedante seleccionado, y uno o más marcadores fenotípicamente detectables para la selección. El vector de expresión normalmente comprende secuencias de nucleótidos de control que codifican un promotor, un operador, un sitio de unión a ribosomas, una señal de inicio de la traducción y, opcionalmente, un gen represor o uno o más genes activadores. Además, el vector de expresión puede comprender una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos capaz de dirigir el polipéptido variante de PS4 hacia un orgánulo de la célula hospedante, tal como un peroxisoma o hacia un compartimento celular concreto del hospedante. Esta secuencia de transporte dirigido incluye, pero no se limita a la secuencia SKL. En el presente contexto, la expresión "señal de expresión" incluye cualquiera de las secuencias de control y secuencias represoras o activadoras anteriores. Para la expresión bajo la dirección de secuencias de control, la secuencia de ácido nucleico del polipéptido variante de PS4 se une operablemente a las secuencias de control de una manera apropiada con respecto a la expresión.

Preferiblemente, un polinucleótido en un vector está unido operablemente a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificadora por la célula hospedante, es decir, el vector es un vector de expresión. La expresión "unido operablemente" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite actuar de su manera prevista. Una secuencia reguladora "unida operablemente" a una secuencia codificadora está unida de tal forma que se logra la expresión de la secuencia codificadora bajo una condición compatible con las secuencias de control.

Las secuencias de control pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de otros elementos reguladores transcripcionales para que el nivel de transcripción dirigido por las secuencias de control responda mejor a los moduladores transcripcionales. Las secuencias de control pueden comprender, en concreto, promotores.

Promotor

En el vector, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido variante de PS4 está operablemente combinada con una secuencia de promotor adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que tenga actividad de transcripción en el organismo hospedante elegido y puede proceder de genes que son homólogos o heterólogos para el organismo hospedante.

Promotores bacterianos

Los ejemplos de promotores adecuados para dirigir la transcripción de la secuencia de nucleótidos modificada, tal como ácidos nucleicos de PS4, en un hospedante bacteriano incluyen el promotor del operón *lac* de *E. coli*, promotores *dagA* del gen de agarasa de *Streptomyces coelicolor*, los promotores del gen de α -amilasa (*amyL*) de *Bacillus licheniformis*, los promotores del gen de amilasa maltogénica (*amyM*) de *Bacillus stearothermophilus*, los promotores del gen de α -amilasa (*amyQ*) de *Bacillus amyloliquefaciens*, los promotores de los genes *xylA* y *xylB* de *Bacillus subtilis*, el promotor del gen *aprE* de *Bacillus subtilis* y un promotor derivado de un promotor derivado de *Lactococcus* sp. que incluye el promotor P170. Cuando el gen que codifica el polipéptido variante de PS4 se expresa en una especie bacteriana, tal como *E. coli*, puede seleccionarse un promotor adecuado, por ejemplo, un promotor de bacteriófago que incluye un promotor de T7 y un promotor del fago lambda.

Promotores fúngicos

Para la transcripción en especies fúngicas, los ejemplos de promotores útiles son los derivados de genes que codifican la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, la ácido aspártico proteinasa de *Rhizomucor miehei*, la α -amilasa neutra de *Aspergillus niger*, la α -amilasa estable frente a ácidos de *A. niger*, la glucoamilasa de *A. niger*, la lipasa de *Rhizomucor miehei*, la proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, la triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae* o la acetamidasa de *Aspergillus nidulans*.

Promotores de levaduras

Los ejemplos de promotores adecuados para la expresión en una especie de levadura incluyen, pero no se limitan a los promotores Gal 1 y Gal 10 de *Saccharomyces cerevisiae* y los promotores AOX1 o AOX2 de *Pichia pastoris*.

25 Organismos hospedantes

(I) Organismos hospedantes bacterianos

Los ejemplos de organismos hospedantes bacterianos adecuados son especies de bacterias Gram-positivas, tales como *Bacillaceae* que incluye *Bacillus clausii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus thuringiensis*, especies de *Streptomyces*, tales como *Streptomyces murinus*, especies bacterianas de ácido láctico, que incluyen *Lactococcus* spp., tales como *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* spp., que incluyen *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. y *Streptococcus* spp. Como alternativa, pueden seleccionarse cepas de especies bacterianas Gram-negativas que pertenecen a *Enterobacteriaceae* que incluyen *E. coli*, o a *Pseudomonadaceae*, como organismo hospedante.

35 *(II) Organismos hospedantes de levaduras*

Un organismo hospedante de levaduras adecuado puede seleccionarse a partir de las especies de levadura biotecnológicamente pertinente, tales como, pero sin limitarse a especies de levaduras tales como *Pichia* sp., *Hansenula* sp. o *Kluyveromyces*, especies de *Yarrowinia* o una especie de *Saccharomyces*, que incluye *Saccharomyces cerevisiae* o una especie que pertenece a *Schizosaccharomyces*, tal como, por ejemplo, la especie *S. pombe*.

Preferiblemente, se emplea una cepa de la especie de levadura metilotrópica *Pichia pastoris* como organismo hospedante. Preferiblemente, el organismo hospedante es una especie de *Hansenula*.

(III) Organismos hospedantes fúngicos

Los organismos hospedantes adecuados entre los hongos filamentosos incluyen especies de *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tubigenensis*, *Aspergillus awamori* o *Aspergillus nidulans*. Como alternativa, puede emplearse una especie de *Fusarium*, por ejemplo, *Fusarium oxysporum* o una especie de *Rhizomucor*, tal como *Rhizomucor miehei*, como organismo hospedante. Otras cepas adecuadas incluyen especies de *Thermomyces* y *Mucor*.

Los organismos hospedantes fúngicos adecuados también pueden incluir *Trichoderma* spp. (en especial, *Trichoderma reesei*, anteriormente *Trichoderma longibrachiatum*; también conocida como *Hypocrea jecorina*).

Expresión y purificación de proteínas

Las células hospedantes que comprenden polinucleótidos pueden emplearse para expresar polipéptidos, tales como polipéptidos variantes de PS4, y sus fragmentos, homólogos, variantes o derivados. Las células hospedantes pueden cultivarse bajo condiciones adecuadas para permitir la expresión de las proteínas. La expresión de los polipéptidos puede ser constitutiva, de modo que se producen de modo continuo, o inducible, que requiere un estímulo para iniciar la expresión. En el caso de la expresión inducible, la producción de proteínas puede iniciarse cuando se quiera, por ejemplo, mediante la adición de una sustancia inductora al medio de cultivo, por ejemplo, dexametasona o IPTG.

Los polipéptidos pueden extraerse de las células hospedantes mediante una diversidad de técnicas conocidas en la técnica, que incluye la lisis enzimática, química y/u osmótica y la ruptura física. Los polipéptidos también pueden ser producidos de modo recombinante en un sistema sin células *in vitro*, tal como el sistema de reticulocitos de conejo TnT™ (Promega).

Ejemplos

Ejemplo 1: Clonación de PS4

Se cultiva durante la noche *Pseudomonas sacharophila* en medio LB y se aísla el ADN cromosómico mediante métodos convencionales (Sambrook J., 1989). Un fragmento de 2190 pb que contiene el marco de lectura abierto de PS4 (Zhou *et al.*, 1989) se amplifica a partir del ADN cromosómico de *P. sacharophila* mediante PCR empleando los cebadores P1 y P2 (véase la tabla 3). El fragmento resultante se emplea como molde en una PCR anidada con los cebadores P3 y P4, amplificando el marco de lectura abierto de PS4 sin su secuencia señal e introduciendo un sitio NcoI en el extremo 5' del gen y un sitio BamHI en el extremo 3'. Junto con el sitio NcoI se introduce un codón para una metionina N-terminal, lo cual permite la expresión intracelular de PS4. El fragmento de 1605 pb se clona en pCRBLUNT TOPO (Invitrogen) y se analiza la integridad de la construcción mediante secuenciación. El vector lanzadera de *E. coli* *Bacillus* pDP66K (Penninga *et al.*, 1996) se modifica para permitir la expresión de PS4 bajo el control del promotor P32 y la secuencia señal *ctgase*. El plásmido resultante, pCSmta, se transforma en *B. subtilis*.

Se fabrica una segunda construcción de expresión en la que se retira el dominio de unión a almidón de PS4. En una PCR con los cebadores P3 y P6 (tabla 3) en pCSmta, se genera una versión truncada del gen mta. El gen mta de longitud completa en pCSmta se intercambia con la versión truncada, lo cual produce el plásmido pCSmta-SBD.

Ejemplo 2: Mutagénesis específica dirigida a sitio de PS4

Se introducen mutaciones en el gen mta mediante dos métodos: un método basado en una PCR en dos etapas, o un método de Quick Exchange (QE). Por conveniencia, el gen mta se divide en tres partes: un fragmento PvuI-FspI, un fragmento FspI-PstI y un fragmento PstI-AspI, denominados en lo sucesivo fragmento 1, 2 y 3, respectivamente.

En el método basado en una PCR en dos etapas se introducen mutaciones empleando la ADN polimerasa Pfu (Stratagene). Se realiza una primera PCR con un cebador de la mutagénesis (tabla 4) para la hebra codificadora más un cebador cadena abajo en la hebra inferior (2R o 3R en la tabla 3). El producto de la reacción se emplea como cebador en una segunda PCR, junto con un cebador cadena arriba sobre la hebra codificadora. El producto de la última reacción se clona en pCRBLUNT TOPO (Invitrogen) y, después de una secuenciación, el fragmento se intercambia con el correspondiente fragmento en pCSmta.

Empleando el método de Quick Exchange (Stratagene) se introducen mutaciones empleando dos cebadores complementarios en una PCR sobre un plásmido que contiene el gen mta, o parte del gen mta.

Para este fin, se construye un conjunto conveniente de plásmidos que comprende tres plásmidos SDM y tres plásmidos pCSΔ. Cada uno de los plásmidos SDM porta uno de los fragmentos del gen mta según se mencionó anteriormente, en el que la mutación deseada es introducida por QE. Después de una verificación mediante secuenciación, los fragmentos se clonan en el correspondiente plásmido receptor pCSΔ. Los plásmidos pCSΔ son derivados inactivos de pCSmta. La actividad se restablece clonando el correspondiente fragmento del plásmido SDM, lo cual permite una selección fácil.

Tabla 3. Cebadores utilizados en la clonación del gen mta, y cebadores patrón empleados en la construcción de mutantes dirigidos a sitio con el método de PCR de dos etapas.

Cebador	Secuencia de cebador	Sitio introducido
P1	5'- ATG ACG AGG TCC TTG TTT TTC	
P2	5'- CGC TAG TCG TCC ATG TCG	
P3	5'- <u>GCC</u> ATG GAT CAG GCC GGC AAG AGC CCG	NcoI
P4	5'- <u>TGG</u> ATC <u>CTC</u> AGA ACG AGC CGC TGG T	BamHI

Cebador	Secuencia de cebador	Sitio introducido
P6	5'- <u>GAA TTC</u> AGC CGC CGT CAT TCC CGC C	EcoRI
2L	5'-AGA TTT ACG GCA TGT TTC GC	
2R	5'-TAG CCG CTA TGG AAG CTG AT	
3L	5'-TGA CCT TCG TCG ACA ACC AC	
3R	5'-GAT AGC TGC TGG TGA CGG TC	

Tabla 4. Cebadores utilizados para introducir mutaciones específicas dirigidas a sitio en *mta*

Mutación	Secuencia oligonucleotídica	Modificación	Hebra	Objetivo
G134R	CTGCCGGCCGGCCAGcGCTTCTGGCG		+	SDM
G134R -	cgccagaagcgctggccggccggcag		-	SDM
I157L	GACGGTGACCGCTTCcTgGGCGGCGAGTCG		+	SDM
I151L -	cgactcgccgcccaggaagcggtcaccgctc		-	SDM
G223A	GGCGAGCTGTGGAAAgccCCTTCTGAATATCCG		+	SDM
G223A -	cggatattcagaaggggcttccacagctcgcc		-	SDM
H307L	gaacGGCGGCCAGCACctgTGGGCGCTGCAG		+	SDM
H307L -	ctgcagcggccacaggtgctggccgcttc		-	SDM
S334P, D343E	GTACTGGccgCACATGTACGACTGGGGCTACGGC gaaTTCATC		+	SDM
S334P, D343E -	gatgaattcgccgtagccccagtcgtacatgtgcccagctac		-	SDM

Tabla 5. Características de los plásmidos SDM y pCSA

SDM1	pBlueSK+ 480 pb fragmento Sall-StuI de <i>mta</i>
SDM2	pBlueSK+ 572 pb fragmento SacII-PstI de <i>mta</i>
SDM3	pBlueSK+ 471 pb fragmento Sall-StuI de <i>mta</i>
pCSA1	Sitio FseI relleno con Klenow ----> desplazamiento de marco en <i>mta</i>
pCSA2	Fragmento FspI-PstI de <i>mta</i> reemplazado por "ADN basura"
pCSA3	Fragmento PstI-AspI de <i>mta</i> reemplazado por "ADN basura"

Ejemplo 3: Multi-SDM

- 5 Los variantes de PS4 se generaron empleando un kit de mutagénesis específica dirigida a múltiples sitios QuikChange® (Stratagene) según el protocolo del fabricante con algunas modificaciones descritas.

Etapa 1: Reacción de síntesis de la hebra mutante (PCR)

Inocular 3 ml de LB (base de caldo de cultivo Lennox L 22 g/l, Sigma) + antibióticos (kanamicina 0,05 µg/ml, Sigma) en un tubo Falcon de 10 ml.

- Incubar durante la noche a 37°C, aproximadamente 200 rpm.
 - 10 - Sedimentar las células por centrifugación (5000 rpm/5 min).
 - Verter y retirar el medio.
 - Preparar un molde de ADNbc empleando el protocolo de minipurificación de plásmidos de QIAGEN.
1. La reacción de síntesis de la hebra mutante para el ciclado térmico se preparó como sigue:

Mezcla de PCR:

- 15 2,5 µl de tampón de reacción 10X QuickChange® Multi

ES 2 644 745 T3

0,75 µl de disolución QuickSolution

X µl de cebadores: cebador de longitud 28-35 pb → 10 pmol;
 cebador de longitud 24-27 pb → 7 pmol;
 cebador de longitud 20-23 pb → 5 pmol

5 1 µl de mezcla de dNTP

X µl de molde de ADNbc (200 ng)

1 µl de mezcla de enzimas QuickChange® Multi (2,5 U/ml) (ADN polimerasa *PfuTurbo*®)

X µl de dH₂O (hasta un volumen final de 25 ml)

Mezclar todos los componentes mediante una pipeta y centrifugar brevemente las mezclas de reacción.

10 2. Ciclar las reacciones empleando los siguientes parámetros:

35 ciclos de desnaturalización (96°C/1 min)

asociado de los cebadores (62,8°C/1 min)

alargamiento (65°C/15 min)

después mantenimiento a 4°C

15 Precalentar la tapa de la máquina de PCR hasta 105°C y la placa hasta 95°C antes de colocar los tubos de PCR en la máquina (termociclador Eppendorf).

Etapa 2: Digestión con *Dpn I*

1. Añadir 2 µl de enzima de restricción *Dpn I* (10 U/µl) a cada reacción de amplificación, mezclar mediante pipeteado y sedimentar la mezcla mediante centrifugación.

20 2. Incubar a 37°C durante aproximadamente 3 hr.

Etapa 3: Transformación de células ultracompetentes XL10-Gold®

1. Descongelar las células XL10-Gold en hielo. Preparar partes alícuotas de 45 µl de células por reacción de mutagénesis en tubos Falcon preenfriados.

25 2. Poner en marcha el baño de agua (42°C) y colocar un tubo con caldo de cultivo NZY+ en el baño para que se precaliente.

3. Añadir 2 µl de mezcla de β-mercaptoetanol a cada tubo. Remover y golpear suavemente e incubar durante 10 min en hielo, removiendo cada 2 min.

4. Añadir 1,5 µl de ADN tratado con *Dpn I* a cada parte alícuota de células, remover para mezclar e incubar en hielo durante 30 min.

30 5. Pulsar con calor los tubos en un baño de agua a 42°C durante 30 s y colocar en hielo durante 2 min.

6. Añadir 0,5 ml de caldo de cultivo NZY+ precalentado a cada tubo e incubar a 37°C durante 1 hr con agitación a 225-250 rpm.

7. Cultivar 200 µl de cada reacción de transformación en placas LB (agar Lennox L 33,6 g/l, Sigma) que contienen almidón al 1% y kanamicina 0,05 µg/ml.

35 8. Incubar las placas de transformación a 37°C durante la noche.

Tabla 6. Tabla de cebadores para pPD77d14

Mutación	Secuencia oligonucleotídica	Modificación	Hebra	Objetivo
N33Y, D34N	GCGAAGCGCCCTACAACACTGGTACAAC	5' fosfato	+	MSDM
K71R	CCGACGGCGGCAGGTCCGGCG	5' fosfato	+	MSDM
G87S	CAAGAACAGCCGCTACGGCAGCGAC	5' fosfato	+	MSDM

ES 2 644 745 T3

Mutación	Secuencia oligonucleotídica	Modificación	Hebra	Objetivo
G121D	CACATGAACCGCGACTACCCGGACAAG	5' fosfato	+	MSDM
G134R	CTGCCGGCCGGCCAGcGCTTCTGGCG	5' fosfato	+	MSDM
A141P	CGCAACGACTGCGCCGACCCGGG	5' fosfato	+	MSDM
I157L	GACGGTGACCGCTTCcTgGGCGGCGAGTCG	5' fosfato	+	MSDM
L178F, A179T	CGCGACGAGTTTACCAACCTGCG	5' fosfato	+	MSDM
G223A	GGCGAGCTGTGGAAAgccCCTTCTGAATATCCG	5' fosfato	+	MSDM
H307L	gaacGGCGGCCAGCACctgTGGGCGCTGCAG	5' fosfato	+	MSDM
S334P, D343E	GTACTGGccgCACATGTACGACTGGGGCTACGGC gaaTTCATC	5' fosfato	+	MSDM

Tabla 7 Tabla de cebadores para pPD77d20

Mutación	Secuencia oligonucleotídica	Modificación	Hebra	Objetivo
N33Y, D34N	GCGAAGCGCCCTACAACCTGGTACAAC	5' fosfato	+	MSDM
K71R	CCGACGGCGGCAGGTCCGGCG	5' fosfato	+	MSDM
G121D	CACATGAACCGCGACTACCCGGACAAG	5' fosfato	+	MSDM
G134R	CTGCCGGCCGGCCAGcGCTTCTGGCG	5' fosfato	+	MSDM
A141P	CGCAACGACTGCGCCGACCCGGG	5' fosfato	+	MSDM
I157L	GACGGTGACCGCTTCcTgGGCGGCGAGTCG	5' fosfato	+	MSDM
L178F, A179T	CGCGACGAGTTTACCAACCTGCG	5' fosfato	+	MSDM
G223A	GGCGAGCTGTGGAAAgccCCTTCTGAATATCCG	5' fosfato	+	MSDM
H307L	gaacGGCGGCCAGCACctgTGGGCGCTGCAG	5' fosfato	+	MSDM
S334P, D343E	GTACTGGccgCACATGTACGACTGGGGCTACGGC gaaTTCATC	5' fosfato	+	MSDM

Tabla 8. Tabla de cebadores para pPD77d34

Mutación	Secuencia oligonucleotídica	Modificación	Hebra	Objetivo
N33Y, D34N	GCGAAGCGCCCTACAACCTGGTACAAC	5' fosfato	+	MSDM
G121D	CACATGAACCGCGACTACCCGGACAAG	5' fosfato	+	MSDM
G134R	CTGCCGGCCGGCCAGcGCTTCTGGCG	5' fosfato	+	MSDM
A141P	CGCAACGACTGCGCCGACCCGGG	5' fosfato	+	MSDM
I157L	GACGGTGACCGCTTCcTgGGCGGCGAGTCG	5' fosfato	+	MSDM
L178F, A179T	CGCGACGAGTTTACCAACCTGCG	5' fosfato	+	MSDM
G223A	GGCGAGCTGTGGAAAgccCCTTCTGAATATCCG	5' fosfato	+	MSDM
H307L	gaacGGCGGCCAGCACctgTGGGCGCTGCAG	5' fosfato	+	MSDM
S334P	GTACTGGccgCACATGTACGACTGGGGCTACGGC	5' fosfato	+	MSDM

Sistema de vector basado en pPD77

5 El sistema de vector empleado para pPD77 se basa en pCRbluntTOPOII (Invitrogen). El módulo de resistencia a la zeocina se ha eliminado mediante pmII, eliminándose un fragmento de 393 pb. El módulo de expresión del vector pCC (P32-ssCGTase-PS4-tt) ha sido insertado en el vector.

Acoplamiento del variante de PS4 en pCCMini

El plásmido que contiene las mutaciones pertinentes (creado por MSDM) se corta con las enzimas de restricción

ES 2 644 745 T3

Nco I y Hind III (Biolabs):

3 µg de ADN plasmídico, X µl de 10x tampón 2, 10 unidades de NcoI, 20 unidades de HindIII,

Se incuba durante 2 h a 37°C

5 La digestión se realiza en gel de agarosa al 1%. Se cortan los fragmentos con un tamaño de 1293 pb (gen PS4) del gel y se purifican empleando un kit de purificación de gel de Qiagen.

Después, el vector pCCMini se corta con las enzimas de restricción Nco I y Hind III, y la digestión se realiza en un gel de agarosa al 1%. Se corta el fragmento con un tamaño de 3569 pb del gel y se purifica empleando un kit de purificación de gel de Qiagen.

Acoplamiento: se emplea el kit de acoplamiento de ADN Rapid DNA (Roche).

10 Se usa el doble de cantidad del inserto comparado con el vector, por ejemplo:

2 µl de inserto (gen PS4)

1 µl de vector

5 µl de tampón de acoplamiento de ADN de T4, 2x conc.

1 µl de dH₂O

15 1 µl de ADN ligasa de T4

Acoplar durante 5 min/TA

Se transforma el acoplamiento en células competentes One Shot TOPO según el protocolo del fabricante (Invitrogen). Se emplean 5 µl de acoplamiento por transformación.

20 Se cultivan 50 µl de mezclas de transformación en placas LB (agar Lennox L 33,6 g/l, Sigma) que contienen almidón al 1% y kanamicina 0,05 µg/ml. Los vectores que contienen el inserto (variantes de PS4) pueden ser reconocidos por la formación de un halo en las placas de almidón.

Ejemplo 3A: Producción del polipéptido variante de PS4 con una sustitución en la posición 307

pSac-pMD229

25 La secuencia de pSac-pMD229 (SEQ ID NO:14) que comprende mutaciones en N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, G303E, H307L, A309P, S334P con relación a la exoamilasa no maltogénica de tipo salvaje se prepara a partir de una secuencia de tipo salvaje empleando la mutagénesis específica dirigida a sitio (según se describió anteriormente en el ejemplo 2) o la mutagénesis específica dirigida a múltiples sitios (según se describió anteriormente en el ejemplo 3), con los cebadores de la siguiente tabla:

30 Cebadores para pMD229

Objetivo	Descripción	Modificación	Hebra	Secuencia oligonucleotídica 5' a 3'
MSDM	N33Y, D34N	5' fosfato	+	GCGAAGCGCCCTACA ACTGGTAC AAC
MSDM	G121F	5' fosfato	+	CCAATCACATGAACCGC ttcTACC CGGACAAGGAG
SDM	G134R		+	CTGCCGGCCGGCCAG cGCTTCTG GCG
SDM	G134R-		-	cgccagaagcgctggccggccggcag
MSDM	A141P	5' fosfato	+	CGCAACGACTGCGCCGACCCGGG
MSDM	Y146G	5' fosfato	+	GATCCGGGCAAC ggc CCCAACGA CTGCG

Objetivo	Descripción	Modificación	Hebra	Secuencia oligonucleotídica 5' a 3'
SDM	I157L		+	GACGGTGACCGCTTCcTgGGCGGC GAGTCG
SDM	I157L-		-	cgactcgccgcccaggaagcggtcaccgctc
MSDM	S161A	5' fosfato	+	GGGCGGCGAGgcgGACCTGAACA
MSDM	L178F, A179T	5' fosfato	+	CGCGACGAGTTTACCAACCTGCG
MSDM	G223E(gag)	5' fosfato	+	GGCGAGCTGTGGAAAGDNCCTTC TGAATATCCGAG
MSDM	S229P	5' fosfato	+	GCCTTCTGAATATCCGccgTGGGA CTGGCGCAAC
MSDM	H272Q	5' fosfato	+	CCGACTGGAAGcagGGCCTCAATG GC
MSDM	G303E	5' fosfato		CCGGGCAGAACgaaGGCCAGCAC CTGTG
SDM	H307L		+	gaacGGCGGCCAGCACctgTGGGCG CTGCAG
SDM	H307L-		-	ctgcagcgcccacaggtgctggccgccgctc
MSDM	A309P	5' fosfato	+	GCACCTGTGGccgCTGCAGGACG
SDM	S334P, D343E		+	GTACTGGccgCACATGTACGACTG GGGCTACGGCgaaTTCATC
SDM	S334P, D343E-		-	gatgaattcgccgtagccccagtcgtacatgtgcggc cagtac

pSac-pMS382

La secuencia de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:22) que comprende 307K se prepara a partir de pSac-pSac-pMD229 empleando la mutagénesis específica dirigida a múltiples sitios (según se describió anteriormente en el ejemplo 3), con los cebadores de la siguiente tabla:

5

Cebadores para Pmd229 → pMS382

Objetivo	Descripción	Modificación	Hebra	Secuencia oligonucleotídica 5' a 3'
MSDM	G70K (sint)	5' fosfato	+	CTGGACGGATGGAgatAAAAGCGG AGGCGGC
MSDM	Q272H (sint)	5' fosfato	+	CGTCGCCGATTGGAAAcatGGCCT GAACGGAATC
MSDM	E303G (sint)	5' fosfato	+	CCGGGACAAAATggaGGACAACA TCTTTGGC
MSDM	L307K (sint)	5' fosfato	+	CAAAATGAAGGACAACATaaaTGG CCGCTTCAAGATGGCC
MSDM	D145N (sint)	5' fosfato	+	GGACCCGGGAaatGGACCGAATGA TTGCG

* pMS382 se generó a partir del gen sintético pMS230, por lo cual también fue necesaria una inversión en la posición 145 de D a N.

ES 2 644 745 T3

Los polipéptidos variantes de PS4 con otros restos en la posición 307 se generan empleando la mutagénesis específica dirigida a múltiples sitios (según se describió anteriormente en el ejemplo 3), con los cebadores de la siguiente tabla:

Objetivo	Descripción	Codón	Nombre	Secuencia oligonucleotídica	Modificación	Hebra
MSDM	L307K (sint)	aaa	pMS343	CAAAATGAAGGACAACATaaa TGGCCGCTTCAAGATGGCC	5' fosfato	+
MSDM	L307Q (sint)	cag	pMS344	GAAGGACAACATcagTGGCCG CTTCAAGATGGCC	5' fosfato	+
MSDM	L307V (sint)	gtc	pMS345	GAAGGACAACATGTCTGGCC GCTTCAAGATGGCC	5' fosfato	+
MSDM	L307W (sint)	tgg	pMS346	CAAAATGAAGGACAACATtgg TGGCCGCTTCAAGATGGCC	5' fosfato	+
MSDM	L307Y (sint)	tat	pMS347	CAAAATGAAGGACAACATtatI GGCCGCTTCAAGATGGCC	5' fosfato	+
MSDM	L307C (sint)	tgc	pMS348	CAAAATGAAGGACAACATtgc TGGCCGCTTCAAGATGGCC	5' fosfato	+
MSDM	L307E (sint)	gaa	pMS371	CAAAATGAAGGACAACATgaa TGGCCGCTTCAAGATGGCC	5' fosfato	+
MSDM	L307F (sint)	ttt	pMS349	GAAGGACAACATtttTGGCCCG TTCAAGATGG	5' fosfato	+
MSDM	L307H (sint)	cat	pMS370	GAAGGACAACATcatTGGCCCG CTTCAAGATGG	5' fosfato	+

ES 2 644 745 T3

Cebador empleado para el banco Site Scan en la posición 307

Objetivo	Descripción	Codón	Secuencia oligonucleotídica	Modificación	Hebra
MSDM	L307NNS (sint)	NNS	CAAAATGAAGGACAACATNN STGGCCGCTTCAAGATGGCC	5' fosfato	+

Ejemplo 4: Transformación en *Bacillus subtilis* (transformación de protoplastos)

Se transforma *Bacillus subtilis* (cepa DB104A; Smith *et al.*, 1988, Gene, 70, 351-361) con los plásmidos mutados según el siguiente protocolo.

5 A. Medio para formar los protoplastos y transformación

2 x SMM - por litro: 342 g de sacarosa (1 M); 4,72 g de maleato de sodio (0,04 M); 8:12 g de MgCl₂·6H₂O (0,04 M); pH 6,5 con NaOH concentrado. Se distribuye en porciones de 50 ml y se somete a un autoclave durante 10 min.

10 4 x YT (1/2 NaCl) SMMP PEG - 2 g de extracto de levadura + 3,2 g de triptona + 0,5 g de NaCl por 100 ml. Se mezclan volúmenes iguales de 2 x SMM y 4 x YT. 10 g de polietilenglicol 6000 (BDH) o 8000 (Sigma) en 25 ml de 1x SMM (autoclave durante 10 min).

B. Medio para el cultivo en placa/regeneración

Agar mínimo de Difco al 4%. Autoclave durante 15 min.

Succinato de sodio 270 g/l (1 M), pH 7,3 con HCl. Autoclave durante 15 min.

Tampón fosfato, 3,5 g de K₂HPO₄ + 1,5 g de KH₂PO₄ por 100 ml. Autoclave durante 15 min.

15 MgCl₂, 20,3 g de MgCl₂·6H₂O por 100 ml (1 M).

Disolución de casaminoácidos al 5% (en p/v). Autoclave durante 15 min.

Extracto de levadura, 10 g por 100 ml, autoclave durante 15 min.

Disolución de glucosa al 20% (en p/v). Autoclave durante 10 min.

Medio de regeneración de DM3: Mezclar a 60 °C (baño de agua, botella de 500 ml):

20 250 ml de succinato de sodio

50 ml de casaminoácidos

25 ml de extracto de levadura

50 ml de tampón fosfato

15 ml de glucosa

25 10 ml de MgCl₂

100 ml de agar fundido

Añadir los antibióticos apropiados: cloranfenicol y tetraciclina, 5 ug/ml; eritromicina, 1 ug/ml. La selección sobre kanamicina resulta problemática en medio DM3: pueden ser necesarias unas concentraciones de 250 ug/ml.

C. Preparación de protoplastos

30 1. Emplear siempre un equipo de vidrio o plástico sin detergente.

2. Inocular 10 ml de medio 2x YT en un matraz de 100 ml procedentes de una única colonia. Cultivar durante la noche a 25-30 °C en un agitador (200 rev/min).

3. Diluir el cultivo realizado durante la noche en 20 veces en 100 ml de medio 2x YT fresco (matraz de 250 ml) y cultivar hasta alcanzar una DO₆₀₀ = 0,4-0,5 (aproximadamente 2 h) a 37 °C en un agitador (200-250 rev/min).

35 4. Recolectar las células mediante centrifugación (9000 g, 20 min, 4 °C).

5. Retirar el sobrenadante con una pipeta y resuspender las células en 5 ml de SMMP + 5 mg de lisozima, esterilizados mediante filtración.

6. Incubar a 37 °C en un agitador con baño de agua (100 rev/min).

Después de 30 min y después en intervalos de 15 min, estudiar muestras de 25 ul al microscopio. Continuar la incubación hasta que 99% de las células se hayan convertido en protoplastos (aspecto globular). Recolectar los protoplastos mediante centrifugación (4000 g, 20 min, TA) y retirar el sobrenadante con pipeta. Resuspender con cuidado el sedimento en 1-2 ml de SMMP.

5

Los protoplastos ahora están listos para usar. Pueden congelarse porciones (por ejemplo, 0,15 ml) a -80 °C para el uso futuro (no se requiere adición de glicerol). Aunque esto puede provocar algo de reducción en la transformabilidad, pueden obtenerse 106 transformantes por ug de ADN con los protoplastos congelados.

D. Transformación

- 10 1. Trasladar 450 ul de PEG a un microtubo.
- 2. Mezclar 1-10 ul de ADN (0,2 ug) con 150 ul de protoplastos y añadir la mezcla al microtubo con PEG. Mezclar inmediatamente pero con cuidado.
- 3. Dejar en reposo durante 2 min a TA, y después añadir 1,5 ml de SMMP y mezclar.
- 15 4. Recolectar los protoplastos mediante microcentrifugación (10 min, 13.000 rev/min (10-12.000 g)) y verter y descartar el sobrenadante. Eliminar las gotas remanentes con un pañuelo de papel.

Añadir 300 ul de SMMP (no agitar en vórtice) e incubar durante 60-90 min a 37 °C en un agitador con baño de agua (100 rev/min) para permitir la expresión de los marcadores de resistencia a antibióticos (los protoplastos ya están suficientemente resuspendidos por la acción agitadora del baño de agua). Realizar diluciones apropiadas en 1x SSM y cultivar 0,1 ml en placas DM3.

20 Ejemplo 5: Fermentación de los variantes de PS4 en matraces de agitación

El sustrato del matraz de agitación se prepara como sigue:

Ingrediente	% (en p/v)
Agua	-
Extracto de levadura	2
Harina de soja	2
NaCl	0,5
Fosfato de dipotasi	0,5
Agente antiespumante	0,05

25 El sustrato se ajusta a pH 6,8 con ácido sulfúrico 4 N o hidróxido de sodio antes de someter a autoclave. Se colocan 100 ml del sustrato en un matraz de 500 ml con una hendidura y se somete a autoclave durante 30 minutos. Después se añaden 6 ml de jarabe de dextrosa estéril. El jarabe de dextrosa se prepara mezclando un volumen de dextrosa al 50% en p/v con un volumen de agua, seguido de autoclave durante 20 minutos.

Los matraces de agitación se inoculan con los variantes y se incuban durante 24 horas a 35°C/180 rpm en un incubador. Después de la incubación, las células se separan del caldo mediante centrifugación (10.000 x g en 10 minutos) y, por último, se retiran las células del sobrenadante mediante microfiltración a 0,2 µm. El sobrenadante sin células se emplea para los ensayos y las pruebas de aplicación.

30 Ejemplo 6: Ensayos de amilasa

Ensayo de betamilo

35 Una unidad de betamilo se define como la actividad que degrada 0,0351 mmol por 1 min de maltopentaosa acoplada con PNP de modo que pueden liberarse 0,0351 mmol de PNP por 1 min por un exceso de a-glucosidasa en la mezcla de ensayo. La mezcla de ensayo contiene 50 ul de Na-citrato 50 mM, CaCl2 5 mM, pH 6,5, con 25 ul de muestra de enzima y 25 ul de sustrato de betamilo (Glc5-PNP y a-glucosidasa) de Megazyme, Irlanda (1 vial disuelto en 10 ml de agua). La mezcla de ensayo se incuba durante 30 min a 40 °C y después se detiene añadiendo 150 ul de Tris al 4%. Se mide la absorbancia a 420 nm empleando un lector de ELISA y se calcula la actividad del betamilo basándose en la actividad = A420 * d en unidades de betamilo/ml de muestra de enzima ensayada.

Ensayo de endoamilasa

40 El ensayo de endoamilasa es idéntico al ensayo Phadebas según el fabricante (Pharmacia & Upjohn Diagnostics

AB).

Exoespecificidad

Se empleó la proporción de actividad exoamilasa a actividad Phadebas para evaluar la exoespecificidad.

Ejemplo 7: Determinación de la semivida

- 5 La semivida, $t_{1/2}$, se define con el tiempo (en minutos) durante el cual se inactiva la mitad de la actividad de la enzima bajo condiciones de calor definidas. Para determinar la semivida de la enzima, la muestra se calienta durante 1-40 minutos a unas temperaturas constantes de 60°C a 90°C. La semivida se calcula basándose en el ensayo de betamilo residual.

10 Procedimiento: en un vial Eppendorf se precalientan 1000 μ l de tampón durante al menos 10 minutos a 60°C o mayor. El tratamiento con calor de la muestra comienza con la adición de 100 μ l de la muestra al tampón precalentado con mezclado continuo (800 rpm) del vial Eppendorf en un incubador de calor (Termomixer Comfort de Eppendorf). Después de 0, 2, 4, 6, 8 y 9 minutos de incubación, el tratamiento se detiene trasladando 45 μ l de la muestra a 1000 μ l del tampón equilibrado a 20°C e incubando durante un minuto a 1500 rpm y a 20°C. Se mide la actividad residual con el ensayo de betamilo.

- 15 Cálculo: el cálculo de la $t_{1/2}$ se basa en la pendiente de \log_{10} (el logaritmo de base-10) de la actividad residual del betamilo frente al tiempo de incubación. La $t_{1/2}$ se calcula como $\text{pendiente}/0,301 = t_{1/2}$.

Ejemplo 8: Ensayos de horneado de un sistema modelo

20 Las masas se preparan en un farinógrafo a 30,0°C. Se pesan 10,00 g de la harina reformada y se añaden al farinógrafo; después de 1 min de mezclado, la referencia/muestra (referencia = tampón o agua, muestra = enzima + tampón o agua) se añade con una pipeta estéril a través de los orificios de la cuba de amasado. Después de 30 sg, la harina se retira de los bordes y del interior de los orificios de la cuba de amasado. La muestra se amasa durante 7 min.

25 Se realiza un ensayo con tampón o agua en el farinógrafo antes de ensayar la referencia final. Las FU deben ser de 400 con la referencia y, si esto no es así, se debe ajustar, por ejemplo, con la cantidad de líquido. La referencia/muestra se retira con una espátula y se coloca en la mano (con guantes desechables) antes de introducirla en tubos de vidrio pequeños (longitud de aproximadamente 4,5 cm) que se colocan en tubos de RMN y se cierra con un corcho. Se preparan 7 tubos por masa.

30 Cuando se han preparado todas las muestras, los tubos se colocan en un baño de agua (programable) a 33°C (sin los corchos) durante 25 min y después se ajusta el baño de agua para que se mantenga durante 5 min a 33°C, y después se calienta hasta 98°C a lo largo de 56 min (1,1°C por minuto) y, por último, para que se mantenga durante 5 min a 96°C.

35 Los tubos se conservan a 20,0°C en una cabina termostatzada. Se midió el contenido en sólidos de la miga mediante RMN de protón empleado un analizador de RMN Bruker NMS 120 Minispec en el día 1, 3 y 7, tal como se muestra para las muestras de miga preparadas con 0, 0,5, 1 y 2 ppm de PSacD34 en la figura 2. El menor aumento en el contenido en sólidos a lo largo del tiempo representa la reducción en la retrogradación de la amilopectina. Después de 7 días de conservación a 20,0°C en una cabina termostatzada se pesaron 10-20 mg de muestras de miga y se colocaron en cápsulas de DSC de aluminio convencionales de 40 μ l y se mantuvieron a 20°C.

40 Las cápsulas se emplearon para una calorimetría de barrido diferencia (DSC) en un instrumento Mettler Toledo DSC 820. Se emplearon como parámetros un ciclo de calentamiento de 20-95°C con un calentamiento de 10°C por min y gas/flujo: N₂/80 ml por min. Los resultados se analizaron y se calculó la entalpía para la fusión de la amilopectina retrogradada en J/g.

Ejemplo 9: Efectos anti envejecimiento

45 Se prepararon modelos de migas de pan y se midieron según el ejemplo 8. Los variantes de PS4 muestran una gran reducción en la retrogradación de la amilopectina después del horneado medida mediante calorimetría de barrido diferencial, en comparación con el control. Los variantes de PS4 muestran un claro efecto de la dosificación.

Ejemplo 10: Receta para ensayos de horneado

50 Se realizaron ensayos de horneado con un bizcocho de pan blanco convencional y una receta de masa para torrijas. La masa del bizcocho se preparó a partir de 1400 g de harina "Gold Medal" de General Mills, EE. UU., 800 g de agua, 40 g de aceite de linaza, 7,5 g de GRINDSTED™ SSL P55 Veg, 10 g de emulgente DIMODAN™ PH200 y 60 g de levadura comprimida. El bizcocho se mezcló durante 1 min a baja velocidad y después a 3 min a la velocidad 2 de un mezclador espiral Hobart. Después el bizcocho se fermenta durante 3 horas a 25°C, 85% de HR.

Después se añadieron al bizcocho 600 g de harina "Gold Medal", 18 g de levadura comprimida, 5 g de propionato de

calcio, 160 g de sacarosa, 5 g de propionato de calcio, 432 g de agua y ácido ascórbico (60 ppm de concentración final) y ADA (azodicarbonamida; 40 ppm de concentración final). La masa resultante se mezcló durante 1 min a baja velocidad y después durante 2 min a alta velocidad en un mezclador Diosna. Después se añadieron 30 g de sal a la masa.

- 5 La masa se deja en reposo durante 5 min a temperatura ambiente y después se pesan trozos de 550 g de la masa, se moldean en un laminador Glimex con ajustes a 1:4, 2:4, 3:15, 4:12 y anchura 8 en ambos lados y se trasladan a un banco de horneado. Después de 65 min de levado a 43°C a 95% de HR, las masas se hornean durante 26 min a 200°C en un horno MIWE.

Ejemplo 11: Control del volumen de bollos daneses

- 10 Se preparan bollos daneses a partir de una masa formada con 2000 g de harina reformada danesa (de Cerealia), 120 g de levadura comprimida, 32 g de sal y 32 g de sacarosa. Se añade agua a la masa según una optimización de agua anterior.

- 15 La masa se mezcla en un mezclador Diosna (2 min a baja velocidad y 5 min a alta velocidad). La temperatura de la masa después del mezclado se mantiene a 26°C. Se pesan 1350 g de la masa y se dejan en reposo durante 10 min en una cámara de calentamiento a 30°C. Los bollos se moldean en un moldeador Fortuna y se levantan durante 45 min a 34°C y 85% de humedad relativa. Después los bollos se hornean en un horno Bago 2 durante 18 min a 250°C con vapor en los primeros 13 segundos. Después del horneado, los bollos se enfrían durante 25 min antes de pesar y medir el volumen.

- 20 Los bollos se evaluaron con respecto al aspecto de la corteza, la homogeneidad de la miga, el cierre de la corteza, el modelo y el volumen específico (el volumen se mide con el método de desplazamiento de linaza).

Basándose en estos criterios, se descubrió que los variantes de PS4 aumentan el volumen específico y mejoran los parámetros de calidad de los bollos daneses. Así, los variantes de PS4 son capaces de controlar el volumen de los productos horneados.

Ejemplo 12: Protocolo para la evaluación de la firmeza, la resiliencia y la cohesividad

- 25 *Análisis del perfil de texturas del pan*

Se determinan la firmeza, la resiliencia y la cohesividad analizando rebanadas de pan mediante el análisis del perfil de texturas empleando un analizador de texturas de Stable Micro Systems, Reino Unido. El cálculo de la firmeza y la resiliencia se realiza según un patrón preconfigurado suministrado por Stable Micro System, Reino Unido. La sonda utilizada es una sonda redonda de aluminio de 50 mm.

- 30 El pan se rebana con una anchura de 12,5 mm. Las rebanadas se troquelan para obtener un trozo circular con un diámetro de 45 mm y se miden individualmente.

Se emplean los siguientes ajustes:

Velocidad antes del ensayo: 2 mm/s

Velocidad del ensayo: 2 mm/s

- 35 Velocidad después del ensayo: 10 mm/s

Distancia de ensayo de ruptura: 1%

Distancia: 40%

Fuerza: 0,098 N

Tiempo: 5,00 seg

- 40 Recuento: 5

Célula de carga: 5 kg

Tipo de activación: Automática - 0,01 N

El modo de compresión es una modificación del empleado en el método convencional AACC 74-09. La muestra se comprime dos veces en el ensayo. La figura 1 muestra un ejemplo de una curva del analizador de texturas.

- 45 Ejemplo 13: Protocolo para la evaluación de la firmeza

La firmeza se determina a una compresión del 40% durante la primera compresión. El número es la fuerza necesaria

para comprimir la rebanada hasta 40% del espesor total. Cuanto más bajo sea el valor, más blando será el pan. La firmeza se expresa como una presión, por ejemplo, en hPa.

Este ensayo puede denominarse el "protocolo de evaluación de la firmeza".

Ejemplo 14: Protocolo para la evaluación de la resiliencia

5 El área bajo la curva es una medida del trabajo aplicado durante el ensayo. El área bajo la curva en la parte de compresión (A1) y la parte de retirada (A2) durante la primera compresión se muestra en la figura 1.

La proporción entre A1 y A2 se define como la resiliencia de la muestra y se expresa como unidades de resiliencia. Un material verdaderamente elástico producirá una curva simétrica, puesto que la fuerza aplicada durante la primera parte será igual a la fuerza en la segunda parte. Para el pan y los materiales similares al pan, A2 normalmente es más pequeña que A2 debido a alteraciones en la estructura durante la compresión. Por tanto, la resiliencia siempre es menor que 1.

10

Este ensayo puede denominarse el "protocolo de evaluación de la resiliencia".

Ejemplo 15: Protocolo para la evaluación de la cohesividad

15 La cohesividad se define como la proporción entre el área bajo la segunda compresión al área bajo la primera compresión (A3/A1+A2), y se expresa como unidades de cohesividad. Es una medida de la degradación de la muestra durante la compresión. Cuanto mayor sea la capacidad de la muestra de recuperar su forma después de la primera compresión, más cercano a 1 será el valor. Para el pan y los materiales similares al pan, la cohesividad siempre es menor que 1.

Este ensayo puede denominarse el "protocolo de evaluación de la cohesividad".

20 Ejemplo 16: Protocolo para la evaluación del desmigajamiento (resistencia a que el pan se desmigüe)

Se colocan dos rebanadas de pan sobre un trozo de papel. Cada rebanada se divide en 4 cuadrados desgarrando la rebanada primero en vertical y después en horizontal.

25 Los desgarramientos se realizan separando la miga con los dedos. Primero, la rebanada se desgarrar desde el centro de la superficie superior del pan hasta el centro de la superficie inferior del pan. Después, cada mitad de la rebanada original se desgarrar desde el lado de la corteza hacia el interior de la rebanada. Los pequeños trozos de miga que se separan de los cuatro cuadrados se retiran agitando cada trozo después del desgarramiento al menos tres veces moviendo la mano arriba y abajo.

Se determina el peso de los pequeños trozos de miga separados como una medida del desmigajamiento. Este ensayo puede denominarse el "protocolo de evaluación del desmigajamiento".

30 Ejemplo 17: Protocolo para la evaluación de la plegabilidad

El pan para torrijas se rebana empleando un rebanador de pan automático con un espesor de rebanada ajustado a 15 mm. La rebanada se pliega a mano desde la parte superior de la rebanada hacia la inferior, de modo que la dirección del pliegue es de lado a lado.

La plegabilidad se evalúa de modo visual empleando el siguiente sistema de puntuación:

Puntuación	Característica
1	No puede plegarse, la rebanada se rompe cuando se pliega
2	Puede plegarse, la rebanada entera se rompe dentro de 5 segundos después del plegamiento
3	Puede plegarse, parte de la rebanada se rompe dentro de 5 segundos después del plegamiento. Otras partes se rompen después.
4	Puede plegarse, parte de la rebanada se rompe después de 5 segundos después del plegamiento. Otras partes no se rompen.
5	Puede plegarse, ninguna parte de la rebanada se rompe después del plegamiento.

35 Este ensayo puede denominarse el "protocolo de evaluación de la plegabilidad".

Ejemplo 18: Mejor termoestabilidad de los polipéptidos variantes de PS4

Se mide la estabilidad térmica de la amilasa pSac-pMS382 como se describió anteriormente y se compara con la de pSac-D34/pMD3 (SEQ ID NO:2) y pSac-pMD229 (SEQ ID NO:13).

Debido a que la inactivación por calor sigue una reacción de primer orden, se determina la semivida, definida como el tiempo (en minutos) para 50% de inactivación, basándose en la actividad residual empleando el ensayo de betamilo después de una incubación durante 1-40 minutos a 75, 80 y 85°C (167, 176 y 185°F, respectivamente) en citrato de sodio 50 mM, cloruro de calcio 5 mM, pH 6,5.

- 5 Los resultados se muestran en la figura 2. Esta figura demuestra que la termoestabilidad (semivida) de los polipéptidos variantes de PS4 que comprenden una sustitución en la posición 307 por un aminoácido básico o con carga positiva mejora comparado con polipéptidos sin dicha mutación.

Ejemplo 19: Propiedades de manipulación mejoradas de productos alimentarios tratados con los polipéptidos variantes de PS4: firmeza

- 10 Se hornea pan con cantidades variables de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21) que comprende una sustitución por un resto básico o con carga positiva en la posición 307, concretamente, 20.000, 40.000 y 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382.

La firmeza del pan se ensaya según el protocolo indicado en el ejemplo 13 en diversos momentos después del horneado. Como control, también se mide la firmeza del pan horneado sin ninguna enzima.

- 15 La figura 3 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la firmeza de un pan.

Ejemplo 20: Propiedades de manipulación mejoradas de productos alimentarios tratados con los polipéptidos variantes de PS4: resiliencia

- 20 Se hornea pan con cantidades variables de pSac-pMS382 que comprende una sustitución por un resto básico o con carga positiva en la posición 307, concretamente, 20.000, 40.000 y 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382.

La resiliencia del pan se ensaya según el protocolo indicado en el ejemplo 14 en diversos momentos después del horneado. Como control, también se mide la resiliencia del pan horneado sin ninguna enzima.

La figura 4 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la resiliencia de un pan.

- 25 Ejemplo 21: Propiedades de manipulación mejoradas de productos alimentarios tratados con los polipéptidos variantes de PS4: cohesividad

Se hornea pan con cantidades variables de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21) que comprende una sustitución por un resto básico o con carga positiva en la posición 307, concretamente, 20.000, 40.000 y 60.000 unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382.

- 30 La cohesividad del pan se ensaya según el protocolo indicado en el ejemplo 15 en diversos momentos después del horneado. Como control, también se mide la cohesividad del pan horneado sin ninguna enzima.

La figura 5 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la cohesividad de un pan.

Ejemplo 22: Propiedades de manipulación mejoradas de productos alimentarios tratados con los polipéptidos variantes de PS4: firmeza

- 35 Se hornea pan con 60.000 de unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21) que comprende una sustitución por un resto básico o con carga positiva en la posición 307, y se ensaya la firmeza del pan según el protocolo indicado en el ejemplo 13 en diversos momentos después del horneado.

También se hornea pan con 60.000 de unidades de betamilo/kg de pSac-D34/pMD3 (SEQ ID NO:2) y 60.000 de unidades de betamilo/kg de pSac-pMD229 (SEQ ID NO:13), cada uno con una sustitución en la posición 307 por un aminoácido básico o con carga positiva. Se ensaya la firmeza del pan.

- 40 Como control, también se mide la firmeza del pan horneado sin ninguna enzima.

La figura 6 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la firmeza de un pan tratado con un polipéptido variante de PS4 con y sin una sustitución en 307.

Ejemplo 23: Propiedades de manipulación mejoradas de productos alimentarios tratados con los polipéptidos variantes de PS4: firmeza, resiliencia y cohesividad

- 45 Se hornea pan con 60.000 de unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21) que comprende una sustitución por un resto básico o con carga positiva en la posición 307, y se ensaya la resiliencia del pan según el protocolo indicado en el ejemplo 14 en diversos momentos después del horneado.

También se hornea pan con 60.000 de unidades de betamilo/kg de pSac-D34/pMD3 (SEQ ID NO:2) y 60.000 de unidades de betamilo/kg de pSac-pMD229 (SEQ ID NO:13), cada uno con una sustitución en la posición 307 por un

aminoácido básico o con carga positiva. Se ensaya la resiliencia del pan.

Como control, también se mide la resiliencia del pan horneado sin ninguna enzima.

La figura 7 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la resiliencia de un pan tratado con un polipéptido variante de PS4 con y sin una sustitución en 307.

- 5 Ejemplo 24: Propiedades de manipulación mejoradas de productos alimentarios tratados con los polipéptidos variantes de PS4: cohesividad

Se hornea pan con 60.000 de unidades de betamilo/kg de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21) que comprende una sustitución por un resto básico o con carga positiva en la posición 307, y se ensaya la cohesividad del pan según el protocolo indicado en el ejemplo 15 en diversos momentos después del horneado.

- 10 También se hornea pan con 60.000 de unidades de betamilo/kg de pSac-D34/pMD3 (SEQ ID NO:2) y 60.000 de unidades de betamilo/kg de pSac-pMD229 (SEQ ID NO:13), cada uno con una sustitución en la posición 307 por un aminoácido básico o con carga positiva. Se ensaya la cohesividad del pan.

Como control, también se mide la cohesividad del pan horneado sin ninguna enzima.

- 15 La figura 8 muestra los resultados de un ensayo de horneado en el cual se ensaya la cohesividad de un pan tratado con un polipéptido variante de PS4 con y sin una sustitución en 307.

Ejemplo 25: Propiedades de manipulación mejoradas de productos alimentarios tratados con los polipéptidos variantes de PS4: plegabilidad

Se hornean bizcochos y masa de pan para torrijas con 4 ppm de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21, sustitución H307K) y se ensaya la plegabilidad del pan resultante y se puntúa como se describió anteriormente.

- 20 Como control, se hornean bizcochos y masa de pan para torrijas no tratados con enzima y la plegabilidad se ensaya y se puntúa.

Los ensayos se realizan con tres rebanadas en el día 13 después del horneado.

Enzima aplicada	Puntuación promedio de plegabilidad
4 ppm de pSac-pMS382	3
Control (sin enzima)	1

- 25 Tal como se muestra en la anterior tabla y en las figuras, la plegabilidad mejora en bizcochos y masa de pan para torrijas tratados con un polipéptido variante de PS4 que comprende una sustitución en la posición 307 por un aminoácido básico o con carga positiva comparado con un pan para torrijas no tratado.

Ejemplo 26: Propiedades de manipulación mejoradas de productos alimentarios tratados con los polipéptidos variantes de PS4: plegabilidad

Se hornean bizcochos y masa de pan para torrijas con 4 ppm de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21, sustitución H307K) y se ensaya la plegabilidad del pan resultante y se puntúa como se describió anteriormente.

- 30 Como control, se hornean bizcochos y masa de pan para torrijas no tratados con enzima y la plegabilidad se ensaya y se puntúa. También se ensaya la plegabilidad de bizcochos y masa de pan para torrijas tratados con otras enzimas, tal como se muestra a continuación.

- 35 La enzima pSac-D34 (también denominada pMD3) comprende las mutaciones N33Y, D34N, G121D, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, S334P con relación a la exoamilasa no maltogénica de tipo salvaje, y su secuencia se muestra como SEQ ID NO:2.

La enzima pSac-pMD229 comprende las mutaciones N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, G303E, H307L, A309P, S334P con relación a la exoamilasa no maltogénica de tipo salvaje, y su secuencia se muestra como SEQ ID NO:13.

Los ensayos se realizan con tres rebanadas en el día 8 después del horneado.

Enzima aplicada	Puntuación promedio de plegabilidad
pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21)	5
pSac-pMD229 (SEQ ID NO:13)	3

Enzima aplicada	Puntuación promedio de plegabilidad
pSac-D34/pMD3 (SEQ ID NO:2)	2
Control (sin enzima)	1

Tal como se muestra en la anterior tabla, la plegabilidad mejora en bizcochos y masa de pan para torrijas tratados con un polipéptido variante de PS4 que comprende una sustitución en la posición 307 por un aminoácido básico o con carga positiva comparado con enzimas sin esta sustitución.

5 Ejemplo 27: Propiedades de manipulación mejoradas de productos alimentarios tratados con combinaciones de polipéptidos variantes de PS4 y otras enzimas: plegabilidad

Se hornean bizcochos y masa de pan para torrijas con 6 ppm de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21, sustitución H307K) solos o en combinación con otras enzimas, tal como se muestra a continuación, y se ensaya la plegabilidad del pan resultante y se puntúa como se describió anteriormente.

10 Combinación 1: 6 ppm de pSac-pMS382 + 50 ppm de GRINDAMYL™ POWERBake 900 + 15 ppm de GRINDAMYL™ Max- Life U4.

Combinación 2: 6 ppm de pSac-pMS382 + 50 ppm GRINDAMYL™ POWERBake 900

Combinación 3: 6 ppm de pSac-pMS382 + 50 ppm de GRINDAMYL™ POWERBake 900 + 150 ppm de GRINDAMYL™ POWERBake 4050

15 GRINDAMYL™ POWERBake 900 es una xinalasa disponible en el mercado en Danisco A/S. GRINDAMYL™ Max-Life U4 es una α -amilasa bacteriana disponible en el mercado en Danisco A/S. GRINDAMYL™ POWERBake 4050 es un lipasa disponible en el mercado en Danisco A/S.

Como controles, se hornea un bizcocho y una masa de pan para torrijas no tratados con enzima y la plegabilidad se ensaya y se puntúa.

Los ensayos se realizan con tres rebanadas en el día 5 después del horneado.

Enzima aplicada	Puntuación promedio de plegabilidad
6 ppm de pSac-pMS382	4
6 ppm de pSac-pMS382 + 50 ppm de POWERBake 900 + 15 ppm de Max-Life U4	5
6 ppm de pSac-pMS382 + 50 ppm de POWERBake 900	5
6 ppm de pSac-pMS382 + 50 ppm de POWERBake 900 + 150 ppm de POWERBake 4050	5
Control (sin enzima)	1

20 Tal como se muestra en la anterior tabla, la plegabilidad mejora en bizcochos y masa de pan para torrijas tratados con un polipéptido variante de PS4 que comprende una sustitución en la posición 307 por un aminoácido básico o con carga positiva, por sí solo o en combinación con otras enzimas, tales como α -amilasa bacteriana, lipasa y xilanasas.

25 Ejemplo 28: Propiedades de manipulación mejoradas de productos alimentarios tratados con los polipéptidos variantes de PS4: ensayos de desmigajamiento

Se hornean bizcochos y masa de pan para torrijas con 4 ppm de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21, sustitución H307K) y se ensaya el desmigajamiento del pan resultante y se puntúa como se describió anteriormente.

Como control, se hornean bizcochos y masa de pan para torrijas no tratados con enzima y la plegabilidad se ensaya y se puntúa.

30 Los ensayos se realizan en el día 13 después del horneado.

Enzima aplicada	Peso de las migas separadas en mg
Control (sin enzima)	23
4 ppm de pSac-pMS382	13

Tal como se muestra en la anterior tabla, el desmigajamiento después de 13 días se reduce en bizcochos y masa de pan para torrijas tratados con un polipéptido variante de PS4 que comprende una sustitución en la posición 307 por un aminoácido básico o con carga positiva.

- 5 Ejemplo 29: Propiedades de manipulación mejoradas de productos alimentarios tratados con los polipéptidos variantes de PS4: ensayos de desmigajamiento

Se hornean bizcochos y masa de pan para torrijas con 4 ppm de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21, sustitución H307K) y se ensaya el desmigajamiento del pan resultante y se puntúa como se describió anteriormente.

Como control, se hornean bizcochos y masa de pan para torrijas no tratados con enzima y la plegabilidad se ensaya y se puntúa.

- 10 Los ensayos se realizan en el día 15 después del horneado.

Enzima aplicada	Peso de las migas separadas en mg
Control (sin enzima)	41
4 ppm de pSac-pMS382	9

Tal como se muestra en la anterior tabla, el desmigajamiento después de 15 días se reduce en bizcochos y masa de pan para torrijas tratados con un polipéptido variante de PS4 que comprende una sustitución en la posición 307 por un aminoácido básico o con carga positiva.

Ejemplo 30: Polipéptidos variantes de PS4 con sustituciones en la posición 307K

- 15 Se preparan los siguientes polipéptidos con sustituciones en la posición 307 a lisina y sus propiedades se ensayan como se describió anteriormente. Las secuencias de los polipéptidos comprenden la secuencia de SEQ ID NO:2, junto con las sustituciones especificadas.

Variante	Mutaciones (de SEQ ID NO:2)
SSM471C 04	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, G303E, H307K, A309P, S334P
pMS343	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, G303E, H307K, A309P, S334P
pMS358	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS361	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, G303E, H307K, A309P, S334P
pMS364	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS366	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS368	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, G158T, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, G303E, H307K, A309P, S334P
pMS359	N33Y, D34N, D68C, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, G303E, H307K, A309P, S334P
pMS360	N33Y, D34N, D68C, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS362	N33Y, D34N, D68C, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, G303E, H307K, A309P, S334P
pMS363	N33Y, D34N, D68C, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, G158T, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, G303E, H307K, A309P, S334P
pMS365	N33Y, D34N, D68C, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, G158T, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS367	N33Y, D34N, D68C, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, G303E, H307K, A309P, S334P

ES 2 644 745 T3

Variante	Mutaciones (de SEQ ID NO:2)
pMS369	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, G303E, H307K, A309P, S334P
pMS380	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H307K, A309P, S334P
pMS383	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H307K, A309P, S334P
pMS384	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS385	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS372	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, Y198W, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS381	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS391	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS382	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H307K, A309P, S334P
pMS386	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, Y198W, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS387	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS388	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, Y198W, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS390	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS392	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS393	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, Y198W, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS382	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H307K, A309P, S334P
pMS3.89	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS390	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS380	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H307K, A309P, S334P
pMS383	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H307K, A309P, S334P
pMS384	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS385	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS372	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, Y198W, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS381	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P

ES 2 644 745 T3

Variante	Mutaciones (de SEQ ID NO:2)
pMS391	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS382	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H307K, A309P, S334P
pMS386	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, Y198W, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS387	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS388	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, Y198W, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS390	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS392	N33Y, D34N, N145D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS393	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, Y198W, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS382	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H307K, A309P, S334P
pMS389	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P
pMS390	N33Y, D34N, G70K, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307K, A309P, S334P

Ejemplo 31: Polipéptidos variantes de PS4 con la posición 307H

Se preparan los siguientes polipéptidos con histidina en la posición 307 junto con otras mutaciones, y sus propiedades se ensayan como se describió anteriormente. Las secuencias de los polipéptidos comprenden la secuencia de SEQ ID NO:2, junto con las sustituciones especificadas.

Variante	Mutaciones (de SEQ ID NO:2)
pMS375	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307H, A309P, S334P
pMS376	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307H, A309P, S334P
pMS379	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307H, A309P, S334P
pMS394	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307H, A309P, S334P
pMS395	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, Y198W, G223E, S229P, H272Q, H307H, A309P, S334P
pMS396	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307H, A309P, S334P
pMS397	N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307H, A309P, S334P
pMS396	N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, N145D, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, H307H, A309P, S334P

5 Ejemplo 32: Generación de polipéptidos de PS4 con las mutaciones L307R y L307K

Se generaron SSM 471 B10 y SSM 471 C04 con otros restos en la posición 307 (L307R, L307K) empleando la mutagénesis específica dirigida a múltiples sitios (según se describió anteriormente en el ejemplo 3), con los cebadores de la siguiente tabla:

ES 2 644 745 T3

Cebador empleado para el banco Site Scan en la posición 307

Objetivo	Descripción	Codón	Secuencia oligonucleotídica	Modificación	Hebra
MSDM	L307NNS (sint)	NNS	CAAAATGAAGGACAACATNN STGGCCGCTTCAAGATGGCC	5' fosfato	+

Se secuenciaron 96 clones del banco Site Scan y se identificaron los dos variantes SSM 471 B10 y SSM 471 C04 que contienen el aminoácido R y K, respectivamente, en la posición 307.

5 La secuencia de aminoácidos de SSM471 B10 se indica como SEQ ID NO:27, mientras que la secuencia del ácido nucleico de SSM471 B10 se indica como SEQ ID NO:28.

La secuencia de aminoácidos de SSM471 C04 se indica como SEQ ID NO:29, mientras que la secuencia del ácido nucleico de SSM471 C04 se indica como SEQ ID NO:30.

10 Otros polipéptidos variantes de PS4 derivados de un polipéptido de origen y con las mutaciones L307R o L307K se generaron de modo similar empleando la mutagénesis específica dirigida a múltiples sitios (según se describió anteriormente en el ejemplo 3), con los cebadores de la siguiente tabla:

Cebador empleado para el banco Site Scan en la posición 307

Objetivo	Descripción	Codón	Secuencia oligonucleotídica	Modificación	Hebra
MSDM	L307NNS (sint)	NNS	CAAAATGAAGGACAACATNN STGGCCGCTTCAAGATGGCC	5' fosfato	+

Para los polipéptidos con una mutación adicional en la región de 301 a 306 o de 308 a 313, la mutación adicional se genera mediante mutagénesis específica dirigida a múltiples sitios (según se describió anteriormente en el ejemplo 3).

15 Se secuenciaron 96 clones del banco Site Scan y, con ello, se identificaron los variantes que contienen el aminoácido R y K, respectivamente, en la posición 307.

Ejemplo 33: Ensayo de tortilla

Se hornean tortillas según la siguiente receta:

Ingredientes	% de panadería	
	Control	Ensayo
Harina	100,00	100,00
Sal	2,00	2,00
Bicarbonato de sodio	1,00	1,00
Pirofosfato ácido de sodio 28	0,45	0,45
Ácido fumárico	0,65	0,65
Sorbato de potasio	0,40	0,40
PANADON® POWERBake 808 K1	0,40	0,40
Propionato de calcio	0,40	0,40
Manteca de uso múltiple	13,0	13,0
Agua	56,00	56,00
Novamyl™ 1500	400 ppm	---
pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21) (EDS 201)	---	100 ppm

Procedimiento

20 La temperatura de la masa debe ser de 30°C. Introducir todos los ingredientes secos en un mezclador aK Emper y mezclar lentamente durante 1 min. Añadir agua y mezclar lentamente durante 12 min. Peso: 1350 g. Moldeado: Glimex: Tiempo en la prensa 3,0 - tiempo de redondeado: 3,0. Dejar la masa en reposo durante 10 min a 30°C.

Hacer pasar las bolas de masa a través de una máquina para tortillas CFO 40:

Ajustes:

Prensado: Prensar en caliente las bolas de masa.

Placa superior: 205°C; Placa inferior: 200°C

5 Transportadores:

Superior: 230°C; Intermedio: 225°C; Inferior: 160°C

Tiempo de horneado: aproximadamente 30 segundos

Enfriamiento: 12 min a 20°C, 80% de HR

Envasado: al vacío con CO2

10 Ajustes: vacío: 40; CO2: 41; temp: 82°C

Ejemplo 34: Resultados del ensayo de plegabilidad en el día 8 después del horneado

Se realiza un ensayo de plegabilidad en el día 8 después del horneado según el ejemplo 17.

15 La figura 9 muestra los resultados de un ensayo de plegabilidad en el día 8 después del horneado de tortillas con 400 ppm de Novamyl (TM) 1500 y 50 BMK/kg de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21). La figura 10 muestra los resultados de un ensayo de plegabilidad en el día 8 después del horneado de tortillas con 400 ppm de Novamyl™ 1500 y 50 BMK/kg de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21).

Cuando se pliegan 10 tortillas con 400 ppm de Novamyl™ 1500, todas se rompieron durante el plegamiento, como se muestra en las figuras 9 y 10.

20 Cuando se pliegan 10 tortillas con 50 BMK/kg de pSac-pMS382 (SEQ ID NO:21), ninguna se rompió durante el plegamiento, como se muestra en las figuras 9 y 10.

Ejemplo 35: Ensayo de horneado con SSM 471 B10 (SEQ ID NO:27, 307R) y SSM 471 C04 (SEQ ID NO:29, 307K)

Se preparó una torrija con el procedimiento de bizcocho y masa descrito en el ejemplo 10 para ensayar los variantes SSM 471 B10 (SEQ ID NO:27) con 307R y SSM 471 C04 (SEQ ID NO:29) con 307K a una dosificación de 40 BMK/kg. La torrija se evaluó para la firmeza y la resiliencia como se describió en los ejemplos 12 a 14.

25 La figura 11 muestra los resultados de un ensayo de firmeza de torrijas preparadas con SSM 471 B10 (SEQ ID NO:27) y SSM 471 C04 (SEQ ID NO:29). La figura 12 muestra los resultados de un ensayo de resiliencia de torrijas preparadas con SSM 471 B10 (SEQ ID NO:27) y SSM 471 C04 (SEQ ID NO:29).

30 Ambos variantes provocan una disminución significativa en la firmeza (figura 11) y un aumento significativo en la resiliencia (figura 12), lo cual indica que los variantes de 307R y 307K proporcionan unos efectos antienranciamiento significativos.

Ejemplo 36: Ensayo de horneado con PMS 370 (SEQ ID NO:31, 307H) y SSM 471 C04 (SEQ ID NO:29, 307K)

Se genera PMS 370 empleando la mutagénesis específica dirigida a múltiples sitios, según se describió anteriormente en el ejemplo 3. La secuencia de PMS 370 se indica como SEQ ID NO:31.

35 Se prepara una torrija mediante el procedimiento de bizcocho y masa descrito en el ejemplo 10. La torrija se empleó para ensayar los variantes PMS 370 con 307H y SSM 471 C04 con 307K a una dosificación de 20, 40 y 60 BMK/kg.

La torrija se evalúa para la resiliencia como se describió en los ejemplos 12 y 14.

La figura 13 muestra los resultados de un ensayo de resiliencia de torrijas preparadas con pMS 370 (SEQ ID NO:31) y SSM 471 C04 (SEQ ID NO:29).

40 Ambos variantes provocan un aumento significativo en la resiliencia (figura 13) con dosificaciones crecientes, lo cual indica que los variantes de 307R y 307K proporcionan una resiliencia significativamente mejorada en función de la dosificación. Sin embargo, el efecto de las dosificaciones de los variantes de 307K es sustancialmente más fuerte que las respectivas dosificaciones del variante de 307H.

Referencias bibliográficas

45 Penninga, D., van der Veen, B.A., Knegtel, R.M., van Hijum, S.A., Rozeboom, H.J., Kalk, K.H., Dijkstra, B.W., Dijkhuizen, L. (1996), The raw starch binding domain of cyclodextrin glycosyltransferase from *Bacillus circulans* strain

251, J. Biol. Chem., 271, 32777-32784.

Sambrook J, F.E.M.T. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

5 Zhou, J.H., Baba, T., Takano, T., Kobayashi, S., Arai, Y. (1989), Nucleotide sequence of the maltotetrahydrolase gene from *Pseudomonas saccharophila*, FEBS Lett., 255, 37-41.

10 Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención, según se reivindica, no debe limitarse indebidamente a estas realizaciones específicas. En efecto, se pretende que diversas modificaciones de los modos descritos para realizar la invención, que son obvias para los expertos en la técnica de la biología molecular o campos relacionados, estén dentro del alcance de las reivindicaciones.

Listados de secuencias

SEQ ID NO: 1

Secuencia de referencia de PS4, proveniente de la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila*.

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE AP**ND**WYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
 61 RDFSSWTDGG KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
 121 **G**YPDK**E**INLP AG**Q****R**FWRNDC **A**DPGNYPNDC DDGDRF**I**GGE SDLNTGHPQI YGMFRDE**L**AN
 181 LRSGYGAGGF RFD**F**VRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WK**G**PSEYPSW DWRNTASWQQ
 241 IIKDWS**D**RAK CPVFD**F**ALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVA**V**TFV DNHDTGYS**P**G
 301 QNGGQH**H**WAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYW**S**HMYDWG YGDFIRQLIQ VRRTAGVRAD
 361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRS**G**S
 421 GDGGGNDGG GGLVNVNFR**C** DNGVTQMGDS VYAVGNV**S**QL GNWSPASAVR LTD**T**SSYPTW
 15 481 KGSIALPDGQ NVEWKCLIRN EADATLVRQW QSGGNNQVQA AAGASTSGSF

SEQ ID NO: 2

Secuencia de pSac-D34; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 11 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

20 pSac-D34 (también denominada pMD3) comprende las mutaciones N33Y, D34N, G121D, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, S334P con relación a la exoamilasa no maltogénica de tipo salvaje.

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE AP**YN**WYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
 61 RDFSSWTD**P**G KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
 121 **D**YPDK**E**INLP AG**Q****R**FWRNDC **P**DPGNYPNDC DDGDRF**L**GGE SDLNTGHPQI YGMFRDE**F**TN
 181 LRSGYGAGGF RFD**F**VRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WK**A**PSEYPSW DWRNTASWQQ
 241 IIKDWS**D**RAK CPVFD**F**ALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVA**V**TFV DNHDTGYS**P**G
 301 QNGGQH**L**WAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYW**P**HMYDWG YGDFIRQLIQ VRRTAGVRAD
 361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRS**G**S
 421 GDGGGNDGG

SEQ ID NO: 3

Secuencia de pSac-D20; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 13 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE AP**YN**WYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
 61 RDFSSWTD**P**G **R**SGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
 121 **D**YPDK**E**INLP AG**Q****R**FWRNDC **P**DPGNYPNDC DDGDRF**L**GGE SDLNTGHPQI YGMFRDE**F**TN
 181 LRSGYGAGGF RFD**F**VRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WK**A**PSEYPSW DWRNTASWQQ
 241 IIKDWS**D**RAK CPVFD**F**ALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVA**V**TFV DNHDTGYS**P**G
 301 QNGGQH**L**WAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYW**P**HMYDWG YG**E**FIRQLIQ VRRTAGVRAD
 361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRS**G**S
 25 421 GDGGGNDGG

SEQ ID NO: 4

Secuencia de pSac-D14; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 14 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APY~~Y~~WYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
 61 RDFSSWTDPG ~~R~~SGGGEGYFW HDFNKNSRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPHMNR
 121 ~~D~~YPDKEINLP ~~A~~GQ~~R~~FWRNDC ~~P~~DPGNYPNDC DDGDRF~~L~~GGE SDLNTGHPQI YGMFRDE~~F~~TN
 181 LRSGYGAGGF RFDVFRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WK~~A~~PSEYPSW DWRNTASWQQ
 241 IIKDWSRAK CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPD RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
 301 QNGGQH~~L~~WAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VY~~W~~PHMYDWG YG~~E~~FIRQLIQ VRRTAGVRAD
 361 SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
 421 GDGGGNDGG

SEQ ID NO: 5

Precursor de la glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60) (G4-amilasa) (amilasa formadora de maltotetraosa) (exomaltotetrahidrolasa) (exoamilasa formadora de maltotetraosa) de *Pseudomonas saccharophila*, n.º de registro de SWISS-PROT P22963.

5

MSHILRAAVL AAVLLPFPAL ADQAGKSPAG VRYHGGDEII LQGFHWNVVR EAPNDWYNIL
 RQQASTIAAD GFSAIWMPVP WRDFSSWTDG GKSGGGEGYF WHDFNKNGRY GSDAQLRQAA
 GALGGAGVKV LYDVVPHMNR RGYPDKEINL PAGQGFWRND CADPGNYPND CDDGDRFIGG
 ESDLNTGHPQ IYGMFRDELA NLRSGYGAGG FRFDVFRGYA PERVDSWMSD SADSSFCVGE
 LWKGPSEYPS WDWNTASWQ QIIKDWSRA KCPVDFDFALK ERMQNGSVAD WKHGLNGNPD
 PRWREVAVTF VDNHDTGYSP GQNGGQHHWA LQDGLIRQAY AYILTSPGTP VVYWSHMYDW
 GYGDFIRQLI QVRRTAGVRA DSAISFHSYGS SGLVATVSGS QOTLVVALNS DLANPGQVAS
 GSFSEAVNAS NGQVRVWRSG SGDGGGNDGG EGGLVNVNFR CDNGVTQMGD SVYAVGNVSVQ
 LGNWSPASAV RLTDTSYPT WKGSIALPDG QNVEWKCLIR NEADATLVRQ WQSGGNNQVQ
 AAAGASTSGS F

SEQ ID NO: 6

Gen mta de *P. saccharophila* que codifica una maltotetrahidrolasa (n.º EC = 3.2.1.60), n.º de registro de GenBank X16732.

10

gatcggcgta ggtttcgcat tcggtgcccc ggcgatattt cgccggtgcg ccagcagcct
 ggaagcagc ctggtcgccg ccgcccggcg tggcgccgac gcccgaacgc agatagccgt
 ggaatcgac cgccagggcc gggccgcca cagcagggc ggcaagcagg caggcgggtt
 ttaggacgaa caggggggtgc gcggtgtgct tcatgacgag gtccttgttt ttctgttaa
 tgccgaatcg atcacgcctt cgctgcgtgt cgcagggcgc agctcgggtg cgaaagcctc
 ggggatggct ccgctggcgg catcctccc accagagatt tcgctggcgc agctcagggg
 cgtaatcagg atgagtgcgg cgtaatccct ggggtggggc tacgcccggc agggcgcaga
 tgattgccag gggccttcgg cctggccact acgcccctg caactgggcg ggggaggttg
 gtggtcgggg cgtgcagggg cagcctgcgg gtgcccgtcg aagaccggc cggcgttcat
 cctcgtccgg cggccttgcc gtaggatacc cgaacaagca caagaaccgg agtattgcca
 tgagccacat cctgcgtgcc gccgtattgg cggcggctct gctgcccgtt cccgcaactg
 ccgatcaggc cggcaagagc ccggccgggg tgcgctacca cggcggcgac gaaatcatcc
 tccagggctt cactggaac gtcgtccgcg aagcggccaa cgactggtac aacatcctcc
 gccaacaggc ctgcagcagc gcggccgacg gcttctcggc aatctggatg ccggtgccct
 ggcgtgactt ctccagctgg accgacggcg gcaagtccgg cggcggcgaa ggctacttct
 ggcacgactt caacaagaac ggccgctacg gcagcgacgc ccagctgcgc caggccggcg
 ggcgactcgg tggcggggg gtgaaggtgc tctacgatgt ggtgcccact cacatgaacc
 gcggtacccc ggacaaggag atcaacctgc cggccggcca gggcttctgg cgcaacgact
 ggcggaccc gggcaactac cccaacgact gcgacgacgg tgaccgcttc atcggcggcg
 agtcggacct gaacaccggc catccgcaga ttacggcat gtttcgcgac gagcttgcca
 acctgcccag cggtacggc gccggcggct tccgcttcga cttcgttcgc ggctatgcgc
 ccgagcgggt cgacagctgg atgagcgaca gcgcccagac cagcttctgc gttggcagc
 tgtggaaaagg cccttctgaa tatccgagct gggactggcg caacacggcg agctggcagc


```

agatcatcaa ggactggtcc gaccgggcca agtgcccggg gttcgacttc gctctcaagg
agcgcatgca gaacggctcg gtgcccact ggaagcatgg cctcaatggc aaccccgacc
cgcgctggcg cgaggtggcg gtgaccttcg tgcacaacca cgacaccggc tattcgcccg
ggcagaacgg cggccagcac cactgggccc tgacggacgg gctgatccgc caggcctacg
cctacatcct caccagcccg ggcacgcccg tgggtgactg gtcgcacatg tacgactggg
gctacggcga ctcatccgc cagctgatcc aggtgcggcg caccgcccgc gtgcgcggcg
attcggcgat cagcttccat agcgggtaca gcggtctggt cgctaccgtc agcggcagcc
agcagaccct ggtggtggcg ctcaactccg atctggccaa ccccgccag gttgccagcg
gcagcttcag cgaggcggtc aacgccagca acggccaggg gcgctctgg cgacgcgta
gcggcgatgg cggcgggaat gacggcggcg aggtgggctt ggtcaatgtg aacttccgct
gcgacaacgg cgtgacgcag atggggcaca gcgtctacgc ggtgggcaac gtcagccagc
tcggcaactg gagcccggcc tccgcggtac ggctgaccga caccagcagc tatccgacct
ggaagggcag catcgccctg cctgacggtc agaactgga atggaagtgc ctgatccgca
acgagggcga cgcgacgctg gtgcgtcagt ggcaatcggg cggcaacaac caggtccagg
ccgcccggcg cgcgagcacc agcggctcgt tctgacgaca tgcccggccg gcctcggcta
cgcctacgcc gggcggctcc tcccgaacca ggtggggcag ggaggaggcc ggcgacggcg
cgggcccgat atgtggcag gacaaccata aaagccttcg cgctgcgctg tcgatcagg
agctgttcat gttggcccga acccgctcga ccccttccg gcttggcttc ctggcccggc
tgtacctgct gatcgccgca ctggtggcct tgctgatgct ggtagccggc accagcctgg
ttgccatcgg ccgctgcaa ggcaatgcc agcaaatctc gtcgaccgcg tcgctctgc
tggctcagcga gagcttcttc ggtacgttgc agagcctgac gcagaacctg tccgacgcc
tggccgagga ccggcctgac cagctcgac gctatgtcgg ccggcatcgc acgctgcagg
accaggccct cgagctgttc gccagctgg agcgggtgac gccggcacat gccgagacca
agcaagcctg gcggcgtgt tgccggagct cgaccgccgc agcctggcgc tgatcgatgc
gcacgcgacc tgctcgcgcg tggggcgcaa cgccgtcgc tgccgatct gcagctgcag
ttctcgcggc tcaagcagga cctgctgcag gcgcagttcg tgacgggcca cgagctggtc
gcctattcca tcaagcagtt catcatccc ctcgagcagg tcgagcgctg ctgttcgatg
ccatcgcgct gtcttcgatc aaggcactcg atgaagcggg tgccgagatc

```

SEQ ID NO: 7

Secuencia de referencia de PS4, proveniente de la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri*

```

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APNDWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDGS KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 GYPDKINL LP AGQGFWRNDC ADPGNYPNDC DDGDRF LGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVIRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVDEL WKGPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVDFDFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPDV RWREVAVTFV DNHDTGYSPP
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPTVPV VYWSHMYDWG YGDFIRQLIQ VVRAAGVRAD
361 SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSQT
421 GSGGEPGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
5 481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL

```

SEQ ID NO: 8

Secuencia de PStu-D34; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri* con 9 sustituciones

```

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDPS KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 DYPDKINL LP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRF LGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVIRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVDEL WKAPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVDFDFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPDV RWREVAVTFV DNHDTGYSPP
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPTVPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ VVRAAGVRAD
361 SAISFHSYGS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSQT
421 GSGGEPGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
10 481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL

```

SEQ ID NO: 9

Secuencia de PStu-D20; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri* con 11 sustituciones.

```

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYWWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDPS RSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 DYPDKEINLP AGQRRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVGEL WKAPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSRAK CPVFDFFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGEFIRQLIQ VRRRAAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGT
421 GSGGGEPGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL
    
```

5 **SEQ ID NO: 10**

Secuencia de PStu-D14; la secuencia de aminoácidos de la maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri* con 12 sustituciones.

```

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYWWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDPS RSGGGEGYFW HDFNKNSRRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 DYPDKEINLP AGQRRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVGEL WKAPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSRAK CPVFDFFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGEFIRQLIQ VRRRAAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGT
421 GSGGGEPGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL
    
```

SEQ ID NO: 11

- 10 Precursor de la glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60) (G4-amilasa) (amilasa formadora de maltotetraosa) (exomaltotetrahidrolasa) (exoamilasa formadora de maltotetraosa) de *Pseudomonas stutzeri*, n.º de registro de SWISS-PROT P13507.

```

MSHILRAAVL AAMLLPLPSM ADQAGKSPNA VRYHGGDEII LQGFHWNVVR EAPNDWYNIL
RQQAATIAAD GFSAIWMPVP WRDFSSWSDG SKSGGGEGYF WHDFNKNGRY GSDAQLRQAA
SALGGAGVKV LYDVVPNHMN RGYPDKEINL PAGQGFWRND CADPGNYPND CDDGDRFIGG
DADLNTGHPQ VYGMFRDEFT NLRSQYGAGG FRFDFVRGYA PERVNSWMTD SADNSFCVGE
LWKGPSEYPN WDWRNTASWQ QIIKDWSRA KCPVFDFFALK ERMQNGSIAD WKHGLNGNPD
PRWREVAVTF VDNHDTGYSP GQNGGQHHWA LQDGLIRQAY AYILTSPGTP VVYWSHMYDW
GYGDFIRQLI QVRRRAAGVRA DSAISFHSGY SGLVATVSGS QTLVVALNS DLGNPGQVAS
GSFSEAVNAS NGQVRVWRSGTGSGGGEPGA LVSVSFRCDN GATQMGDSVY AVGNVSQLGN
WSPAAALRLT DTSYPTWKG SIALPAGQNE EWKCLIRNEA NATQVRQWQG GANNSLTPSE
GATTVGRL
    
```

SEQ ID NO: 12

Gen de amilasa formadora de maltotetraosa (amyP) de *P. stutzeri*, cds completo, n.º de registro de GenBank M24516.

```

1 gatcggcctt tacggaagt gatagagctt ctcttcggc aaactttggt cccagtgac
61 agagggtag tatcggatcg ctctctctt gggtttgta gatcaggagc gccgagagca
121 ggatgaaatc ctgcgccag aaggctcgc cgaagatgtg gaactgctgc tggccgagat
181 ccggccggcg ttcctcctcg tccggcggcc ttgccgccag ctaccccaac aagcacaaga
241 accggagtat tgcgatgagc cacatcctgc gagccgctt attggcggcg atgctgttc
301 cgttgccgtc catggccgat caggccggca agagcccaa cgtgtgctgc taccacggcg
361 gcgacgaaat cattctccag ggctttcact ggaacgtcgt ccgcaagcg cccaacgact
421 ggtacaacat cctgcgccag caggccgcga ccatcgcgc cgacggcttc tcggcgatct
481 ggatgccggg gccctggcgc gacttctcca gctggagcga cggcagcaag tccggcggcg
541 gtgaaggcta cttctggcac gacttcaaca agaacggccg ctatggcagt gacgccagc
601 tgcgtcaggc cgccagcgc ctccgtggcg ccggcgtgaa agtgccttac gacgtggtc
661 ccaaccacat gaaccgtggc tatccggaca aggagatcaa cctccggcc gccagggct
721 tctggcgcaa cgactgcgcc gaccgggca actacccaa tgatgcgac gacggcgacc
781 gcttcatcgg cggcgatgcg gacctcaaca ccggccacc gcaggtctac ggcattgtcc
841 gcgatgaatt caccaacctg cgcagtcagt acgggtccgg cggcttcgc ttgactttg
901 ttcggggcta tgcgccggag cgggtcaaca gctggatgac cgatagcgc gacaacagct
961 tctgctcgg cgaactgtgg aaaggcccct ctgagtacc gaactgggac tggcgcaaca
1021 ccgccagctg gcagcagatc atcaaggact ggtccgacc ggccaagtgc ccggtgttcg
1081 acttcgccct caaggaacgc atgcagaacg ctcgatcgc gactggaagc acgcctgaac
1141 ggcaatcccg acccgcgtgg cgcgaggtgg cgggtgacct cgtcgacaac caccgacccg
1201 gctactcgc cgggcagaac ggtgggcagc accactggg tctgcaggac gggctgatcc
1261 gccaggccta cgcctacatc ctaccagcc ccggtagcgc ggtggtgtac tggctgcaca
1321 tgtacgactg gggttacggc gacttcatcc gtcagctgat ccagggtcgt cgcgccccg
1381 gcgtgcgcgc cgattcggcg atcagcttcc acagcggcta cagcggctc gtcgccaccg
1441 tcagcggcag ccagcagacc ctgggtggtg cgctcaactc cgacctggg aatcccggcc
1501 aggtggccag cggcagcttc agcagggcg tcaacgccag caacggccag gtgcgcgtgt
1561 ggcgtagcgg cacggcagc ggtggcgtg aaccggcgc tctggctagt gtgagttcc
1621 gctgcgacaa cggcgcgacg cagatgggcg acagcgtcta cgcggtcgg aacgtcagcc
1681 agctcggtaa ctggagcccg gcccgggcgt tgcgctgac cgacaccagc ggctaccga
1741 cctggaaggg cagcattgcc ttgcctgcc gccagaacga ggaatggaaa tgcctgatcc
1801 gcaacgaggc caacgccacc cagggtcggc aatggcaggg cggggcaaac aacagcctga
1861 cgccgagcga gggcggccacc accgtcggcc ggctctagcc cggcggcaa ctcggccgtc
1921 tcgcgatgt gaggcggctg gtctcggcgg cggtatcgtt gcgctgggg cggggccgcc
1981 gttcacgcgc cctgctatcg ctagtcttc gcgctccgc catcggccag ttgccagcga
2041 atgcctcgc ctccggcctg gtgcaggtcg tcgagcagc ct
    
```

5 SEQ ID NO:13

Secuencia de pSac-pMD229; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 17 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

pSac-pMD229 comprende las mutaciones N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, H272Q, G303E, **H307L**, A309P, S334P con relación a la exoamilasa no maltogénica de tipo salvaje.

10

```

MDQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVWPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNRGYSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVFNHMNRFPDKEINLPAGQ
RFWRNDCPDGNGPNDCCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRDFVRYAP
ERVDSWMSDSADSSFCVWELWKEPSEYPPWDWRNTASWQQIIKDWSDRACKPVFDFALKERMQNGSV
ADWKQGLNGNPDPRWREAVTFVDNHDGTGSPGQNEGQHLWPLQDGLIRQAYAYILTSFGTPVYVWP
HMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSYSGSLVATVSGSQQLVVALNSDLANPGQVASGS
FSEAVNASNGQVRVWRSRSGDGGNDGG-
    
```

SEQ ID NO: 14

Secuencia de pSac-pMD229; secuencia de nucleótidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 17 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 atggatcagg ccggaagag cccggccggg gtgcgtacc acggcggcga
cgaaatcatc
61 ctccagggct tccactggaa cgtcgtccgc gaagcgcctt acaactggta
caacatcctc
121 cgccaacagg cctcgacgat cgcgccgac ggcttctcgg caatctggat
gccagtgcc
181 tggcgtgact tctccagctg gaccgacggc ggcaagtccg gcggcggcga
aggctacttc
241 tggcagcact tcaacaagaa cggccgctac ggcagcgacg cccagctgcg
ccaggccgcc
301 ggcgcactcg gtggcgccgg ggtgaagggtg ctctacgatg tggtgcccaa
tcacatgaac
361 cgcttctacc cggacaagga gatcaacctg cggcccgcc agcgcttctg
gcgcaacgac
421 tgcccggatc cgggcaacgg cccaacgac tgcgacgacg gtgaccgctt
cctgggcgcc
481 gaggcgacc tgaacaccgg ccatccgacg atttacggca tgtttcgcga
cgagtttacc
541 aacctgcgca gcggtacgg cgccggcgcc ttccgcttcg acttcgctc
cggtatgag
601 cccgagcggg tcgacagctg gatgagcgc agcgcgcgaca gcagcttctg
cgttgccgag
661 ctgtggaag agccttctga atatccgccc tgggactggc gcaacacggc
gagctggcag
721 cagatcatca aggactggtc cgaccgggcc aagtgcccg tgttcgactt
cgctctcaag
781 gagcgcagc agaacggctc ggtcgccgac tgggaagcagg gcctcaatgg
caacccgac
841 ccgcgctggc gcgaggtggc ggtgacctc gtcgacaacc acgacaccgg
ctattcgccc
901 gggcagaacg aaggccagca cctgtggccg ctgcaggacg ggctgatccg
ccaggcctac
961 gcctacatcc tcaccagccc gggcacgccc gtggtgtact ggccgcacat
gtacgactgg
1021 ggctacggcg acttcatccg ccagctgatc caggtgcggc gcaccgcccg
cgtgcgcgcc
1081 gattcggcga tcagcttcca tagcggctac agcggctctg tcgctaccgt
cagcggcagc
1141 cagcagaccc tggtggtggc gctcaactcc gatctggcca acccggcca
ggttgccagc
1201 ggcagcttca gcgaggcggc caacgccagc aacggccagg tgcgcgtctg
gcgcagcggc
1261 agcggcgatg gcggcgggaa tgacggcggc tga

```

5 SEQ ID NO: 15

Secuencia de pSac-pMD248; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 16 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

```

MDQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPRDFSSW
TDGKSGGGEGYFWHDFNKNRGYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPHMNRFPDKEINLPAGQ
RFWRNDPDPDGPNDGDRFLGGESDLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRYGYP
ERVDSWMSADSDFCVGELWKEPSEYPPWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFALKERMONGSV
ADWKQGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDGTGSPQNEGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPVYWP
HMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSYGSLVATVSGSQQLVVALNSDLANPGQVASGS
FSEAVNASNGQVRVWRSRSGDGGGNDGG

```

SEQ ID NO: 16

Secuencia de pSac-pMD248; Secuencia de nucleótidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 16 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 atggatcagg ccggcaagag cccggccggg gtgcgctacc acggcggcga cgaaatcatc
61 ctccagggct tccactggaa cgtcgtccgc gaagcgccct acaactggta caacatcctc
121 cgccaacagg cctcgacgat cgcggccgac ggcttctcgg caatctggat gccagtgcc
181 tggcgtgact tctccagctg gaccgacggc ggcaagtccg gcggcggcga aggctacttc
241 tggcacgact tcaacaagaa cggccgctac ggcagcgacg cccagctgcg ccaggccgcc
301 ggcgactcg gtggcgccgg ggtgaagggt ctctacgatg tggtgcccaa tcacatgaac
361 cgcttctacc cggacaagga gatcaacctg ccggccggcc agcgcttctg gcgcaacgac
421 tgcccggacc cgggagcggg ccccaacgac tgcgacgacg gtgaccgctt cctgggaggc
481 gagtcggacc tgaacaccgg ccatccgcag atttacggca tgtttcgcca cgagtttacc
541 aacctgcgca gcggctacgg cgcggcggc ttccgcttcg acttcgcttc cggtatgctg
601 cccgagcggg tcgacagctg gatgagcgac agcgcggaca gcagcttctg cgttggcgag
661 ctgtggaaag agccttctga atatccgccg tgggactggc gcaacacggc gagctggcag
721 cagatcatca aggactggtc cgaccgggcc aagtgcccgg tgttcgactt cgctctcaag
781 gagcgcgatc agaacggctc ggtcgccgac tgggaagcagg gcctcaatgg caaccccgac
841 ccgcgctggc gcgaggtggc ggtgaccttc gtcgacaacc acgacaccgg ctattcgcgc
901 gggcagaacg aaggccagca cctgtgggcg ctgcaggacg ggctgatccg ccaggccctac
961 gcctacatcc tcaccagccc gggcacgccc gtggtgtact ggccgcacat gtacgactgg
1021 ggctacggcg acttcatccg ccagctgatc caggtgcggc gcaccgcccg cgtgcgccc
1081 gattcggcga tcagcttcca tagcggctac agcggctctg tcgctaccgt cagcggcagc
1141 cagcagaccc tgggtggggc gctcaactcc gatctggcca accccggcca ggttgccagc
1201 ggcagcttca gcgagggcgt caacgccagc aacggccagg tgcgcgctct gcgcagcggg
1261 agcggcgatg gcggcgggaa tgacggcggc tga

```

5 SEQ ID NO: 17

Secuencia de pSac-pMD253; Secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 16 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

```

MDQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNI LRQQASTIAADGFS AIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGEGYFWHDFNKNRGYGS DAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRDYPDKEINLPAGQ
RFRNRDCPDGNGPND CDDGDRFLGGESDLNTGHPQI YGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGYAP
ERVDSWMSDSADSSFCV GELWKEPSEYPPWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFDFALKERMONGSV
ADWKQGLNGNPDPRWREVA VTFVDNHDTGYS PGQNEGQHLWPLQDGLIRQAYAYILTS PGTPVVYWP
HMYDWGYGDFIRQLIQV RRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQLVVALNSDLANPGQVASGS
FSEAVNASNGQVRVWRS GSGDGGGNDGG

```

SEQ ID NO: 18

Secuencia de pSac-pMD253; Secuencia de nucleótidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 16 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 atggatcagg ccggaagag cccggccggg gtgcgctacc acggcggcga cgaatcctc
61 ctccagggct tccactggaa cgtcgtccgc gaagcgccct acaactggta caacatcctc
121 cgccaacagg cctcgacgat cgcggccgac ggcttctcgg caatctggat gccagtgcc
181 tggcgtgact tctccagctg gaccgacggc ggcaagtccg gcggcggcga aggctacttc
241 tggcacgact tcaacaagaa cggccgctac ggcagcgacg cccagctgcg ccaggccgcc
301 ggcgactcgt gtggcgccgg ggtgaaggtg ctctacgatg tggtgcccaa tcacatgaac
361 cgcgactacc cggacaagga gatcaacctg cggccgggcc agcgcttctg gcgcaacgac
421 tgcccggacc cgggcaacgg cccaacgac tgcgacgacg gtgaccgctt cctgggcccgc
481 gagtcggacc tgaacaccgg ccatccgcag atttacggca tgtttcgcga cgagtttacc
541 aacctgcgca ggcgctacgg cgcggccggc ttccgcttcg acttcgctcg cggctatgcg
601 cccgagcggg tcgacagctg gatgagcgac agcgcgcaca gcagcttctg cgttggcgag
661 ctgtggaaag agccttctga atatccgccg tgggactggc gcaacacggc gagctggcag
721 cagatcatca aggactggtc cgaccgggcc aagtgcccgg tgttcgactt cgctctcaag
781 gagcgcgatc agaacggctc ggtcgcgac tgggaagcagg gcctcaatgg caaccccgcac
841 ccgcgctggc gcgaggtggc ggtgaccttc gtcgacaacc acgacaccgg ctattcgccc
901 gggcagaacg aaggccagca cctgtggccg ctgcaggacg ggctgatccg ccaggcctac
961 gcctacatcc tcaccagccc gggcacgccc gtggtgtact ggccgcacat gtacgactgg
1021 ggctacggcg acttcatccg ccagctgatc caggtgcggc gcaccgcccg cgtgcccgcg
1081 gattcggcga tcagcttcca tagcggctac agcggctctg tgcctaccgt cagcggcagc
1141 cagcagacc tggtggtggc gctcaactcc gatctggcca acccggcca ggttgccagc
1201 ggcagcttca gcgagggcgt caacgccagc aacggccagg tgcgctctg gcgagcggg
1261 agcggcgatg gcggcgggaa tgacggcggc tga

```

5 SEQ ID NO: 19

Secuencia de pSac-pMD271; Secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 18 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

```

MDQSGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPRDFSSW
TDGDKSGGEGYFWHDFNKNRGYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVFNHMNRDYPDKEINLPAGQ
RFWRNDPCDPNGPNDCCDGRFLGGESDLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRDFVIRGYAP
ERVDSWMSDSADSSFCVWELWKEPSEYPPWDWRNTASWQQI IKDWSDRACKPVDFALKERMONGSV
ADWKQGLNGNPDPRWREAVTFVDNHDGTGYS PGQNEGQHLWPLQDGLIRQAYAYILTSPGTPVYWP
HMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSYGLVATVSGSQTLVVALNSDLANPGQVASGS
FSEAVNASNGQVRVWRSRSGDGGGNDGG

```

SEQ ID NO: 20

10 Secuencia de pSac-pMD271; Secuencia de nucleótidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 18 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 atggatcaga gcggaagag cccggccggg gtgcgctacc acggcggcga cgaatcctc
61 ctccagggct tccactggaa cgtcgtccgc gaagcgccct acaactggta caacatcctc
121 cgccaacagg cctcgacgat cgcggccgac ggcttctcgg caatctggat gccagtgcc
181 tggcgtgact tctccagctg gaccgacggc gacaagtccg gcggcggcga aggctacttc

```

```

241 tggcactgact tcaacaagaa cggccgctac ggcagcgacg cccagctgcg ccaggccgoc
301 ggcgcactcg gtggcgccgg ggtgaagggtg ctctacgatg tggtgcccaa tcacatgaac
361 cgcgactacc cggacaagga gatcaacctg ccggccggcc agcgcttctg gcgcaacgac
421 tgcccggacc cgggcaacgg ccccaacgac tgcgacgacg gtgaccgctt cctggggcggc
481 gagtcggacc tgaacaccgg ccatccgcag atttacggca tgtttcgcca cgagtttacc
541 aacctgcgca gcggtacgg cgccggcgcc ttccgcttcg acttcgctcg cggctatgog
601 cccgagcggg tcgacagctg gatgagcgac agcgccgaca gcagcttctg cgttggcgag
661 ctgtggaag agccttctga atatccggcc tgggactggc gcaacacggc gagctggcag
721 cagatcatca aggactggtc cgaccgggcc aagtgcccgg tgttcgactt cgctctcaag
781 gagcgcatgc agaacggctc ggtcgcggac tggaaagcagg gcctcaatgg caaccccgac
841 ccgctgctggc gcgaggtggc ggtgaccttc gtcgacaacc acgacaccgg ctattcgccc
901 gggcagaacg aaggccagca cctgtggccg ctgcaggacg ggctgatccg ccaggcctac
961 gcctacatcc tcaccagccc gggcagcggc gtggtgtact ggccgcacat gtacgactgg
1021 ggctacggcg acttcatccg ccagctgatc cagggtcgggc gcaccgcccg cgtgcccggc
1081 gattcggcga tcagcttcca tagcggctac agcggctctg tcgctaccgt cagcggcagc
1141 cagcagaccc tgggtggtggc gctcaactcc gatctggcca acccggcca ggttgccagc
1201 ggcagcttca gcgagcggt caacgccagc aacggccagg tgcgctctg gcgagcggg
1261 agcggcgatg gcggcgga tgacggcgcc tga

```

SEQ ID NO: 21

Secuencia de pSac-pMS382; Secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 16 sustituciones (incluyendo 307K) y la delección del dominio de unión al almidón.

```

MDQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGDKSGGGEGYFWHDFNKNRGYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPHMNRFPDKEINLPAGQ
RFWRNDCPDGNGPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFNLRSGYGAGGFRFDFVRGYAP
ERVDSWMSDSADSSFCVWELWKEPSEYPPWDRNTASWQQIKDWSDRAKCPVDFDFALKERMQNGSV
ADWKHGLNGNPDPRWREAVTFVDNHDGTGYSFGQNGGQHKWPLQDGLIRQAYAYILTSPGTPVVYWP
HMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSYSGLVATVSGSQQLTVVALNSDLANPGQVASGS
FSEAVNASNGQVRVWRSRSGSDGGGNDGG-

```

5

SEQ ID NO: 22

Secuencia de pSac-pMS382; Secuencia de nucleótido de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 16 sustituciones (incluyendo 307K) y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 gatcaagcag gaaaaagccc ggcaggcgctc agatatcatg gcggcgatga aatcatcctt
61 cagggctttc attggaacgt cgtcagagaa ggcgccgtata actggtataa catcctgaga
121 caacaagcga gcacaattgc cgctgatggc ttttccgcaa tctggatgcc ggttccgtgg
181 agagatttta gcagctggac ggatggagat aaaagcggag gcggcgaagg atatttttgg
241 catgacttta acaaaaacgg ccgctatgga agcagtgctc aactgagaca agcagcagga
301 gcacttgag gagcaggagt caaagtcctg tacgatgtcg tcccgaacca tatgaaccgc
361 ttttatccgg acaaaagaaat caatctgccg gcaggccaaa gattttggag aaacgattgc
421 ccggaccggg gaaatggacc gaatgattgc gatgatggcg atagatttct gggcggcgaa
481 gcggatctga atacaggcca tccgcaaatc tatggcatgt ttcgggacga atttacgaat
541 ctgagaagcg gatatggagc gggcggattt cgctttgatt ttgtcagagg ctatgccccg
601 gaaagagttg atagctggat gagcgattca gcggatagca gcttttgctg cggcgaactt
661 tggaaagaac cgagcgaata tccgccgtgg gattggagaa atacagcgag ctggcagcag
721 atcatcaaa attggagcga tagagcaaaa tgcccggctt ttgactttgc cctgaaagaa
781 cgcatgcaaa atggaagcgt cgccgattgg aaacatggcc tgaacggaaa tccggaccgg
841 agatggagag aagtcgccgt cacgtttgtc gataaccatg acacaggata tagcccggga
901 caaaatggag gacaacataa atggccgctt caagatggcc ttatcagaca ggcgtatgcc
961 tatatcctta catcaccggg aacaccgggt gtttattggc cgcatatgta tgattggggc
1021 tatggcgatt tcattccgca actgatccag gttagaagaa cagcaggagt cagagcggat
1081 agcggcatta gccttcatag cggctatagc ggacttgtcg ctacagttag cggcagccaa
1141 caaacactgg tcgtcgccct gaatagcgat ctggcaaatc cgggacaagt tgctagcggc
1201 agcttttagc aagcagtcaa tgccagcaat ggccaagtca gactctggag aagcgggaagc
1261 ggagatggag gaggaaatga cggaggataa

```

10

SEQ ID NO: 23

Secuencia de pSac-pMS382R; Secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 16 sustituciones (incluyendo 307R) y la delección del dominio de unión al almidón.

MDQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
 TDGDKSGGGEGYFWHDFNKNRGYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVFNHMRNFYPDKEINLPAGQ
 RFWRNDPCDPGNGPNDCCDDGRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRYGAP
 ERVDSWMSDSADSSFCVWELWKEPSEYPPWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVDFDFALKERMQNGSV
 ADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDGTGYS PGQNGGQHWRWPLQDGLIRQAYAYILTS PGTPVVYWP
 HMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSYSGLVATVSGSQOTLVVALNSDLANPGQVASGS
 FSEAVNASNGQVRVWRS GSGDGGGNDGG-

5 SEQ ID NO: 24

Secuencia de pSac-pMS382R; Secuencia de nucleótido de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 16 sustituciones (incluyendo 307R) y la delección del dominio de unión al almidón.

1 gatcaagcag gaaaaagccc ggcaggcgtc agatatcatg gcggcgatga aatcatcctt
 61 cagggtcttc attggaacgt cgctcagagaa gcgccgtata actggtataa catcctgaga
 121 caacaagcga gcacaattgc cgctgatggc ttttccgcaa tctggatgcc ggttccgtgg
 181 agagatttta gcagctggac ggatggagat aaaagcggag gcggcgaagg atatttttgg
 241 catgacttta acaaaaacgg ccgctatgga agcgtatgct aactgagaca agcagcagga
 301 gcacttgagg gagcaggagt caaagtctctg tacgatgtcg tcccgaacca tatgaaccgc
 361 ttttatccgg acaaaagaaat caatctgccg gcaggccaaa gattttggag aaacgattgc
 421 ccggaccggg gaaatggacc gaatgattgc gatgatggcg atagatttct gggcggcga
 481 gcggatctga atacaggcca tccgcaaatc tatggcatgt ttcgggacga atttacgaat
 541 ctgagaagcg gatatggagc gggcggattt cgctttgatt ttgtcagagg ctatgccccg
 601 gaaagagttg atagctggat gagcagattca gcggatagca gcttttgctt cggcgaactt
 661 tgaaagaac cgagcgaata tccgcctggg gattggagaa atacagcagag ctggcagcag
 721 atcatcaaa attggagcga tagagcaaaa tgcccgtctc ttgactttgc ctgaaagaa
 781 cgcatgcaaa atggaagcgt cgccgattgg aaacatggcc tgaacggaaa tccggaccgg
 841 agatggagag aagtcgccgt cacgtttgtc gataaccatg acacaggata tagcccgga
 901 caaaatggag gacaacatcg ttggccgctt caagatggcc ttatcagaca ggcgatgccc
 961 tatatcctta catcaccggg aacaccggtt gtttattggc cgcataatgta tgattggggc
 1021 tatggcgatt tcatccgcca actgatccag gttagaagaa cagcaggagt cagagcggat
 1081 agcgccatta gctttcatag cggctatagc ggacttgtcg ctacagttag cggcagccaa
 1141 caaacactgg tcgtcgccct gaatagcgat ctggcaaatc cgggacaagt tgctagcggc
 1201 agcttttagc aagcagtcaa tgccagcaat ggccaagtca gagtctggag aagcggaaagc
 1261 ggagatggag gaggaaatga cggaggataa

SEQ ID NO: 25

10 Secuencia de pSac-pMS382H; Secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 15 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón

MDQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
 TDGDKSGGGEGYFWHDFNKNRGYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVFNHMRNFYPDKEINLPAGQ
 RFWRNDPCDPGNGPNDCCDDGRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRYGAP
 ERVDSWMSDSADSSFCVWELWKEPSEYPPWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVDFDFALKERMQNGSV
 ADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDGTGYS PGQNGGQHWRWPLQDGLIRQAYAYILTS PGTPVVYWP
 HMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSYSGLVATVSGSQOTLVVALNSDLANPGQVASGS
 FSEAVNASNGQVRVWRS GSGDGGGNDGG-

SEQ ID NO: 26

Secuencia de pSac-pMS382H; Secuencia de nucleótido de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 15 sustituciones y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 gatcaagcag gaaaaagccc ggcagggcgtc agatatcatg gcggcgatga aatcatcott
61 cagggccttc attggaacgt cgtcagagaa gcgccgtata actggtataa catcctgaga
121 caacaagcga gcacaattgc cgctgatggc ttttccgcaa tctggatgcc ggttccgtgg
181 agagatttta gcagctggac ggatggagat aaaagcggag gcggcgaagg atatttttgg
241 catgacttta acaaaaacgg ccgctatgga agcgatgctc aactgagaca agcagcagga
301 gcacttgag gagcaggagt caaagtcctg tacgatgctg tcccgaacca tatgaaccgc
361 ttttatccgg acaaaagaaat caatctgccg gcaggccaaa gattttggag aaacgattgc
421 ccggaccggg gaaatggacc gaatgattgc gatgatggcg atagatttct gggcggcgaa
481 gcggatctga atacaggcca tccgcaaatc tatggcatgt ttcgggacga atttacgaat
541 ctgagaagcg gatatggagc gggcggattt cgctttgatt ttgtcagagg ctatgccccg
601 gaaagagttg atagctggat gagcgaattca gcggatagca gcttttgcgt cggcgaactt
661 tggaaagaac cgagcgaata tccgccgtgg gattggagaa atacagcgag ctggcagcag
721 atcatcaaa attggagcga tagagcaaaa tgcccgggtct ttgactttgc cctgaaagaa
781 cgcatgcaaa atggaagcgt cgccgattgg aaacatggcc tgaacgaaa tccggaccgg
841 agatggagag aagtcgccgt cacgtttgtc gataaccatg acacaggata tagcccggga
901 caaatggag gacaacatca ctggccgctt caagatggcc ttatcagaca ggcgatgcc
961 tatatcctta catcaccggg aacaccggtt gtttattggc cgcatatgta tgattggggc
1021 tatggcgatt tcatccgcca actgatccag gttagaagaa cagcaggagt cagagcggat
1081 agcgcatta gctttcatag cggctatagc ggacttgtcg ctacagttag cggcagccaa
1141 caaacactgg tcgtcgccct gaatagcgat ctggcaaatc cgggacaagt tgctagcggc
1201 agcttttagc aagcagtcaa tgccagcaat ggccaagtca gagtctggag aagcgggaagc
1261 ggagatggag gaggaaatga cggaggataa

```

5 SEQ ID NO: 27

Secuencia de SSM471 B10; Secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con sustitución L307R y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYNWYNILR QQASTIAADG
51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGG KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDFVIRGYAP
201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ I IKDWSDRAK
251 CPVFDALKE RMQNGSVADW KQGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNEGQHRWPL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401 SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*

```

SEQ ID NO: 28

Secuencia de SSM471 B10; Secuencia de ácido nucleico de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con sustitución L307R y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 gatcaagcag gaaaaagccc ggcaggcgtc agatatcatg gcggcgatga aatcatcctt
61 cagggccttc attggaacgt cgtcagagaa gcgccgtata actggtataa catcctgaga
121 caacaagcga gcacaattgc cgctgatggc ttttccgcaa tctggatgcc ggttccgtgg
181 agagatttta gcaçtggac ggatggaggc aaaagcggag gcggcgaagg atatttttgg
241 catgacttta acaaaaacgg ccgctatgga agcgatgctc aactgagaca agcagcagga
301 gcacttggag gagcaggagt caaagtcctg tacgatgtcg tcccgaacca tatgaaccgc
361 ttttatccgg acaaaagaaat caatctgccg gcaggccaaa gattttggag aaacgattgc
421 ccggaccggg gaaatggacc gaatgattgc gatgatggcg atagatttct gggcggcgaa
481 gcggatctga atacaggcca tccgcaaatc tatggcatgt ttcgggacga atttacgaat
541 ctgagaagcg gatatggagc gggcggattt cgctttgatt ttgtcagagg ctatgccccg
601 gaaagagttg atagctggat gagcgattca gcgcatagca gcttttgcgt cggcgaactt
661 tggaaagaac cgagcgaata tccgccgtgg gattggagaa atacagcgag ctggcagcag
721 atcatcaaa attggagcga tagagcaaaa tgcccgttct ttgactttgc cctgaaagaa
781 cgcatgcaaa atggaagcgt cgccgattgg aaacaaggcc tgaacgaaa tccggaccgg
841 agatggagag aagtcgcccgt cacgtttgtc gataacatg acacaggata tagcccggga
901 caaaatgaag gacaacatcg gtggccgctt caagatggcc ttatcagaca ggcgatgccc
961 tatacctta catcacgggg aacaccggtt gtttattggc cgcatatgta tgattggggc
1021 tatggcgatt tcattcccca actgatccag gttagaagaa cagcaggagt cagagcggat
1081 agcgccatta gctttcatag cggctatagc ggacttgtcg ctacagttag cggcagccaa
1141 caaacactgg tcgtcgccct gaatagcgat ctggcaaatc cgggacaagt tgctagcggc
1201 agcttttagc aagcagtcaa tgccagcaat ggccaagtca gagtctggag aagcggaagc
1261 ggagatggag gaggaaatga cggaggataa

```

5 SEQ ID NO: 29

Secuencia de SSM471 C04; Secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con sustitución L307K y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG
51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGG KSGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101 ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYDPKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDVFRGYAP
201 ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ I IKDWSDRAK
251 CPVDFDALKE RMQNGSVADW KQGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNEGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPTGPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351 VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401 SFSEAVNASN GQVRVWRS GS GDGGNDGG*

```

SEQ ID NO: 30

10 Secuencia de SSM471 C04; Secuencia de ácido nucleico de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con sustitución L307K y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 gatcaagcag gaaaaagccc ggcaggcgtc agatatcatg gcggcgatga aatcatcctt

```

ES 2 644 745 T3

```

61 cagggccttc attggaacgt cgtcagagaa gcgccgtata actggtataa catcctgaga
121 caacaagcga gcacaattgc cgctgatggc ttttccgcaa tctggatgcc ggttccgtgg
181 agagatttta gcagctggac ggatggaggc aaaagcggag gcggcgaagg atatttttgg
241 catgacttta acaaaaacgg ccgctatgga agcgatgctc aactgagaca agcagcagga
301 gcacttgag gagcaggagt caaagtccctg tacgatgtcg tcccgaacca tatgaaccgc
361 ttttatccgg acaaagaaat caatctgccg gcaggccaaa gattttggag aaacgattgc
421 cgggaccccg gaaatggacc gaatgattgc gatgatggcg atagatttct gggcggcgaa
481 gcggatctga atacaggcca tccgcaaadc tatggcatgt ttcgggacga atttacgaat
541 ctgagaagcg gatatggagc gggcggattt cgctttgatt ttgtcagagg ctatgccccg
601 gaaagagttg atagctggat gagcgattca gcggatagca gcttttgcgt cggcgaactt
661 tggaaaagac cgagcgaata tccgccgtgg gattggagaa atacagcgag ctggcagcag
721 atcatcaaag attggagcga tagagcaaaa tgcccgttct ttgactttgc cctgaaagaa
781 cgcatgcaaa atggaagcgt cgccgattgg aaacaaggcc tgaacggaaa tccggacccg
841 agatggagag aagtcgccgt cacgtttgtc gataacatg acacaggata tagcccgga
901 caaatgaag gacaacataa gtggccgctt caagatggcc ttatcagaca ggcgatgccc
961 tatatcctta catcaccggg aacaccggtt gtttattggc cgcatatgta tgattggggc
1021 tatggcgatt tcatccgcca actgatccag gttagaagaa cagcaggagt cagagcggat
1081 agcgccatta gctttcatag cggctatagc ggacttgtcg ctacagttag cggcagccaa
1141 caaacactgg tcgtcgccct gaatagcgat ctggcaaadc cgggacaagt tgctagcggc
1201 agctttagcg aagcaatcaa tgccagcaat ggccaagta gactctggag aagcgggaagc
1261 ggagatggag gaggaaatga cggaggataa

```

SEQ ID NO: 31

Secuencia de PMS 370; Secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con sustitución L307H y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG
51 FSAIWMPVPW RDFSSWTDGG KSGGGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101 ALGGAGVKVL YDVPNHNMR FYDPKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151 DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSYGAGGF RFDVVRGYAP
201 ERVDSWMSDS ADSSFCVDEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK
251 CPVDFDALKE RMQNGSVADW KQGLNNGPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNEGQHHWPL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351 VRRTAGVRAD SAISFHSYYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
5 401 SFSEAVNASN GQVRVWRSVS GDGGGNDGG*

```

SEQ ID NO: 32

Secuencia de PMS 370; Secuencia de ácido nucleico de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con sustitución L307H y la delección del dominio de unión al almidón.

```

1 gatcaagcag gaaaaagccc ggcaggcgtc agatatcatg gcggcgatga aatcatcctt
61 cagggccttc attggaacgt cgtcagagaa gcgccgtata actggtataa catcctgaga
121 caacaagcga gcacaattgc cgctgatggc ttttccgcaa tctggatgcc ggttccgtgg
181 agagatttta gcagctggac ggatggaggc aaaagcggag gcggcgaagg atatttttgg
241 catgacttta acaaaaacgg ccgctatgga agcgatgctc aactgagaca agcagcagga
301 gcacttgag gagcaggagt caaagtccctg tacgatgtcg tcccgaacca tatgaaccgc
361 ttttatccgg acaaagaaat caatctgccg gcaggccaaa gattttggag aaacgattgc
421 cgggaccccg gaaatggacc gaatgattgc gatgatggcg atagatttct gggcggcgaa
481 gcggatctga atacaggcca tccgcaaadc tatggcatgt ttcgggacga atttacgaat
541 ctgagaagcg gatatggagc gggcggattt cgctttgatt ttgtcagagg ctatgccccg
601 gaaagagttg atagctggat gagcgattca gcggatagca gcttttgcgt cggcgaactt

```

661 tggaaagaac cgagcgaata tccgccgtgg gattggagaa atacagcgag ctggcagcag
 721 atcatcaaag attggagcga tagagcaaaa tgcccgtct ttgactttgc cctgaaagaa
 781 cgcatgcaaa atggaagcgt cgccgattgg aaacaaggcc tgaacggaaa tccggacccg
 841 agatggagag aagtcgccgt cacgtttgtc gataacatg acacaggata tagcccggga
 901 caaaatgaag gacaacatca ttggccgctt caagatggcc ttatcagaca gccgatgccc
 961 tatatcctta catcaccggg aacaccggtt gtttattggc cgcatatgta tgattggggc
 1021 tatggcgatt tcatccgcca actgatccag gttagaagaa cagcaggagt cagagcggat
 1081 agcggcatta gctttcatag cggctatagc ggacttgtcg ctacagttag cggcagccaa
 1141 caaacactgg tcgtgcacct gaatagcgt ctggcaaatc cgggacaagt tgtagcggc
 1201 agcttttagc aagcagtcaa tgccagcaat ggccaagtca gagtctggag aagcggaaagc
 1261 ggagatggag gaggaaatga cggaggataa

ANEXO A

1 Mutación

33Y; 34N; 70D; 121F; 134R; 141P; 146G; 157L; 161A; 178F; 179T; 223E; 229P; 309P; 334P.

5 2 Mutaciones

33Y 34N; 33Y 70D; 33Y 121F; 33Y 134R; 33Y 141P; 33Y 146G; 33Y 157L; 33Y 161A; 33Y 178F; 33Y 179T; 33Y 223E; 33Y 229P; 33Y 309P; 33Y 334P; 34N 70D; 34N 121F; 34N 134R; 34N 141P; 34N 146G; 34N 157L; 34N 161A; 34N 178F; 34N 179T; 34N 223E; 34N 229P; 34N 309P; 34N 334P; 70D 121F; 70D 134R; 70D 141P; 70D 146G; 70D 157L; 70D 161A; 70D 178F; 70D 179T; 70D 223E; 70D 229P; 70D 309P; 70D 334P; 121F 134R; 121F 141P; 121F 146G; 121F 157L; 121F 161A; 121F 178F; 121F 179T; 121F 223E; 121F 229P; 121F 309P; 121F 334P; 134R 141P; 134R 146G; 134R 157L; 134R 161A; 134R 178F; 134R 179T; 134R 223E; 134R 229P; 134R 309P; 134R 334P; 141P 146G; 141P 157L; 141P 161A; 141P 178F; 141P 179T; 141P 223E; 141P 229P; 141P 309P; 141P 334P; 146G 157L; 146G 161A; 146G 178F; 146G 179T; 146G 223E; 146G 229P; 146G 309P; 146G 334P; 157L 161A; 157L 178F; 157L 179T; 157L 223E; 157L 229P; 157L 309P; 157L 334P; 161A 178F; 161A 179T; 161A 223E; 161A 229P; 161A 309P; 161A 334P; 178F 179T; 178F 223E; 178F 229P; 178F 309P; 178F 334P; 179T 223E; 179T 229P; 179T 309P; 179T 334P; 223E 229P; 223E 309P; 223E 334P; 229P 309P; 229P 334P; 309P 334P.

3 Mutaciones

33Y 34N 70D; 33Y 34N 121F; 33Y 34N 134R; 33Y 34N 141P; 33Y 34N 146G; 33Y 34N 157L; 33Y 34N 161A; 33Y 34N 178F; 33Y 34N 179T; 33Y 34N 223E; 33Y 34N 229P; 33Y 34N 309P; 33Y 34N 334P; 33Y 70D 121F; 33Y 70D 134R; 33Y 70D 141P; 33Y 70D 146G; 33Y 70D 157L; 33Y 70D 161A; 33Y 70D 178F; 33Y 70D 179T; 33Y 70D 223E; 33Y 70D 229P; 33Y 70D 309P; 33Y 70D 334P; 33Y 121F 134R; 33Y 121F 141P; 33Y 121F 146G; 33Y 121F 157L; 33Y 121F 161A; 33Y 121F 178F; 33Y 121F 179T; 33Y 121F 223E; 33Y 121F 229P; 33Y 121F 309P; 33Y 121F 334P; 33Y 134R 141P; 33Y 134R 146G; 33Y 134R 157L; 33Y 134R 161A; 33Y 134R 178F; 33Y 134R 179T; 33Y 134R 223E; 33Y 134R 229P; 33Y 134R 309P; 33Y 134R 334P; 33Y 141P 146G; 33Y 141P 157L; 33Y 141P 161A; 33Y 141P 178F; 33Y 141P 179T; 33Y 141P 223E; 33Y 141P 229P; 33Y 141P 309P; 33Y 141P 334P; 33Y 146G 157L; 33Y 146G 161A; 33Y 146G 178F; 33Y 146G 179T; 33Y 146G 223E; 33Y 146G 229P; 33Y 146G 309P; 33Y 146G 334P; 33Y 157L 161A; 33Y 157L 178F; 33Y 157L 179T; 33Y 157L 223E; 33Y 157L 229P; 33Y 157L 309P; 33Y 157L 334P; 33Y 161A 178F; 33Y 161A 179T; 33Y 161A 223E; 33Y 161A 229P; 33Y 161A 309P; 33Y 161A 334P; 33Y 178F 179T; 33Y 178F 223E; 33Y 178F 229P; 33Y 178F 309P; 33Y 178F 334P; 33Y 179T 223E; 33Y 179T 229P; 33Y 179T 309P; 33Y 179T 334P; 33Y 223E 229P; 33Y 223E 309P; 33Y 223E 334P; 33Y 229P 309P; 33Y 229P 334P; 33Y 309P 334P; 34N 70D 121F; 34N 70D 134R; 34N 70D 141P; 34N 70D 146G; 34N 70D 157L; 34N 70D 161A; 34N 70D 178F; 34N 70D 179T; 34N 70D 223E; 34N 70D 229P; 34N 70D 309P; 34N 70D 334P; 34N 121F 134R; 34N 121F 141P; 34N 121F 146G; 34N 121F 157L; 34N 121F 161A; 34N 121F-178F; 34N 121F 179T; 34N 121F 223E; 34N 121F 229P; 34N 121F 309P; 34N 121F 334P; 34N 134R 141P; 34N 134R 146G; 34N 134R 157L; 34N 134R 161A; 34N 134R 178F; 34N 134R 179T; 34N 134R 223E; 34N 134R 229P; 34N 134R 309P; 34N 134R 334P; 34N 141P 146G; 34N 141P 157L; 34N 141P 161A; 34N 141P 178F; 34N 141P 179T; 34N 141P 223E; 34N 141P 229P; 34N 141P 309P; 34N 141P 334P; 34N 146G 157L; 34N 146G 161A; 34N 146G 178F; 34N 146G 179T; 34N 146G 223E; 34N 146G 229P; 34N 146G 309P; 34N 146G 334P; 34N 157L 161A; 34N 157L 178F; 34N 157L 179T; 34N 157L 223E; 34N 157L 229P; 34N 157L 309P; 34N 157L 334P; 34N 161A 178F; 34N-161A 179T; 34N 161A 223E; 34N 161A 229P; 34N 161A 309P; 34N 161A 334P; 34N 178F 179T; 34N 178F 223E; 34N 178F 229P; 34N 178F 309P; 34N 178F 334P; 34N 179T 223E; 34N 179T 229P; 34N 179T 309P; 34N 179T 334P; 34N 223E 229P; 34N 223E 309P; 34N 223E 334P; 34N 229P 309P; 34N 229P 334P; 34N 309P 334P; 70D 121F 134R; 70D 121F 141P; 70D 121F 146G; 70D 121F 157L; 70D 121F 161A; 70D 121F 178F; 70D 121F 179T; 70D 121F 223E; 70D 121F 229P; 70D 121F 309P; 70D 121F 334P; 70D 134R 141P; 70D 134R 146G; 70D 134R 157L; 70D 134R 161A; 70D 134R 178F; 70D 134R 179T; 70D 134R 223E; 70D 134R 229P; 70D 134R 309P; 70D 134R 334P; 70D 141P 146G; 70D 141P 157L; 70D 141P 161A; 70D 141P 178F; 70D 141P 179T; 70D 141P 223E; 70D 141P 229P; 70D 141P 309P; 70D 141P 334P; 70D 146G 157L; 70D 146G 161A; 70D 146G 178F; 70D 146G 179T; 70D 146G 223E; 70D 146G 229P; 70D 146G 309P; 70D 146G 334P; 70D 157L 161A; 70D 157L 178F; 70D 157L 179T; 70D 157L 223E; 70D 157L 229P; 70D 157L 309P; 70D 157L 334P; 70D 161A 178F; 70D 161A 179T;

ES 2 644 745 T3

179T 334P; 134R 157L 223E 229P; 134R 157L 223E 309P; 134R 157L 223E 334P; 134R 157L 229P 309P; 134R 157L 229P 334P; 134R 157L 309P 334P; 134R 161A 178F 179T; 134R 161A 178F 223E; 134R 161A 178F 229P; 134R 161A 178F 309P; 134R 161A 178F 334P; 134R 161A 179T 223E; 134R 161A 179T 229P; 134R 161A 179T 309P; 134R 161A 179T 334P; 134R 161A 223E 229P; 134R 161A 223E 309P; 134R 161A 223E 334P; 134R 161A 229P 309P; 134R 161A 229P 334P; 134R 161A 309P 334P; 134R 178F 179T 223E; 134R 178F 179T 229P; 134R 178F 179T 309P; 134R 178F 179T 334P; 134R 178F 223E 229P; 134R 178F 223E 309P; 134R 178F 223E 334P; 134R 179T 223E 229P; 134R 179T 223E 309P; 134R 179T 229P 309P; 134R 179T 229P 334P; 134R 179T 309P 334P; 134R 223E 229P 309P; 134R 223E 229P 334P; 134R 223E 309P 334P; 134R229P 309P 334P; 141P 146G 157L 161A; 141P 146G 157L 178F; 141P 146G 157L 179T; 141P 146G 157L 223E; 141P 146G 157L 229P; 141P 146G 157L 309P; 141P 146G 157L 334P; 141P 146G 161A 178F; 141P 146G 161A 179T; 141P 146G 161A 223E; 141P 146G 161A 229P; 141P 146G 161A 309P; 141P 146G 161A 334P; 141P 146G 178F 179T; 141P 146G 178F 223E; 141P 146G 178F 229P; 141P 146G 179T 223E; 141P 146G 179T 229P; 141P 146G 179T 309P; 141P 146G 223E 309P; 141P 146G 223E 334P; 141P 146G 229P 309P; 141P 146G 229P 334P; 141P 146G 309P 334P; 141P 157L 161A 178F; 141P 157L 161A 179T; 141P 157L 161A 223E; 141P 157L 161A 229P; 141P 157L 161A 309P; 141P 157L 161A 334P; 141P 157L 178F 179T; 141P 157L 178F 223E; 141P 157L 178F 229P; 141P 157L 178F 309P; 141P 157L 178F 334P; 141P 157L 179T 223E; 141P 157L 179T 229P; 141P 157L 179T 309P; 141P 157L 179T 334P; 141P 157L 223E 229P; 141P 157L 223E 309P; 141P 157L 223E 334P; 141P 157L 229P 309P; 141P 157L 229P 334P; 141P 157L 309P 334P; 141P 161A 178F 179T; 141P 161A 178F 223E; 141P 161A 178F 229P; 141P 161A 178F 309P; 141P 161A 178F 334P; 141P 161A 179T 223E; 141P 161A 179T 229P; 141P 161A 179T 309P; 141P 161A 179T 334P; 141P 161A 223E 229P; 141P 161A 223E 309P; 141P 161A 223E 334P; 141P 161A 229P 309P; 141P 161A 229P 334P; 141P 161A 309P 334P; 141P 178F 179T 223E; 141P 178F 179T 229P; 141P 178F 179T 309P; 141P 178F 179T 334P; 141P 178F 223E 229P; 141P 178F 223E 309P; 141P 178F 223E 334P; 141P 178F 229P 309P; 141P 178F 229P 334P; 141P 179T 223E 229P; 141P 179T 223E 309P; 141P 179T 223E 334P; 141P 179T 229P 309P; 141P 179T 229P 334P; 141P 223E 229P 309P; 141P 223E 229P 334P; 141P 223E 309P 334P; 146G 157L 161A 178F; 146G 157L 161A 179T; 146G 157L 161A 223E; 146G 157L 161A 229P; 146G 157L 161A 309P; 146G 157L 161A 334P; 146G 157L 178F 179T; 146G 157L 178F 223E; 146G 157L 178F 229P; 146G 157L 178F 309P; 146G 157L 178F 334P; 146G 157L 179T 223E; 146G 157L 179T 229P; 146G 157L 179T 309P; 146G 157L 179T 334P; 146G 157L 223E 229P; 146G 157L 223E 309P; 146G 157L 223E 334P; 146G 157L 229P 309P; 146G 157L 229P 334P; 146G 157L 309P 334P; 146G 161A 178F 179T; 146G 161A 178F 223E; 146G 161A 178F 229P; 146G 161A 178F 309P; 146G 161A 178F 334P; 146G 161A 179T 223E; 146G 161A 179T 229P; 146G 161A 179T 309P; 146G 161A 179T 334P; 146G 161A 223E 229P; 146G 161A 223E 309P; 146G 161A 223E 334P; 146G 161A 229P 309P; 146G 161A 229P 334P; 146G 161A 309P 334P; 146G 178F 179T 223E; 146G 178F 179T 229P; 146G 178F 179T 309P; 146G 178F 179T 334P; 146G 178F 223E 229P; 146G 178F 223E 309P; 146G 178F 223E 334P; 146G 178F 229P 309P; 146G 178F 229P 334P; 146G 179T 223E 229P; 146G 179T 223E 309P; 146G 179T 223E 334P; 146G 179T 229P 309P; 146G 179T 229P 334P; 146G 223E 229P 309P; 146G 223E 229P 334P; 146G 223E 309P 334P; 146G 229P 309P 334P; 157L 161A 178F 179T; 157L 161A 178F 223E; 157L 161A 178F 229P; 157L 161A 178F 309P; 157L 161A 178F 334P; 157L 161A 179T 223E; 157L 161A 179T 229P; 157L 161A 179T 309P; 157L 161A 179T 334P; 157L 161A 223E 229P; 157L 161A 223E 309P; 157L 161A 223E 334P; 157L 161A 229P 309P; 157L 161A 229P 334P; 157L 161A 309P 334P; 157L 178F 179T 223E; 157L 178F 179T 229P; 157L 178F 179T 309P; 157L 178F 179T 334P; 157L 178F 223E 229P; 157L 178F 223E 309P; 157L 178F 223E 334P; 157L 178F 229P 309P; 157L 178F 229P 334P; 157L 179T 223E 229P; 157L 179T 223E 309P; 157L 179T 223E 334P; 157L 179T 229P 309P; 157L 179T 229P 334P; 157L 223E 229P 309P; 157L 223E 229P 334P; 157L 223E 309P 334P; 157L 229P 309P 334P; 161A 178F 179T 223E; 161A 178F 179T 229P; 161A 178F 179T 309P; 161A 178F 179T 334P; 161A 178F 223E 229P; 161A 178F 223E 309P; 161A 178F 223E 334P; 161A 178F 229P 309P; 161A 178F 229P 334P; 161A 178F 309P 334P; 161A 179T 223E 229P; 161A 179T 223E 309P; 161A 179T 223E 334P; 161A 179T 229P 309P; 161A 179T 229P 334P; 161A 179T 309P 334P; 161A 223E 229P 309P; 161A 223E 229P 334P; 161A 223E 309P 334P; 161A 229P 309P 334P; 178F 179T 223E 229P; 178F 179T 223E 309P; 178F 179T 223E 334P; 178F 179T 229P 309P; 178F 179T 229P 334P; 178F 179T 309P 334P; 178F 223E 229P 309P; 178F 223E 229P 334P; 178F 223E 309P 334P; 178F 229P 309P 334P; 179T 223E 229P 309P; 179T 223E 229P 334P; 179T 223E 309P 334P; 179T 229P 309P 334P; 223E 229P 309P 334P.

5 Mutaciones

33Y 34N 70D 121F 134R; 33Y 34N 70D 121F 141P; 33Y 34N 70D 121F 146G; 33Y 34N 70D 121F 157L; 33Y 34N 70D 121F 161A; 33Y 34N 70D 121F 178F; 33Y 34N 70D 121F 179T; 33Y 34N 70D 121F 223E; 33Y 34N 70D 121F 229P; 33Y 34N 70D 121F 309P; 33Y 34N 70D 121F 334P; 33Y 34N 70D 134R 141P; 33Y 34N 70D 134R 146G; 33Y 34N 70D 134R 157L; 33Y 34N 70D 134R 161A; 33Y 34N 70D 134R 178F; 33Y 34N 70D 134R 179T; 33Y 34N 70D 134R 223E; 33Y 34N 70D 134R 229P; 33Y 34N 70D 134R 309P; 33Y 34N 70D 134R 334P; 33Y 34N 70D 141P 146G; 33Y 34N 70D 141P 157L; 33Y 34N 70D 141P 161A; 33Y 34N 70D 141P 178F; 33Y 34N 70D 141P 179T; 33Y 34N 70D 141P 223E; 33Y 34N 70D 141P 229P; 33Y 34N 70D 141P 309P; 33Y 34N 70D 141P 334P; 33Y 34N 70D 146G 157L; 33Y 34N 70D 146G 161A; 33Y 34N 70D 146G 178F; 33Y 34N 70D 146G 179T; 33Y 34N 70D 146G 223E; 33Y 34N 70D 146G 229P; 33Y 34N 70D 146G 309P; 33Y 34N 70D 146G 334P; 33Y 34N 70D 157L 161A; 33Y 34N 70D 157L 178F; 33Y 34N 70D 157L 179T; 33Y 34N 70D 157L 223E; 33Y 34N 70D 157L 229P; 33Y 34N 70D 157L 309P; 33Y 34N 70D 157L 334P.

ES 2 644 745 T3

157L 161A 178F 229P 309P 334P; 146G 157L 161A 179T 223E 229P 309P; 146G 157L 161A 179T 223E 229P
334P; 146G 157L 161A 179T 223E 309P 334P; 146G 157L 161A 179T 229P 309P 334P; 146G 157L 161A 223E
229P 309P 334P; 146G 157L 178F 179T 223E 229P 309P; 146G 157L 178F 179T 223E 229P 334P; 146G 157L
178F 179T 223E 309P 334P; 146G 157L 178F 179T 229P 309P 334P; 146G 157L 178F 223E 229P 309P 334P;
5 146G 157L 179T 223E 229P 309P 334P; 146G 161A 178F 179T 223E 229P 309P; 146G 161A 178F 179T 223E
229P 334P; 146G 161A 178F 179T 223E 309P 334P; 146G 161A 178F 179T 229P 309P 334P; 146G 161A 178F
223E 229P 309P 334P; 146G 161A 179T 223E 229P 309P 334P; 146G 178F 179T 223E 229P 309P 334P; 157L
161A 178F 179T 223E 229P 309P; 157L 161A 178F 179T 223E 229P 334P; 157L 161A 178F 179T 223E 309P
334P; 157L 161A 178F 179T 229P 309P 334P; 157L 161A 178F 223E 229P 309P 334P; 157L 161A 179T 223E
10 229P 309P 334P; 157L 178F 179T 223E 229P 309P 334P; 161A 178F 179T 223E 229P 309P 334P.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa que puede obtenerse de un polipéptido de origen que tiene actividad amilasa, en el que el polipéptido variante comprende una sustitución de aminoácido en la posición 307 a lisina (K) o arginina (R), referente a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO:1, en el que dicho polipéptido variante es al menos 75% idéntico a una cualquiera de las SEQ ID NO:1 o 7.
2. Un polipéptido variante según la reivindicación 1 que carece de uno o más de los dominios presentes en exoamilasas no maltogénicas.
- 10 3. Un polipéptido variante según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que carece del dominio de unión al almidón, en el que el dominio de unión al almidón se corresponde con los aminoácidos después de la posición 429 referente a la numeración de posiciones de la secuencia de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO:1.
4. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, que puede obtenerse a partir de un polipéptido de origen que tiene actividad exoamilasa, preferiblemente actividad exoamilasa no maltogénica, preferiblemente SEQ ID NO:1, 5, 7 o 11 .
- 15 5. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que la sustitución del aminoácido en la posición 307 es una sustitución a lisina (307K), preferiblemente H307K, o una sustitución a arginina (307R), preferiblemente H307R.
6. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, que comprende además una sustitución de aminoácido en la posición 70.
- 20 7. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que la sustitución del aminoácido en la posición 70 es una sustitución a ácido aspártico (70D) o lisina (70K), preferiblemente G70D/K.
8. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que el aminoácido en la posición 272 de la secuencia del polipéptido variante es histidina (H).
- 25 9. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que el aminoácido en la posición 303 de la secuencia del polipéptido variante es glicina (G).
10. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido variante comprende además una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones: 33, 34, 70, 121, 134, 141, 146, 157, 161, 178, 179, 223, 229, 309 o 334.
- 30 11. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que dichas mutaciones adicionales en el polipéptido variante se seleccionan del grupo que consiste en: 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 309P, 334P, preferiblemente N33Y, D34N, G70D, G121F, G134R, A141P, Y146G, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, S229P, A309P y S334P con relación a una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO:1.
- 35 12. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido variante comprende una secuencia SEQ ID NO:21 (pSac-pMS382) o SEQ ID NO:23 (pSac-pMS382R).
13. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido comprende una exoamilasa no maltogénica, preferiblemente una glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60).
- 40 14. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido es o puede obtenerse de especies de *Pseudomonas*, preferiblemente *Pseudomonas saccharophila* o *Pseudomonas stutzeri*.
15. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido variante tiene una mayor termoestabilidad comparado con un polipéptido de tipo salvaje cuando se ensayan bajo las mismas condiciones.
- 45 16. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que la semivida (t1/2), preferiblemente a 60 °C, aumenta en 15% o superior, preferiblemente en 50% o superior, lo más preferiblemente en 100% o superior, con relación al polipéptido de tipo salvaje.
- 50 17. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que están presentes una o más mutaciones adicionales, en el que dichas mutaciones adicionales se seleccionan del grupo que consiste en: 3S, 26E, 26D, 34N, 34G, 34A, 34S, 34T, 46G, 87S, 121F, 121Y, 121W, 121H, 121A, 121M, 121S, 121T, 121D, 121E, 121L, 121K, 121V, 145D, 146M, 146G, 157L, 157M, 157V, 157N, 157L, 158T, 158A, 158S, 160D, 179T, 179V, 188, 188S, 188T, 188H, 198W, 198F, 223A, 223E, 223K, 223L, 223I, 223S, 223T, 223V, 223R, 223P,

223D, 272Q, 303E, 303D, 306T, 306G, 306T, 306G, 316S, 316P, 316K, 316Q, 339A, 339E, y 353T con relación a una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO:1.

- 5 18. Un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquier reivindicación anterior, en el que el polipéptido tiene una mayor termoestabilidad o una mayor exoespecificidad, o ambas, comparado con el polipéptido de origen o un polipéptido de tipo salvaje.
19. El uso de un polipéptido variante que tiene actividad amilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1-18 como aditivo alimentario o para piensos o para preparar un producto alimentario o de pienso.
- 10 20. Un proceso para tratar un almidón, que comprende poner en contacto el almidón con un polipéptido que tiene actividad amilasa, tal como se indica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, y permitir que el polipéptido genere, a partir del almidón, uno o más productos lineales.
21. Un proceso para preparar un producto alimentario o de pienso, que comprende mezclar un polipéptido que tiene actividad amilasa, tal como se indica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, con un ingrediente alimentario o de piensos.
- 15 22. El uso según la reivindicación 19, o un proceso según la reivindicación 21, en el que el producto alimentario comprende una masa o un producto de masa, preferiblemente un producto de masa procesada.
23. Un uso o un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que el producto alimentario es un producto de panadería.
- 20 24. Un proceso para fabricar un producto de panadería según la reivindicación 23, que comprende: (a) proporcionar un medio de almidón; (b) añadir o mezclar en el medio de almidón un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18; y (c) aplicar calor al medio de almidón durante o después de la etapa (b) para producir un producto de panadería.
- 25 25. Un uso o un proceso según la reivindicación 23 o 24, en el que el producto de panadería producido es una tortilla.
26. Una composición mejoradora para una masa, en la que la composición mejoradora comprende un polipéptido que tiene actividad amilasa, tal como se indica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, y al menos otro ingrediente de la masa o aditivo para masas adicional.
27. Una composición que comprende una harina y un polipéptido que tiene actividad amilasa tal como se indica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
- 30 28. El uso de un polipéptido variante en un producto de masa según la reivindicación 22 para retrasar o reducir el enranciamiento, preferiblemente la retrogradación perjudicial, del producto de masa, o para mejorar uno cualquiera o más de la firmeza, la resiliencia, la cohesividad, el desmigajamiento o la plegabilidad del producto de masa.
29. Una combinación de un polipéptido variante que tiene actividad amilasa, tal como se indica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores, junto con uno cualquiera o más de los siguientes:
- 35 (a) una alfa-amilasa maltogénica denominada también glucano 1,4- α -maltohidrolasa (EC 3.2.1. 133) de *Bacillus stearothermophilus*, o uno de sus variantes, homólogos o mutantes que tenga actividad alfa-amilasa maltogénica;
- (b) una xilanasa de panadería (EC 3.2.1.8) procedente, por ejemplo, de *Bacillus* sp., *Aspergillus* sp., *Thermomyces* sp. o *Trichoderma* sp.;
- (c) una α -amilasa (EC 3.2.1.1) de *Bacillus amyloliquefaciens*, o uno de sus variantes, homólogos o mutantes que tenga actividad alfa-amilasa; y
- 40 (d) una lipasa, tal como una glicolipasa de *Fusarium heterosporum*.
30. El uso de una combinación según la reivindicación 29 en un proceso según cualquiera de las reivindicaciones 20, 21, 23, 24, o 25.
31. Un ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido que tiene actividad amilasa según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
- 45 32. Un ácido nucleico según la reivindicación 31 que tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos 75% idéntica a SEQ ID NO:6 o SEQ ID NO:12.
- 50 33. Una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 31 o la reivindicación 32, que puede obtenerse a partir de una secuencia de origen, y la secuencia de origen es capaz de codificar una exoamilasa no maltogénica, en la que dicha secuencia de ácido nucleico comprende una sustitución en uno o más restos, de modo que el ácido nucleico codifica un resto lisina (R) o arginina (K) en la posición 307, opcionalmente junto con una o más mutaciones

adicionales, de modo que el ácido nucleico codifica uno o más restos seleccionados del grupo que consiste en: 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 309P, 334P referentes a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophilia* mostrada como SEQ ID NO:1.

- 5 34. Una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, que procede de una secuencia de origen que codifica una exoamilasa no maltogénica mediante la sustitución de uno o más restos nucleotídicos.
35. Una secuencia de ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 34, seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO:22 (pSac-pMS382) o SEQ ID NO:24 (pSac-pMS382R).
36. Un plásmido que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35.
- 10 37. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 31 a 35, o capaz de expresar un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
38. Una célula que comprende un plásmido, preferiblemente transformada con él, según la reivindicación 36 o un vector de expresión según la reivindicación 37.
39. Una célula capaz de expresar un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18.
- 15 40. Una célula según la reivindicación 38-39, o que es una célula bacteriana, fúngica o de levadura.
41. Un método para expresar un polipéptido variante que tiene actividad amilasa, comprendiendo dicho método obtener una célula según la reivindicación 38, 39 o 40, y expresar el polipéptido a partir de la célula y, opcionalmente, purificar el polipéptido.
- 20 42. Un método para producir un polipéptido variante que tiene actividad amilasa, comprendiendo dicho método introducir una sustitución de aminoácido en un polipéptido de origen que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, y dicha sustitución de aminoácido se selecciona del grupo que consiste en: 307K, 307R, referentes a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophilia* mostrada como SEQ ID NO:1, en el que dicho polipéptido variante es al menos 75% idéntico a una cualquiera de las SEQ ID NO:1 o 7.
- 25 43. Un método según la reivindicación 42, en el que la secuencia de un ácido nucleico que codifica el polipéptido de origen se altera para introducir la sustitución de aminoácido.
44. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 43, en el que se aumenta la termoestabilidad o la exoespecificidad, o ambas, de un polipéptido producido o codificado.
45. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 44, en el que el polipéptido producido se aísla o se purifica, o ambos.
- 30 46. Un polipéptido que tiene actividad amilasa que puede obtenerse mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 45.
47. Un polipéptido que tiene actividad amilasa obtenido mediante un método según cualquiera de las reivindicaciones 42 a 45.

Figura 1

1ª compresión

2ª compresión

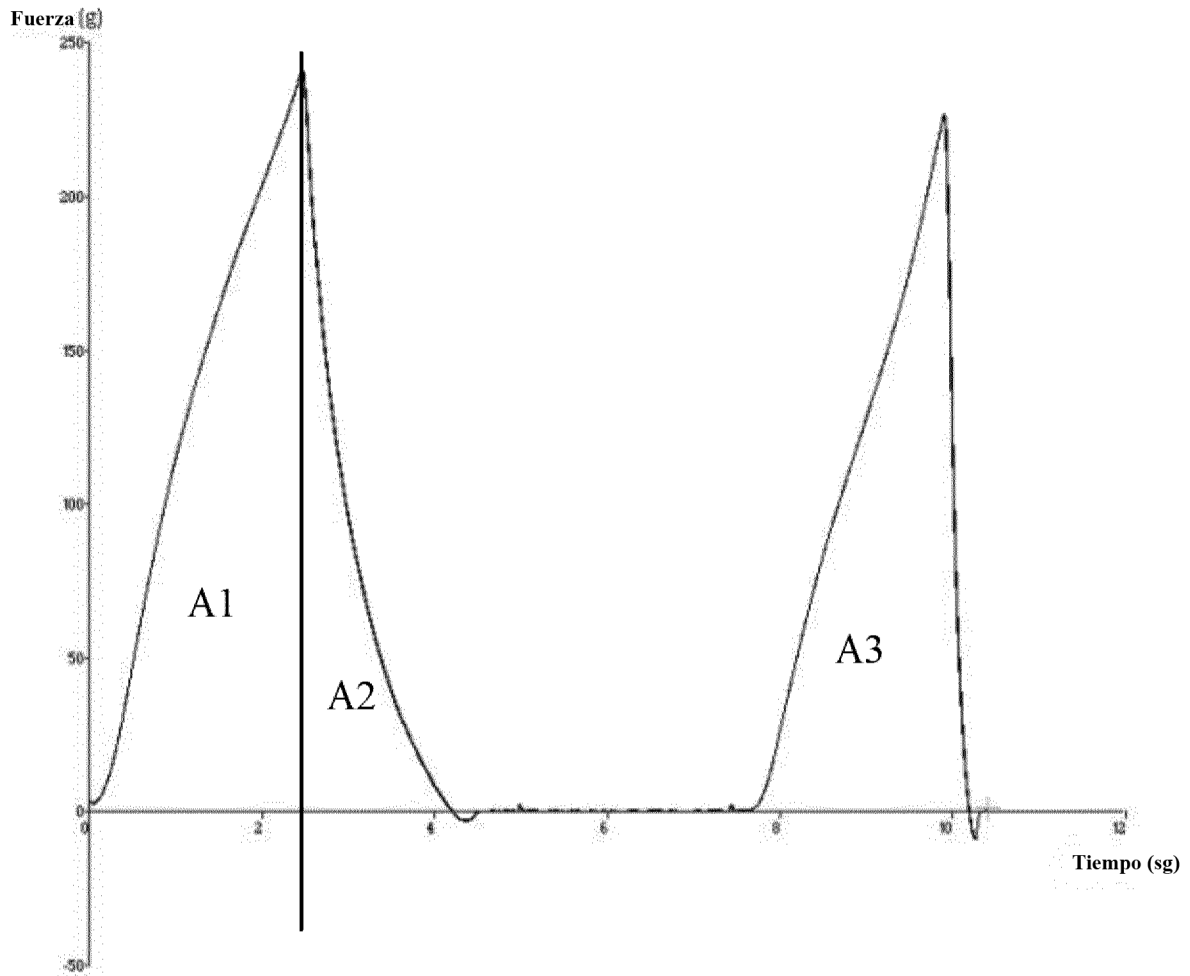


Figura 2

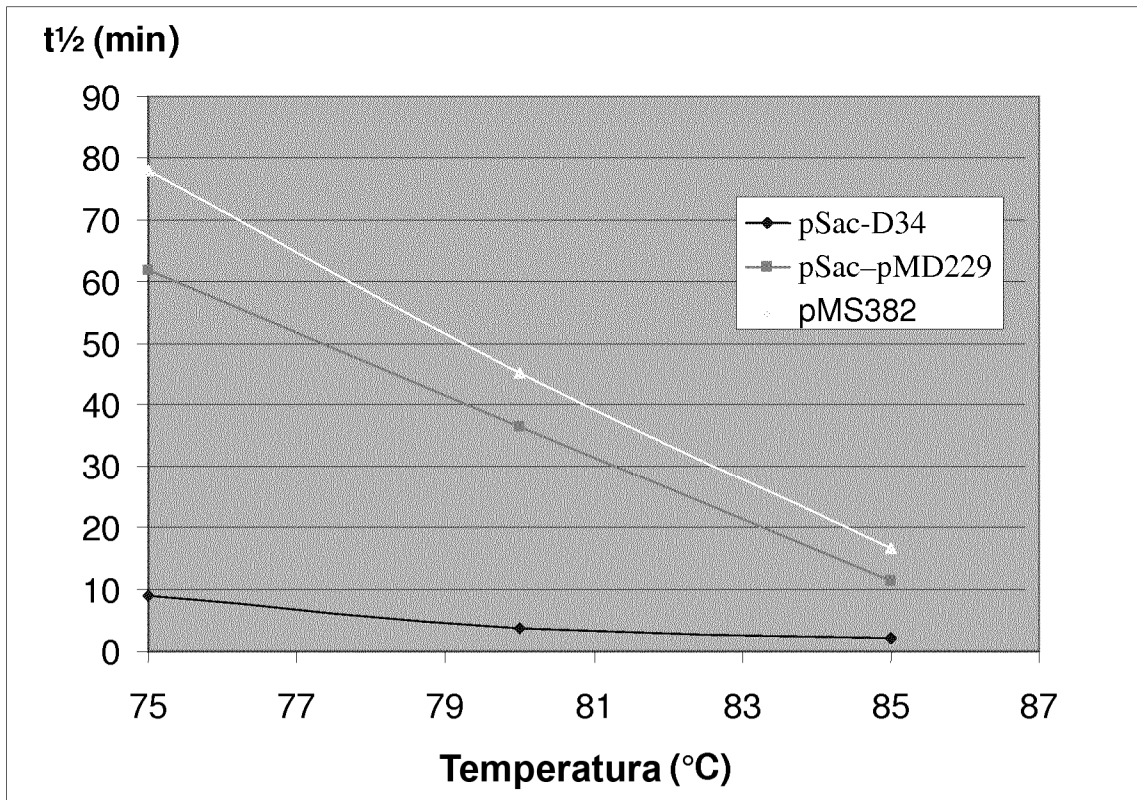


Figura 3

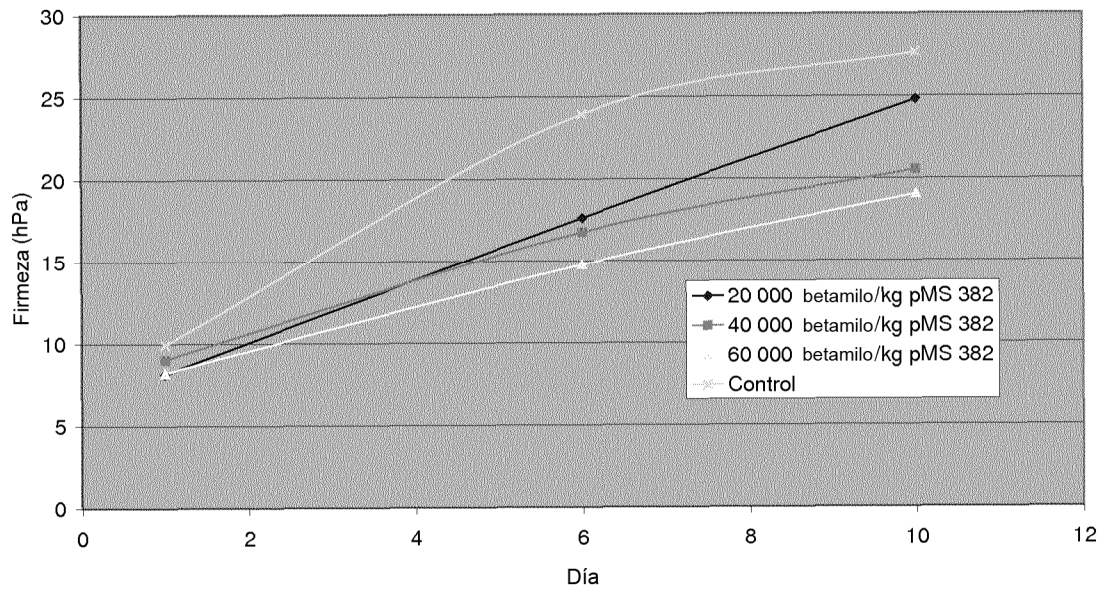


Figura 4

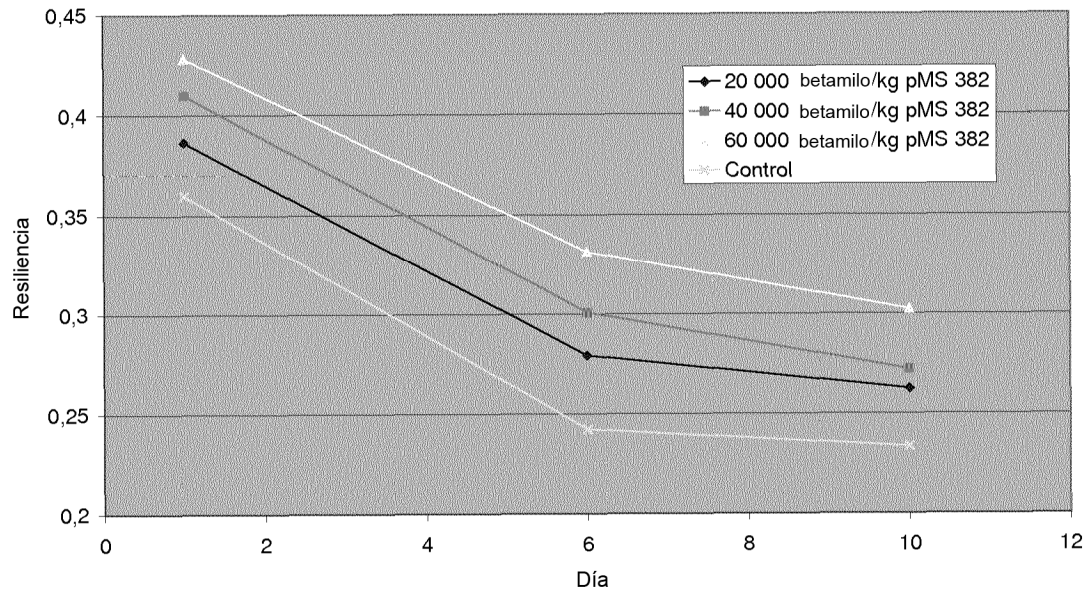


Figura 5

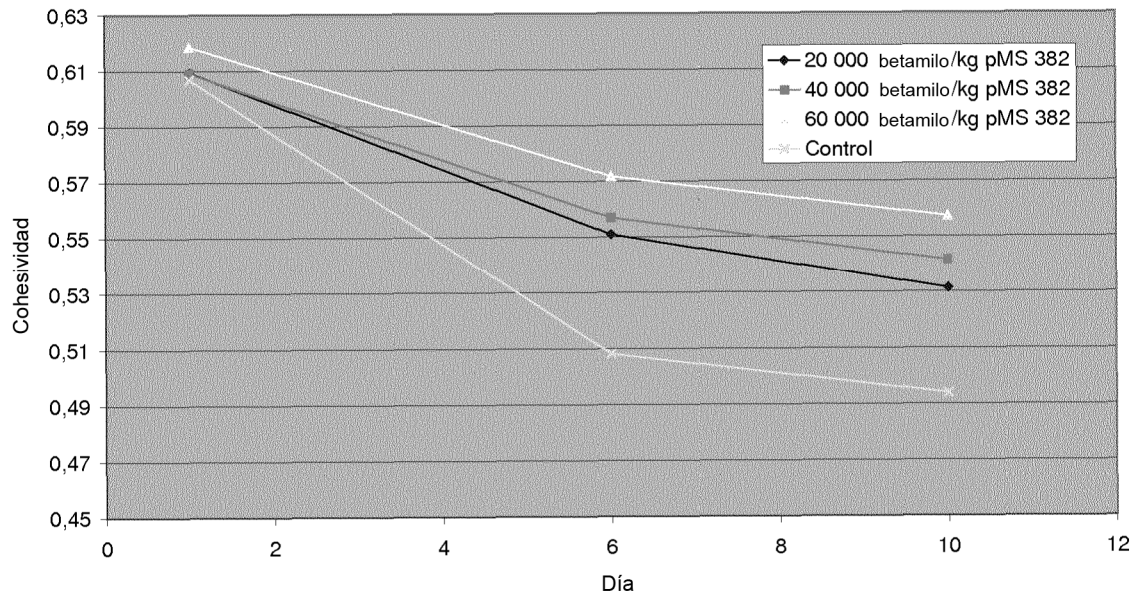


Figura 6

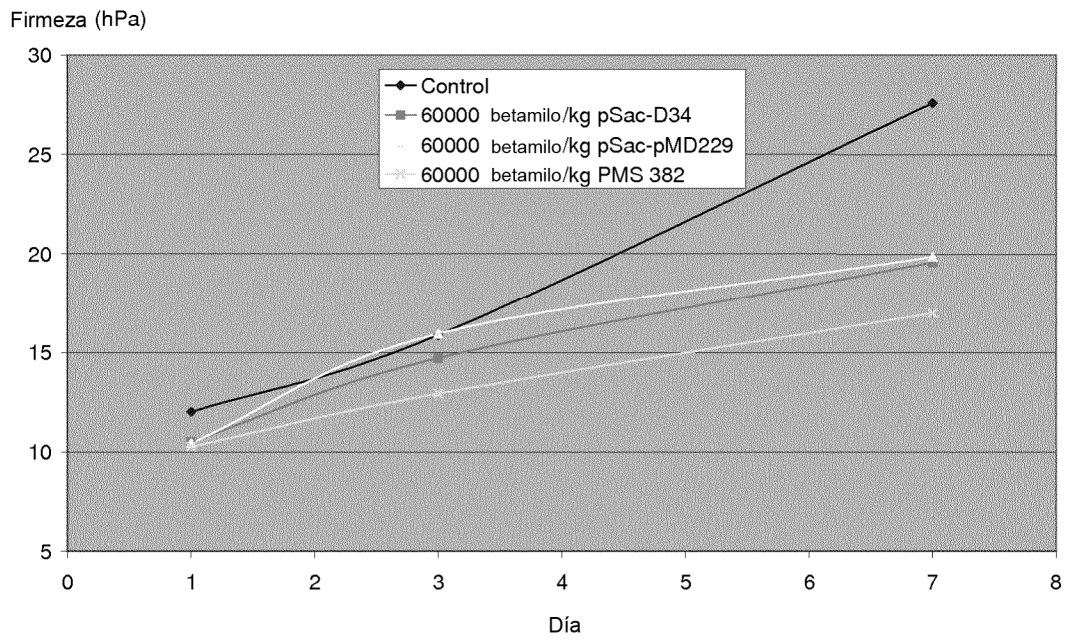


Figura 7

Resiliencia

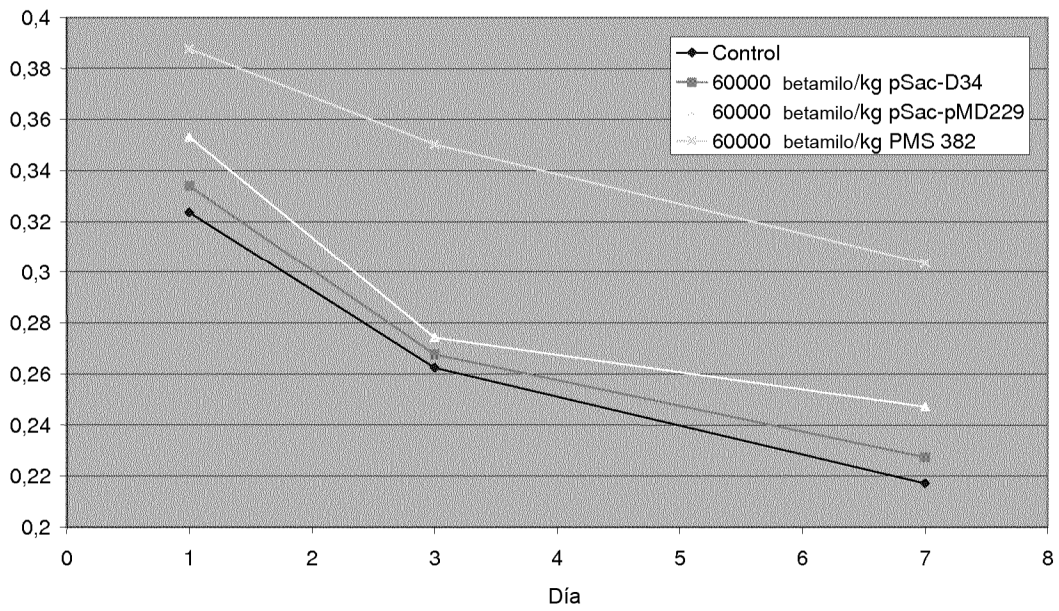


Figura 8

Cohesividad

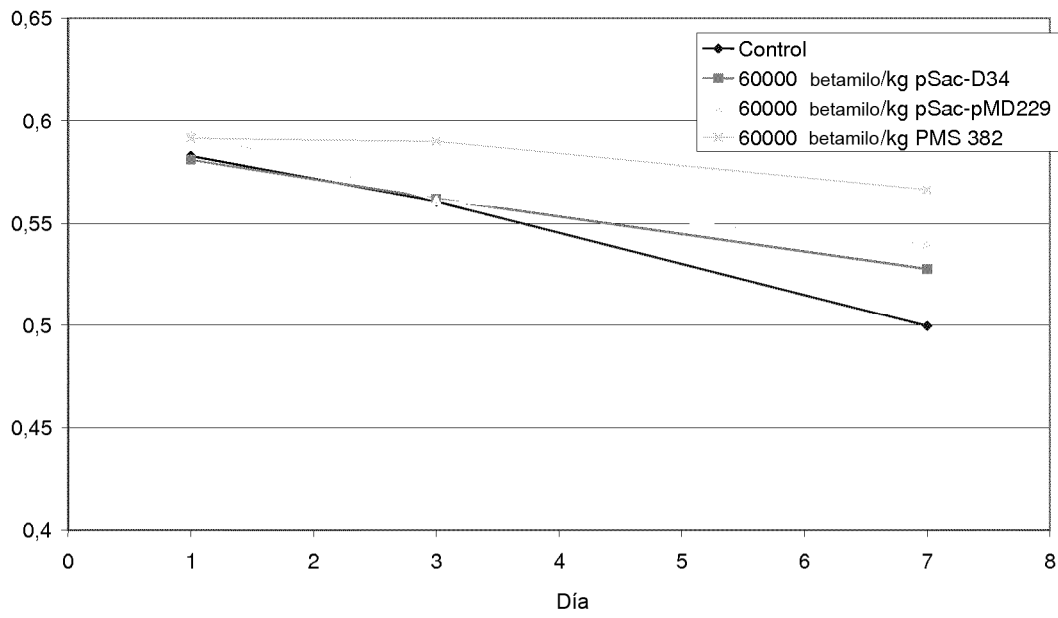


Figura 9

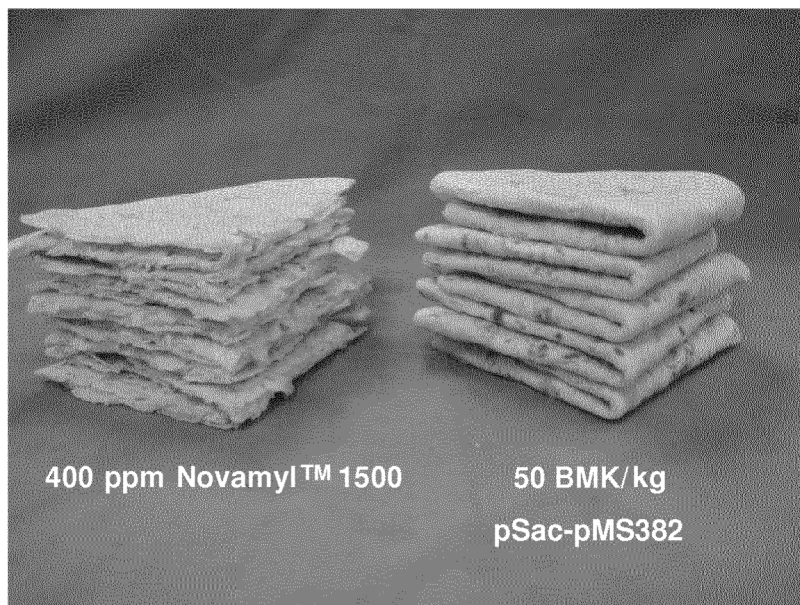


Figura 10

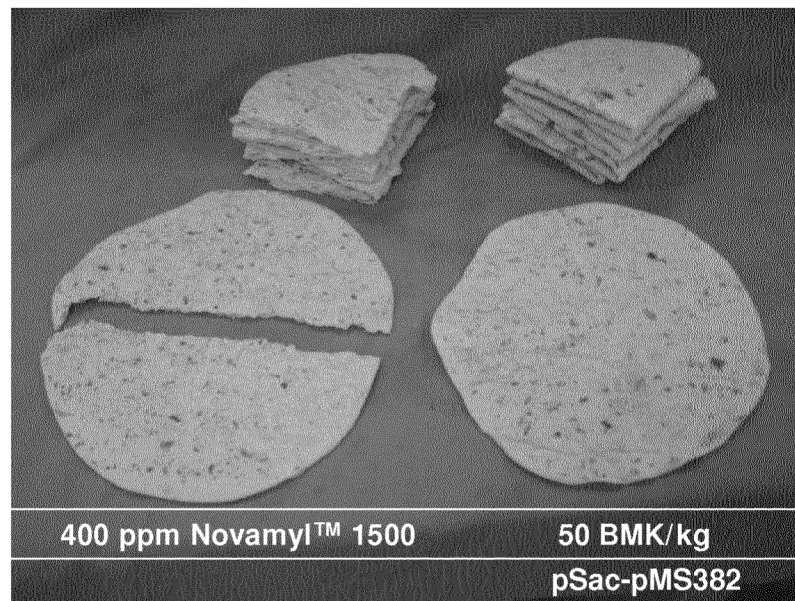


Figura 11

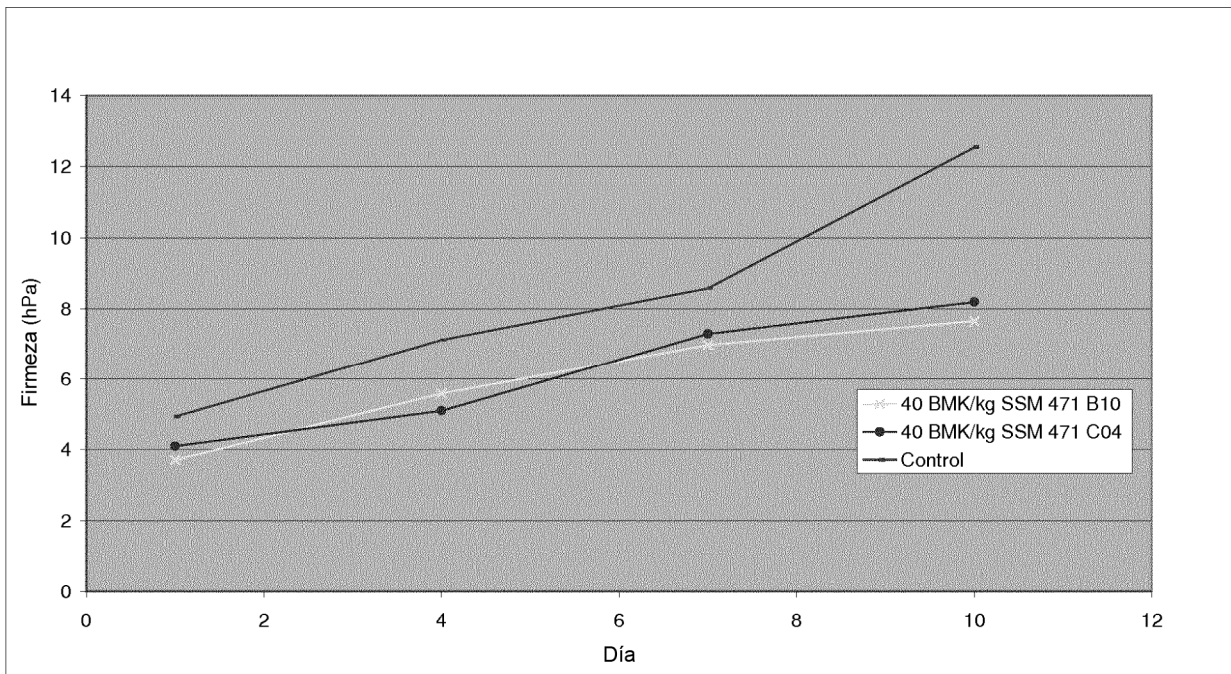


Figura 12

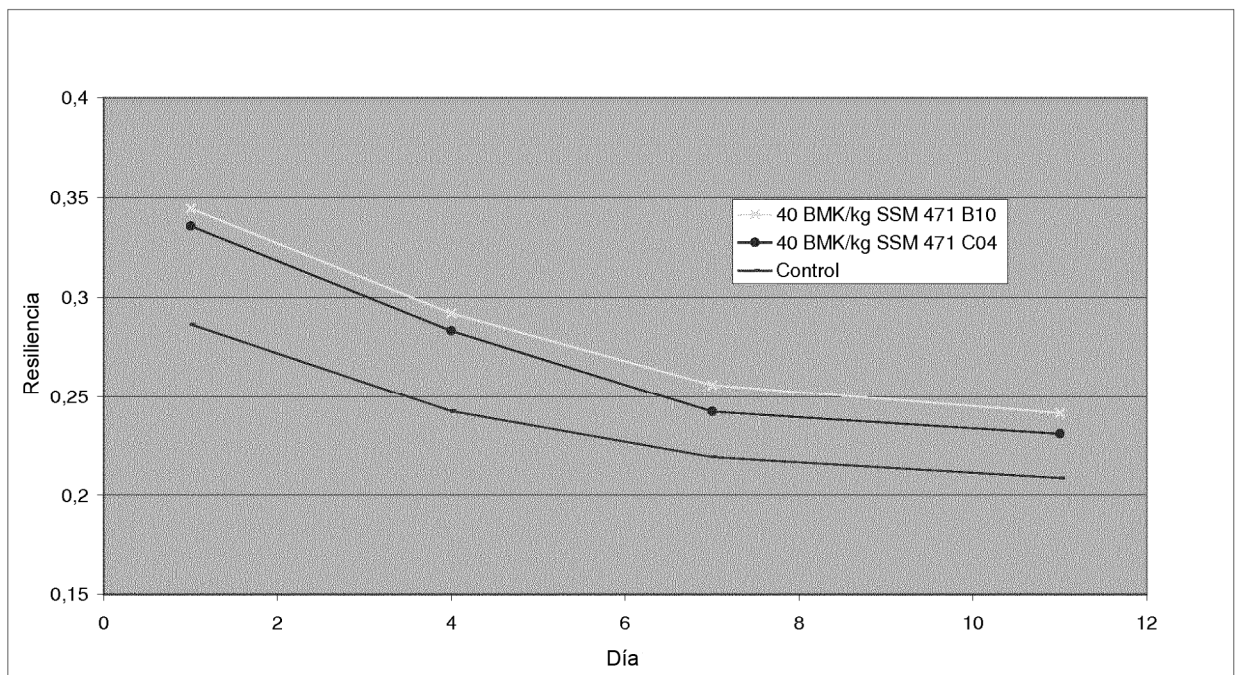


Figura 13

