

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 658 856**

51 Int. Cl.:

C12N 9/28 (2006.01)

C12P 19/14 (2006.01)

A21D 8/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2005 PCT/GB2005/002675**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.01.2006 WO06003461**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2005 E 05758989 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 1769069**

54 Título: **Variantes de exoamilasa no maltogénica**

30 Prioridad:

07.07.2004 US 608919 P

07.07.2004 US 886504

07.07.2004 US 886505

07.07.2004 US 886527

22.09.2004 US 612407 P

22.09.2004 US 947612

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

12.03.2018

73 Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (50.0%)

Langebrogade 1

1411 Copenhagen K, DK y

GENENCOR INTERNATIONAL, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

BERG, CASPER TUNE;

DERKX, PATRICK M. F.;

FIORESI, CAROL;

GERRITSE, GIJSBERT;

KELLET-SMITH, ANJA HEMMINGEN;

KRAGH, KARSTEN MATTHIAS;

LIU, WEI;

SHAW, ANDREW;

SØRENSEN, BO SPANGE y

THOUHAHL, CHARLOTTE REFDAHL

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 658 856 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

Variantes de exoamilasa no maltogénica

5 Se hace referencia a las solicitudes provisionales US nos. de serie 60/485.413, 60/485.539 y 60/485.616 presentadas el 7 de julio, 2003. También se hace referencia a las solicitudes internacionales PCT/US2004/021723 y PCT/US2004/021739 presentadas el 7 de julio, 2004 y designando a los EEUU (solicitante: Genencor International, Inc). También se hace referencia a las solicitudes de utilidad US números de serie 10/886.905 y 10/866.903 todas las cuales también se presentaron el 7 de julio, 2004.

10 También se hace referencia a la solicitud provisional US número de serie 60/608.919 (presentada como solicitud de utilidad US número de serie 10/887.056 el 7 de julio, 2004 pero convertida en una solicitud provisional el 15 de septiembre, 2004). También se hace referencia a la solicitud provisional US número de serie 60/612.407 que se presentó el 22 de septiembre, 2004.

15 Se hace referencia adicionalmente a la solicitud US no. de serie 60/485.539 presentada el 7 de julio, 2003. También se hace referencia a la solicitud internacional PCT/IB2004/002487 presentada el 7 de julio, 2004 y designando a los EEUU (solicitante: Danisco A/S). También se hace referencia a la solicitud de utilidad US número de serie 10/886.023 presentada el 7 de julio, 2004.

También se hace referencia a las solicitudes de utilidad US números de serie 10/886.505, 10/886.527 y 10/886.504, todas las cuales se presentaron el 7 de julio, 2004. También se hace referencia a la solicitud de utilidad US número de serie 10/947.612 presentada el 22 de septiembre, 2004.

Campo

20 Esta invención se refiere a polipéptidos, específicamente polipéptidos amilasa y ácidos nucleicos que los codifican, y a sus usos como exoamilasas no maltogénicas en la producción de productos alimenticios. Las amilasas de la presente invención se han preparado por ingeniería para tener cualidades más beneficiosas. Específicamente, las amilasas de la presente invención muestran una exoespecificidad alterada y/o termoestabilidad alterada. En particular, los polipéptidos derivan de polipéptidos que tienen actividad exoamilasa no maltogénica, en particular, actividad glucan 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60).

Antecedentes

30 Las amilasas mejoradas pueden mejorar problemas inherentes en determinados procesos, tal como horneado. La cristalización de la amilopectina tiene lugar en gránulos de almidón días después del horneado, lo que da lugar a una firmeza incrementada del pan y causa el endurecimiento del pan. Cuando el pan se endurece, el pan pierde blandura en la miga y humedad en la miga. Como resultado, la miga se vuelve menos elástica, y se desarrolla en el pan una corteza correosa.

35 La hidrólisis enzimática (por amilasas, por ejemplo) de las cadenas laterales de amilopectina puede reducir la cristalización e incrementar el anti-endurecimiento. La cristalización depende de la longitud de las cadenas laterales de amilopectina: cuanto más largas son las cadenas laterales, mayor es la cristalización. La mayor parte de los gránulos de almidón están compuestos por una mezcla de dos polímeros: amilopectina y amilosa, de los que aproximadamente el 75% es amilopectina. La amilopectina es una molécula muy grande, ramificada, que consiste en cadenas de unidades de α -D-glucopiranosilo unidas por uniones (1-4), en las que las cadenas están unidas por uniones α -D-(1-6) para formar ramificaciones. La amilosa es una cadena lineal de unidades de α -D-glucopiranosilo unidas en (1-4) que tienen pocas ramificaciones α -D-(1-6).

40 El horneado de productos de pan harinosos tal como pan blanco, pan compuesto por harina de centeno y harina de trigo enrollada y bollos se consigue horneando la masa de pan a temperaturas de horno en el intervalo de 180 a 250°C durante aproximadamente 15 a 60 minutos. Durante el proceso de horneado, un gradiente pronunciado de temperatura (200 \rightarrow 120°C) prevalece sobre las capas externas de la masa donde se desarrolla la corteza del producto horneado. Sin embargo, debido al vapor, la temperatura en la miga es sólo aproximadamente 100°C al final del proceso de horneado. Por encima de temperaturas de aproximadamente 85°C, puede tener lugar la inactivación enzimática y la enzima no tendrá propiedades anti-endurecimiento. Así, sólo las amilasas termoestables son capaces de modificar el almidón eficazmente durante el horneado.

50 La actividad endoamilasa puede afectar negativamente la calidad del producto de pan final mediante la producción de una miga pegajosa o gomosa debido a la acumulación de dextrinas ramificadas. Se prefiere la actividad exoamilasa, porque consigue la modificación deseada del almidón que da lugar al retraso del endurecimiento, con menos de los efectos negativos asociados con la actividad endoamilasa. La reducción de la actividad endoamilasa puede dar lugar a una exoespecificidad mayor, lo que puede reducir las dextrinas ramificadas y producir un pan de mayor calidad.

Compendio

Proporcionamos, según la invención, un polipéptido variante PS4 como se muestra en las reivindicaciones. Proporcionamos además el uso de dicho polipéptido variante PS4, incluyendo en y como aditivos alimenticios, productos alimenticios, productos de panadería, composiciones mejoradas, productos de pienso incluyendo piensos animales, etc como se muestra en las reivindicaciones. Proporcionamos ácidos nucleicos que codifican y que se refieren a polipéptidos variantes PS4, como se muestra en las reivindicaciones. También se muestran en las reivindicaciones métodos para producir dichos polipéptidos variantes PS4, así como otros aspectos de la invención.

La presente invención proporciona:

1. Un polipéptido variante PS4 que tiene actividad exoamilasa no maltogénica y que tiene una secuencia de aminoácido que es al menos un 95% idéntica a la SEQ ID NO: 15, en la que dicho polipéptido variante PS4 tiene la mutación de aminoácidos Y146G con referencia a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO: 1, y en el que dicho polipéptido tiene una mayor termoestabilidad comparado con el polipéptido de la SEQ ID NO: 1 cuando se ensaya en las mismas condiciones.
2. Uso de un polipéptido variante PS4 como se muestra en el Párrafo 1 como un aditivo de alimentario o de pienso o para preparar un producto alimenticio o de pienso.
3. Un proceso para tratar un almidón que comprende poner en contacto el almidón con un polipéptido como se muestra en el Párrafo 1 y permitir que el polipéptido genere a partir del almidón uno o más productos lineales.
4. Un proceso para preparar un producto alimenticio o de pienso que comprende mezclar un polipéptido como se muestra en el Párrafo 1 con un ingrediente alimenticio o de pienso.
5. Un proceso para preparar un producto de panadería que comprende: (a) proporcionar un medio de almidón; (b) añadir al medio de almidón un polipéptido como se muestra en el Párrafo 1; y (c) aplicar calor al medio de almidón durante o después de la etapa (b) para producir un producto de panadería.
6. Un producto de masa o un producto de panadería obtenido por un proceso según el Párrafo 4 o 5, en el que el producto de masa o producto de panadería comprende un polipéptido variante PS4 según el Párrafo 1.
7. Una composición mejoradora para una masa, en la que la composición mejoradora comprende un polipéptido variante PS4 como se muestra en el Párrafo 1, y al menos un ingrediente de masa o aditivo de masa adicional.
8. Uso de un polipéptido variante PS4 como se muestra en el Párrafo 1, en un producto de masa para retardar o reducir el endurecimiento, preferiblemente retrogradación perjudicial, del producto de masa.
9. Una combinación de un polipéptido variante PS4 como se muestra en el Párrafo 1, junto con Novamil, o una variante, homólogo, o mutantes de éste que tiene actividad alfa-amilasa maltogénica.
10. Uso de una combinación según el Párrafo 9 para una aplicación, uso o proceso según cualquiera de los Párrafos 2 a 8.
11. Un producto alimenticio o de pienso obtenido por un proceso según el Párrafo 4 o producido por tratamiento con una combinación según el Párrafo 9, en el que el producto alimenticio o de pienso comprende un polipéptido variante PS4 según el Párrafo 1.
12. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido según el Párrafo 1.
13. Un plásmido que comprende un ácido nucleico según el Párrafo 12.
14. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según el Párrafo 12, o capaz de expresar un polipéptido según el Párrafo 1.
15. Una célula huésped que comprende, preferiblemente transformada con, un plásmido según el Párrafo 21 o un vector de expresión según el Párrafo 22.
16. Un método para expresar un polipéptido variante PS4, comprendiendo el método obtener una célula huésped según el Párrafo 15, y expresar el polipéptido a partir de la célula o célula huésped, y opcionalmente purificar el polipéptido.
17. Un método para producir una variante de polipéptido PS4 según el párrafo 1, comprendiendo el método introducir una sustitución de aminoácidos en un polipéptido parental que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, estando la sustitución de aminoácido en la posición 146 con referencia a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO: 1.

Listados de secuencias

La **SEQ ID NO: 1** muestra una secuencia de referencia de PS4, derivada de la secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila*. La **SEQ ID NO: 2** muestra una secuencia de PSac-D34; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 11 sustituciones y delección del dominio de unión a almidón. La **SEQ ID NO: 3** muestra una secuencia de PSac-D20; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 13 sustituciones y delección del dominio de unión a almidón. La **SEQ ID NO: 4** muestra una secuencia de PSac-D14; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 14 sustituciones y delección del dominio de unión a almidón. La **SEQ ID NO: 5** muestra un precursor de Glucan 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* (EC 3.2.1.60) (amilasa G4) (amilasa formadora de maltotetraosa) (Exo-maltotetrahidrolasa) (exo-amilasa formadora de maltotetraosa). Número de acceso **SWISS-PROT** P22963. La **SEQ ID NO: 6** muestra un gen mta de *P. saccharophila* que codifica maltotetrahidrolasa (número EC = 3.2.1.60). Número de acceso GenBank X16732. La **SEQ ID NO:7** muestra una secuencia de referencia de PS4, derivada de la secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri*. La **SEQ ID NO: 8** muestra una secuencia de PStu-D34; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri* con 9 sustituciones. La **SEQ ID NO: 9** muestra una secuencia de PStu-D20; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri* con 11 sustituciones. La **SEQ ID NO: 10** muestra una secuencia de PStu-D14; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri* con 12 sustituciones. La **SEQ ID NO: 11** muestra un precursor de Glucan 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri* (*Pseudomonas perfectomarina*). (EC 3.2.1.60) (amilasa G4) (amilasa formadora de maltotetraosa) (Exo-maltotetrahidrolasa) (exo-amilasa formadora de maltotetraosa). Número de acceso **SWISS-PROT** P13507. La **SEQ ID NO: 12** muestra un gen de amilasa formadora de maltotetraosa de *P.stutzeri* (amyP), cds completa. Número de acceso GenBank M24516. La **SEQ ID NO: 13** muestra una secuencia de pMD55; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 11 sustituciones (G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, N33Y, D34N, L178F, A179T y G121F). La **SEQ ID NO: 13** muestra una secuencia de pMD55; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 11 sustituciones (G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, N33Y, D34N, L178F, A179T y G121F). La **SEQ ID NO: 13** muestra una secuencia de pMD55; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 11 sustituciones (G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, N33Y, D34N, L178F, A179T y G121F) y delección del dominio de unión a almidón. La **SEQ ID NO: 14** muestra una secuencia de PMD96: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, H307L y S334P. La **SEQ ID NO: 15** muestra una secuencia de SSM 381: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P. La **SEQ ID NO: 16** muestra una secuencia de SSM279 B1: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157M, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P. La **SEQ ID NO: 17** muestra una secuencia de SSM237 P2: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 158T, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P. La **SEQ ID NO: 18** muestra una secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 198W, 223E, 307L y 334P. La **SEQ ID NO: 19** muestra una secuencia de SSM325 F3: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307L y 334P. La **SEQ ID NO: 20** muestra una secuencia de pMD129: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 198W, 223E, 229P, 307L y 334P. La **SEQ ID NO: 21** muestra una secuencia de SSM341 A9: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 303E, 307L y 334P. La **SEQ ID NO: 22** muestra una secuencia de SSM341 G11: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 303D, 307L y 334P. La **SEQ ID NO: 23** muestra una secuencia de SSM350 B11: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 306T, 307L y 334P. La **SEQ ID NO: 24** muestra una secuencia de SSM350 C12: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 306G, 307L y 334P. La **SEQ ID NO: 25** muestra una secuencia de SSM332 Q4: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 309P, 307L y 334P. La **SEQ ID NO: 26** muestra una secuencia de SSM365 B4: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 316S, y 334P. La **SEQ ID NO: 27** muestra un SSM365 F4: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 316P y 334P. La **SEQ ID NO: 28** muestra un SSM360 C7: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 334P y 353T.

Descripción detallada

En la descripción y ejemplos siguientes, a no ser que el contexto dicte otra cosa, las dosificaciones de polipéptidos variantes PS4 se proporcionan en partes por millón (microgramos por gramo) de harina. Por ejemplo, "1 D34" tal y como se usa en la Tabla 2 indica 1 parte por millón de pSac-D34 basado en peso/peso. Preferiblemente, las magnitudes o cantidades de enzima se determinan sobre la base de ensayos de actividad como equivalentes de proteína enzima pura medida con albúmina de suero bovino (BSA) como un estándar, usando 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).

En la descripción de las diferentes variantes de polipéptido variante PS4 producidas o que se contempla que están englobadas por este documento, se adoptará la nomenclatura siguiente para facilitar la referencia:

(i) cuando la sustitución incluye un número y una letra, por ejemplo, 141P, entonces esto se refiere a [posición según el sistema de numeración/aminoácido sustituido].

De acuerdo con esto, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido a prolina en la posición 141 se designa como 141P;

(ii) cuando la sustitución incluye una letra, un número y una letra, por ejemplo, A141P, entonces esto se refiere a [aminoácido original/posición según el sistema de numeración/aminoácido sustituido]. De acuerdo con esto, por ejemplo, la sustitución de alanina con prolina en la posición 141 se designa como A141P.

Cuando son posibles dos o más posibles sustituyentes en una posición particular, eso se designará por letras contiguas, que pueden estar separadas opcionalmente por barras diagonales "/", por ejemplo, G303ED o G303E/D. Cuando el aminoácido relevante en una posición puede sustituirse por cualquier aminoácido, esto se designa por [posición según el sistema de numeración/X], por ejemplo, 121X.

Las mutaciones múltiples pueden designarse separándolas por barras diagonales "/", por ejemplo, A141P/G223A que representa mutaciones en la posición 141 y 223 que sustituyen alanina con prolina y glicina con alanina, respectivamente.

A no ser que se defina otra cosa en la presente memoria, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tiene el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Singleton, et al., DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2ª ED., John Wiley y Sons, Nueva York (1994), y Hale y Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991) proporcionan a un experto en la técnica un diccionario general de muchos de los términos usados en esta invención. Aunque muchos métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria pueden usarse en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los métodos y materiales preferidos. Los intervalos numéricos son inclusivos de los números que definen el intervalo. A no ser que se indique otra cosa, los ácidos nucleicos 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 amino a carboxi, respectivamente.

La práctica de la presente invención empelará, a no ser que se indique otra cosa, técnicas convencionales de química, biología molecular, microbiología, ADN recombinante e inmunología, que están dentro de las capacidades de un experto en la técnica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía. Véase, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda 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 y Sons, Nueva York, N.Y.); B. Roe, J. Crabtree, y A. Kahn, 1996, DNA Isolation and Sequencing: Essential Techniques, John Wiley y 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 Parte 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 Ratón, 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 0-89603-493-3, 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 PS4

Proporcionamos una exoamilasa no maltogénica que tiene una sustitución en una o más posiciones que producen una propiedad alterada, preferiblemente exoespecificidad alterada o termoestabilidad alterada, o ambas, respecto a la enzima parental.

Proporcionamos además composiciones, que incluyen aditivos alimenticios, productos alimenticios, productos de panadería, composiciones mejoradoras, productos de pienso incluyendo piensos animales, etc que comprenden polipéptidos que tienen actividad exoamilasa no maltogénica, así como métodos para preparar y usar dichos polipéptidos y las composiciones. Proporcionamos otros usos de dichas composiciones tal como en la preparación de detergentes, como edulcorantes, jarabes, etc. Las composiciones incluyen el polipéptido junto con al menos un otro componente. En particular, proporcionamos aditivos alimenticios o de piensos que comprenden los polipéptidos.

Dichos polipéptidos y ácidos nucleicos se diferencian de sus secuencias parentales por la inclusión de un número de mutaciones, y se conocen por conveniencia como "polipéptidos variantes PS4". En otras palabras, la secuencia del polipéptido o ácido nucleico variante PS4 es diferente de la de su parental en un número de posiciones o residuos. En realizaciones preferidas, las mutaciones comprenden sustituciones de aminoácidos, esto es, un cambio de un residuo de aminoácido por otro. Así, los polipéptidos variantes PS4 comprenden un número de cambios en la naturaleza del residuo de aminoácido en una o más posiciones de la secuencia parental.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "variante" debe tomarse como que significa una molécula que puede derivar de una molécula parental. Las variantes incluyen polipéptidos, así como ácidos nucleicos. Las variantes incluyen sustituciones, inserciones, transversiones e inversiones, entre otras cosas, en una o más localizaciones. Las variantes también incluyen truncamientos. Las variantes incluyen derivados homólogos y funcionales de las moléculas parentales. Las variantes incluyen secuencias que son complementarias a secuencias que son capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

Sustituciones para polipéptidos variantes PS4

Proporcionamos polipéptidos variantes PS4 con alteraciones en la secuencia que comprenden sustituciones de aminoácidos en una secuencia de exoamilasa no maltogénica. La sustitución de aminoácidos puede ser en una cualquiera o más de las posiciones 26, 70, 121, 145, 146, 157, 158, 161, 188, 198, 223, 229, 272, 303, 306, 309, 316, 339 y 353 con referencia a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophyllia* mostrada como SEQ ID NO: 1.

La mutación de aminoácidos puede estar en una o más posiciones seleccionadas de los grupos que consisten en: (a) posiciones 121, 161, 223; (b) posiciones 146, 157, 158, 198, 229, 303, 306, 309, 316, 353; y (c) posiciones 26, 70, 145, 188, 272, 339; y cualquier combinación de (a), (b) y (c).

La sustitución de aminoácidos puede comprender un cambio a 121F, 121Y, 121W, 161A, 223E, 223K. Alternativamente, o además, la sustitución de aminoácidos puede comprender un cambio a 146G, 146M, 157M, 158T, 158A, 158S, 198W, 198F, 229P, 303E, 303D, 306T, 306G, 309P, 316S, 316P, 316K, 316Q, 353T. Además, alternativamente, o además, la sustitución de aminoácidos puede comprender un cambio a 26E, 70D, 1145D, 188S, 188T, 188H, 272Q, 339A, 339E.

Dichos polipéptidos variantes se refieren en este documento como "polipéptidos variantes PS4". También se describen los ácidos nucleicos que codifican dichos polipéptidos variantes y se referirán por conveniencia como "ácidos nucleicos variantes PS4". Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes PS4 se describirán con más detalle más adelante.

Las secuencias "parentales", es decir, las secuencias en las que se basan los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes PS4, preferiblemente son polipéptidos que tienen actividad exoamilasa no maltogénica. Los términos "enzimas parentales" y "polipéptidos parentales" deben interpretarse de acuerdo con esto, y tomarse como que significan las enzimas y polipéptidos en los que se basan los polipéptidos variantes PS4. Se describen con más detalle más adelante.

En realizaciones particularmente preferidas, las secuencias parentales son enzimas exoamilasas no maltogénicas, preferiblemente enzimas exoamilasas no maltogénicas bacterianas. En realizaciones altamente preferidas, la secuencia parental comprende una glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60). Preferiblemente, la secuencia parental se puede derivar de especies de *Pseudomonas*, por ejemplo, *Pseudomonas saccharophyllia* o *Pseudomonas stutzeri*.

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

Así, el polipéptido parental puede comprender una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophyllia* que tiene una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1. Alternativamente, como se describe en la presente memoria, el polipéptido parental 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 número de acceso SWISS-PROT P13507.

Por otra parte, el polipéptido parental puede ser una variante de cualquiera de las secuencias de tipo salvaje, es decir, el polipéptido parental puede prepararse por ingeniería en sí mismo, o comprender un polipéptido variante PS4.

Sin embargo, estará claro para el lector experto que, aunque los polipéptidos variantes PS4 pueden derivarse mutando secuencias ya mutadas, es posible construir dichos polipéptidos variantes empezando a partir de una secuencia de tipo salvaje (o de hecho cualquier secuencia adecuada), identificando las diferencias entre la secuencia de partida y la variante deseada, e introduciendo las mutaciones requeridas en la secuencia de partida con el fin de conseguir la variante deseada.

Las proteínas y ácidos nucleicos relacionados con, preferiblemente que tienen homología de secuencia o funcional, con la secuencia de exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophilia* 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 refieren en este documento como miembros de la "familia PS4". Los ejemplos de enzimas exoamilasa no maltogénica de la "familia PS4 " adecuadas para uso en la generación de los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes PS4 se describen con más detalle más adelante.

Los polipéptidos variantes PS4 descritos en este documento preferiblemente retienen las características de los polipéptidos parentales, y adicionalmente preferiblemente tienen propiedades beneficiosas adicionales, por ejemplo, actividad o termoestabilidad aumentadas, o resistencia a pH, o cualquier combinación (preferiblemente todas). Esto se describe con más detalle más adelante.

Los mutantes de sustitución PS4 descritos aquí pueden usarse para cualquier propósito adecuado. Pueden usarse preferiblemente para propósitos para los que es adecuada la enzima parental. En particular, pueden usarse en cualquier aplicación para la que se usa la exo-maltotetrahidrolasa. Los mutantes según la invención tienen la ventaja añadida de una mayor termoestabilidad. También pueden tener una mayor actividad exoamilasa o mayor estabilidad en pH, o cualquier combinación. Los ejemplos de usos adecuados para los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes PS4 incluyen producción de alimentos, en particular panadería, así como producción de productos alimenticios; los ejemplos adicionales se muestran con detalle más adelante.

Los polipéptidos variantes PS4 pueden comprender una o más mutaciones adicionales además de las posiciones mostradas anteriormente. Pueden ser una, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más mutaciones preferiblemente sustituciones además de las ya mostradas. También pueden incluirse otras mutaciones, tales como deleciones, inserciones, sustituciones, transversiones, transiciones e inversiones, en una o más localizaciones. Además, las variantes PS4 no necesitan tener todas las sustituciones en las posiciones listadas. De hecho, pueden tener una, dos, tres, cuatro, o cinco sustituciones ausentes, es decir, el residuo de aminoácido de tipo salvaje está presente en dichas posiciones.

Polipéptidos variantes PS4 basados en secuencias de tipo salvaje

Cuando el polipéptido parental comprende una secuencia de tipo salvaje, los polipéptidos variantes PS4 pueden comprender una secuencia de tipo salvaje, pero con una mutación en una cualquiera o más de las posiciones 121, 161 y 223, preferiblemente 121F, 121Y, 121W, 161A, 223E ó 223K, más preferiblemente G121F, G121Y, G121W, S161A, G223E o G223K.

Los polipéptidos variantes PS4 pueden comprender una secuencia de tipo salvaje, o una secuencia como se muestra en el párrafo precedente, pero con una mutación en una cualquiera o más de las posiciones 146, 157, 158, 198, 229, 303, 306, 309, 316 ó 353, preferiblemente 146G, 146M, 157M, 158T, 158A, 158S, 198W, 198F, 229P, 303E, 303D, 306T, 306G, 309P, 316S, 316P, 316K, 316Q ó 353T, más preferiblemente 146G, 157M, 158T, 198W, 229P, 303E, 303D, 306T, 306G, 309P, 316S, 316P ó 353T.

Los polipéptidos variantes PS4 pueden comprender una secuencia de tipo salvaje, o una secuencia como se muestra en los dos párrafos precedentes, pero con una mutación en una cualquiera o más de las posiciones 26, 70, 145, 188, 272 ó 339, preferiblemente 26E, 26D, 70D, 145D, 188S, 188T, 188H, 272Q, 339A ó 339E, más preferiblemente N26E, N26D, G70D, N145D, G188S, G188T, G188H, H272Q, W339A o W339E.

En general, cualquier combinación de las posiciones, sustituciones y mutaciones específicas puede combinarse de cualquier manera y en cualquier número para producir los polipéptidos variantes PS4 descritos en la presente memoria.

Así, describimos polipéptidos variantes PS4 basados en una secuencia parental PS4 de tipo salvaje, preferiblemente, una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophilia* que tiene una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1. Así, el polipéptido variante PS4 puede comprender una secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1, pero con una cualquiera o más mutaciones en las posiciones mostradas anteriormente. Los polipéptidos variantes PS4 también pueden estar basados en una secuencia de enzima no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri* de tipo salvaje mostrada como SEQ ID NO: 7 más adelante, pero con una cualquiera o más mutaciones en las posiciones mostradas anteriormente.

Aunque los polipéptidos variantes PS4 pueden estar basados en secuencias parentales PS4 de tipo salvaje, los polipéptidos variantes PS4 están basados preferiblemente en versiones preparadas por ingeniería (o mutadas) de secuencias parentales PS4 de tipo salvaje. De acuerdo con esto, las secuencias parentales comprenden secuencias

PS4 ya mutadas. Dichas secuencias pueden hacerse *de novo*, o mediante mutación de una secuencia base, una o más veces, como se describe con más detalle más adelante.

Posiciones 121, 161 y/o 223

5 El polipéptido variante PS4 puede comprender una secuencia de tipo salvaje, o secuencia mutante siendo una variante de una secuencia de tipo salvaje, tal como una secuencia ya mutada, con sustituciones en una o más posiciones tales como 121, 161 y 223.

Así, en general, la mutación o mutaciones objeto en la posición o posiciones relevantes pueden combinarse ventajosamente con una única mutación adicional en una, dos o todas las posiciones 121, 161 ó 223.

10 La sustitución en la posición 121, cuando está presente, se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: 121F, 121Y, 121W, 121H, 121A, 121M, 121G, 121S, 121T, 121D, 121E, 121L, 121K y 121V. Preferiblemente, la sustitución en la posición 121 es 121F, 121Y ó 121W. La sustitución en la posición 161, cuando está presente, es preferiblemente 161A, más preferiblemente S161A. Cuando la posición 161 está mutada, también puede estar presente una mutación adicional en la posición 160, preferiblemente 160D, más preferiblemente E160D.

15 La sustitución en la posición 223, cuando está presente, se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en: 223K, 223E, 223V, 223R, 223A, 223P y 223D. Más preferiblemente, la sustitución 223 es 223E ó 223K. En realizaciones particularmente preferidas, la sustitución o sustituciones adicionales se seleccionan del grupo que consiste en: G121F, G121Y, G121W, 161A, 223E y 223K.

En una realización particularmente preferida, el polipéptido variante PS4 comprende al menos las tres sustituciones siguientes 121F/Y/W, 161A, 223E/K. También pueden incluirse otras mutaciones, como se muestra más adelante.

20 *Posiciones 146, 157, 158, 198, 229, 303, 306, 309, 316 y 353*

El polipéptido variante PS4 puede comprender una secuencia de tipo salvaje, o secuencia mutante siendo una variante de una secuencia de tipo salvaje, tal como una secuencia ya mutada - incluyendo un polipéptido variante PS4 que tiene una mutación en una o más de las posiciones 121, 161 y 223 - con sustituciones en una o más posiciones tal como las posiciones 146, 157, 158, 198, 229, 303, 306, 309, 316 y 353.

25 *Posiciones 26, 70, 145, 188, 272 y 339*

El polipéptido variante PS4 puede comprender una secuencia de tipo salvaje, o secuencia mutante siendo una variante de una secuencia de tipo salvaje, tal como una secuencia ya mutada - incluyendo un polipéptido variante PS4 que tiene una mutación en una o más de las posiciones 121, 161, 223, 146, 157, 158, 198, 229, 303, 306, 309, 316 y 353.- con sustituciones en una o más posiciones tal como 26, 70, 145, 188, 272 y 339.

30 Así, en general, la mutación o mutaciones objeto en la posición o posiciones relevantes pueden combinarse ventajosamente con una única mutación adicional en una, dos o todas las posiciones 26, 70, 145, 188, 272 y 339.

El polipéptido variante PS4 puede comprender una sustitución en la posición 26, preferiblemente 26E ó 26E. Más preferiblemente, la sustitución en la posición 26 comprende N26E o N26D. Lo más preferiblemente, la sustitución en la posición 26 comprende N26E.

35 El polipéptido variante PS4 puede comprender una sustitución en la posición 70, preferiblemente 70D. Más preferiblemente, la sustitución en la posición 26 comprende G70D.

El polipéptido variante PS4 puede comprender una sustitución en la posición 145, preferiblemente 145D. Más preferiblemente, la sustitución en la posición 145 comprende N145D.

40 El polipéptido variante PS4 puede comprender una sustitución en la posición 188, preferiblemente 188S, 188T ó 188H. Más preferiblemente, la sustitución en la posición 188 comprende G188S, G188T o G188H. Lo más preferiblemente, la sustitución en la posición 188 comprende G188S o G188H.

El polipéptido variante PS4 puede comprender una sustitución en la posición 272, preferiblemente 272Q. Más preferiblemente, la sustitución en la posición 272 comprende H272Q.

45 El polipéptido variante PS4 puede comprender una sustitución en la posición W339A, preferiblemente 339A ó 339E. Más preferiblemente, la sustitución en la posición 339 comprende W339A o W339E

Polipéptidos variantes PS4 basados en secuencias variantes

Combinaciones con las posiciones 33, 34, 121, 134, 141, 157, 178, 179, 223, 307 y/o 334

50 En algunas realizaciones, las secuencias parentales comprenden mutaciones en una o más de, preferiblemente todas, las posiciones 33, 34, 121, 134, 141, 157, 178, 179, 223, 307 y 334 (y de acuerdo con esto los polipéptidos variantes PS4 también contendrán las mutaciones relevantes correspondientes).

En dichas realizaciones, las mutaciones son preferiblemente una o más de, preferiblemente todas de: N33Y, D34N, G121D, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L y S334P.

En dichas realizaciones, el polipéptido variante PS4 puede derivarse convenientemente de una secuencia de enzima no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila* que comprende una secuencia PSac-D34 (SEQ ID NO: 2).

5 *Combinaciones con las posiciones 33, 34, 121, 134, 141, 157, 178, 179, 223, 307 y 334, 121, 161 y/o 223*

Los polipéptidos variantes PS4 pueden comprender además mutaciones en cualquiera de las posiciones 33, 34, 121, 134, 141, 157, 178, 179, 223, 307 y 334 en combinación con mutaciones en cualquiera de las posiciones 121, 161 y/o 223. Así, describimos un polipéptido variante PS4 que comprende cualquier combinación de: (a) una cualquiera o más de las mutaciones en los residuos 33, 34, 121, 134, 141, 157, 178, 179, 223, 307 y 334, preferiblemente N33Y, D34N, G121D, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L y S334P; (b) una cualquiera o más de las mutaciones en las posiciones 121, 161 ó 223, preferiblemente 121F, 121Y, 121W, 161A, 223E ó 223K, más preferiblemente 121F, 161A ó 223E, y (c) una cualquiera o más de las mutaciones en las posiciones 146, 157, 158, 198, 229, 303, 306, 309, 316 ó 353, preferiblemente 146G, 146M, 157M, 158T, 158A, 158S, 198W, 198F, 229P, 303E, 303D, 306T, 306G, 309P, 316S, 316P, 316K, 316Q ó 353T, más preferiblemente 146G, 157M, 158T, 198W, 229P, 303E, 303D, 306T, 306G, 309P, 316S, 316P ó 353T.

En la presente memoria se describe un polipéptido variante PS4 que comprende todas de las mutaciones siguientes mostradas en (a) anteriormente en combinación con una o más de las mutaciones mostradas en (c) anteriormente. También se describe en la presente memoria un polipéptido variante PS4 que comprende todas de las mutaciones siguientes mostradas en (a) anteriormente en combinación con todas las mutaciones mostradas en (b) anteriormente, en combinación con una o más de las mutaciones mostradas en (c) anteriormente.

20 *Polipéptidos variantes PS4 basados en pMD96*

Cuando se incluyen las mutaciones en todos de (a) y (b), el polipéptido variante PS4 puede derivarse convenientemente de una secuencia de enzima no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila* que comprende una secuencia pMD96 (SEQ ID NO: 14).

25 Así, en la presente memoria se describen polipéptidos variantes PS4 mostrados en los Ejemplos 12 a 20, que tienen secuencias SEQ ID NO: 15 a 28. Como se muestra en los Ejemplos, cada uno de estos polipéptidos tiene una o más propiedades mejoradas comparado con su parental.

Otras combinaciones

30 Además, también pueden usarse secuencias parentales que comprenden mutaciones en otras posiciones, por ejemplo, una cualquiera o más de 134, 141, 157, 223, 307 y 334. Opcionalmente, éstas pueden incluir mutaciones en una o ambas de las posiciones 33 y 34.

Así, la secuencia parental puede comprender una o más mutaciones en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 134, 141, 157, 223, 307, 334 y opcionalmente 33 y 34, (y de acuerdo con esto por supuesto los polipéptidos variantes PS4 también contendrán las mutaciones relevantes correspondientes).

35 En algunas realizaciones, los polipéptidos parentales comprenden sustituciones arginina en la posición 134, prolina en la posición 141 y prolina en la posición 334, por ejemplo, G134R, A141P y S334P.

En realizaciones adicionales, el polipéptido parental comprende además una mutación en la posición 121. El polipéptido parental puede comprender además una mutación en la posición 178. Puede comprender además una mutación en la posición 179. Puede comprender aún además una mutación en la posición 87. Las sustituciones respectivas particularmente preferidas son preferiblemente 121D, más preferiblemente G121D, preferiblemente 178F, más preferiblemente L178F, preferiblemente 179T, más preferiblemente A179T y preferiblemente 87S, más preferiblemente G87S.

45 Los residuos en estas posiciones pueden sustituirse por un número de residuos, por ejemplo, I157V o I157N o G223L o G223I o G223S o G223T o H307I o H307V o D34G o D34A o D34S o D34T o A179V. Sin embargo, los polipéptidos parentales preferiblemente comprenden las sustituciones I157L, G223A, H307L, L178F y A179T (opcionalmente N33Y, D34N).

50 En una realización altamente preferida, los polipéptidos variantes PS4 comprenden una sustitución en una cualquiera o más de las posiciones 146, 157, 158, 198, 229, 303, 306, 309, 316 y 353, preferiblemente 146G, 157M, 158T, 198W, 229P, 303E, 303D, 306T, 306G, 309P, 316S, 316P ó 353T, así como una o más de las sustituciones siguientes: G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, N33Y y D34N, junto con una o ambas de L178F y A179T.

Polipéptidos variantes PS4 basados en PSac-D20

Una variante PS4 puede estar basada en una secuencia de enzima no maltogénica parental de *Pseudomonas saccharophila*, PSac-D20 (SEQ ID NO: 3).

En dicha realización, los polipéptidos variantes PS4 comprenden una sustitución en una cualquiera o más de las posiciones 146, 157, 158, 198, 229, 303, 306, 309, 316 y 353, preferiblemente 146G, 157M, 158T, 198W, 229P, 303E, 303D, 306T, 306G, 309P, 316S, 316P ó 353T, así como una o más de las sustituciones siguientes: G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, N33Y, D34N y G121D, junto con una o ambas de L178F y A179T.

5 *Polipéptidos variantes PS4 basados en PSac-D14*

Una variante PS4 puede estar basada en una secuencia de enzima no maltogénica parental de *Pseudomonas saccharophila* PSac-D14 (SEQ ID NO: 4).

10 En dicha realización, por lo tanto, los polipéptidos variantes PS4 comprenden una sustitución en una cualquiera o más de las posiciones 146, 157, 158, 198, 229, 303, 306, 309, 316 y 353, preferiblemente 146G, 157M, 158T, 198W, 229P, 303E, 303D, 306T, 306G, 309P, 316S, 316P ó 353T, así como una o más de las sustituciones siguientes: G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, N33Y, D34N, G121D y G87S, junto con una o ambas de L178F y A179T.

Polipéptidos variantes PS4 basados en pMD55

15 Una variante PS4 puede estar basada en una secuencia de enzima no maltogénica parental de *Pseudomonas saccharophila* pMD55 (SEQ ID NO: 13).

20 En dicha realización, los polipéptidos variantes PS4 pueden comprender una sustitución en una cualquiera o más de las posiciones 146, 157, 158, 198, 229, 303, 306, 309, 316 y 353, preferiblemente 146G, 157M, 158T, 198W, 229P, 303E, 303D, 306T, 306G, 309P, 316S, 316P ó 353T, así como una o más de las sustituciones siguientes: G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, N33Y, D34N, G121F y G87S, junto con una o ambas de L178F y A179T. El polipéptido variante PS4 se puede derivar de un polipéptido parental que tiene dichas sustituciones.

Polipéptidos variantes PS4 basados en polipéptidos parentales de Pseudomonas stutzeri

Las variantes de PS4 se pueden derivar de una secuencia de enzima no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri*, preferiblemente mostrada como SEQ ID NO: 7 más adelante.

25 De acuerdo con esto, el polipéptido variante PS4 se puede derivar de una secuencia PStu-D34 (SEQ ID NO: 8). Describimos además polipéptidos variantes PS4 basados en una secuencia de enzima no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri* e incluyendo las sustituciones G121 y/o G87. Éstas pueden comprender las sustituciones siguientes: G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, N33Y, D34N y G121D, junto con una o ambas de L178F y A179T, así como polipéptidos variantes PS4 que comprenden las sustituciones siguientes: G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, N33Y, D34N, G121D y G87S, junto con una o ambas de L178F y A179T.

30 Por lo tanto, un polipéptido variante PS4 se puede derivar de una secuencia de enzima no maltogénica parental de *Pseudomonas stutzeri*, secuencia parental que puede tener una secuencia PStu-D20 (SEQ ID NO: 9), que comprende G121D, o una secuencia PStu-D14 (SEQ ID NO: 10), que comprende además G87S.

Ácidos nucleicos variantes PS4

35 También describimos ácidos nucleicos PS4 que tienen secuencias que corresponden a o codifican las alteraciones en las secuencias de polipéptido variante PS4, para uso en la producción de dichos polipéptidos para los propósitos descritos en la presente memoria. Así, proporcionamos ácidos nucleicos capaces de codificar cualquier secuencia de polipéptido mostrada en este documento.

40 El experto en la técnica será consciente de la relación entre la secuencia de ácido nucleico y la secuencia de polipéptido, en particular, el código genético y la degeneración de este código, y será capaz de construir dichos ácidos nucleicos PS4 sin dificultad. Por ejemplo, será consciente de que para cada sustitución de aminoácidos en la secuencia del polipéptido variante PS4, puede haber uno o más codones que codifican el aminoácido sustituido. De acuerdo con esto, será evidente que, dependiendo de la degeneración del código genético respecto a ese residuo de aminoácido particular, pueden generarse una o más secuencias de ácido nucleico PS4 correspondientes a esa secuencia de polipéptido variante PS4. Además, cuando el polipéptido variante PS4 comprende más de una sustitución, por ejemplo, A141P/G223A, los ácidos nucleicos PS4 correspondientes pueden comprender combinaciones por parejas de los codones que codifican respectivamente los dos cambios de aminoácidos.

45 Las secuencias de ácido nucleico variante PS4 se pueden derivar de ácidos nucleicos parentales que codifican cualquiera de los polipéptidos parentales descritos anteriormente. En particular, los ácidos nucleicos parentales pueden comprender secuencias de tipo salvaje, por ejemplo, SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 12. Los ácidos nucleicos variantes PS4 pueden comprender por lo tanto ácidos nucleicos que codifican exoamilasas no maltogénicas de tipo salvaje, pero que codifican otro aminoácido en la posición relevante en lugar del residuo de aminoácido de tipo salvaje. Las secuencias de ácido nucleico variante PS4 también pueden comprender secuencias de tipo salvaje con una o más mutaciones, por ejemplo, que codifican polipéptidos parentales descritos anteriormente bajo "Combinaciones".

Se entenderá que las secuencias de ácido nucleico que no son idénticas a las secuencias particulares de ácido nucleico variante PS4, pero que están relacionadas con éstas, también serán útiles para los métodos y composiciones descritos aquí, tal como una variante, homólogo, derivado o fragmento de una secuencia de ácido nucleico variante PS4, o un complemento o una secuencia capaz de hibridar de éstas. A no ser que el contexto dicte otra cosa, el término "ácido nucleico variante PS4" debe tomarse como que incluye cada una de estas entidades listadas anteriormente.

Las mutaciones en la secuencia de aminoácidos y secuencia de ácido nucleico pueden hacerse mediante cualquiera de varias técnicas, como se conoce en la técnica. Las secuencias variantes pueden hacerse fácilmente usando cualquiera de las técnicas de mutagénesis conocidas, por ejemplo, mutagénesis dirigida a sitio usando PCR con los cebadores de oligonucleótido apropiados, mutagénesis de adición 5', mutagénesis de cebadores con emparejamiento erróneo, etc. alternativamente, o además, las secuencias de ácido nucleico variante PS4 pueden hacerse *de novo*.

En realizaciones particularmente preferidas, las mutaciones se introducen en secuencias parentales mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) usando cebadores apropiados, como se ilustra en los Ejemplos. Es por lo tanto posible alterar la secuencia de un polipéptido introduciendo cualesquiera sustituciones deseadas de aminoácidos en un polipéptido parental, preferiblemente que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, tal como en una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* o de *Pseudomonas stutzeri* a nivel de aminoácidos o ácido nucleico, como se describe. Describimos un método en el que la secuencia de una exoamilasa no maltogénica se altera mediante la alteración de la secuencia de un ácido nucleico que codifica la exoamilasa no maltogénica.

Sin embargo, se apreciará por supuesto que no es necesario de hecho que el polipéptido variante PS4 derive realmente de una secuencia de polipéptido o ácido nucleico de tipo salvaje, por ejemplo, por mutación paso a paso. En lugar de esto, una vez se establece la secuencia del polipéptido variante PS4, el experto en la técnica puede hacer fácilmente esa secuencia a partir del tipo salvaje con todas las mutaciones, por medios conocidos en la técnica, por ejemplo, usando cebadores de oligonucleótidos apropiados y PCR. De hecho, el polipéptido variante PS4 puede prepararse *de novo* con todas sus mutaciones, a través, por ejemplo, de metodología de síntesis de péptidos.

En general, sin embargo, los polipéptidos y/o ácidos nucleicos variantes PS4 se derivan o pueden derivarse de una secuencia "precursora". El término "precursora" tal y como se usa en la presente memoria significa una enzima que precede a la enzima que se modifica según los métodos y composiciones descritos aquí. Un precursor por lo tanto incluye una enzima usada para producir una enzima modificada. Así, el precursor puede ser una enzima que se modifica por mutagénesis como se describe en otro lugar de este documento. Asimismo, el precursor puede ser una enzima de tipo salvaje, una enzima de tipo salvaje variante o una enzima ya mutada.

Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes PS4 pueden producirse por cualquier medio conocido en la técnica. Específicamente, pueden expresarse a partir de sistemas de expresión, que pueden tener una naturaleza *in vitro* o *in vivo*. Específicamente, describimos plásmidos y vectores de expresión que comprenden secuencias de ácido nucleico PS4, preferiblemente capaces de expresar polipéptidos variantes PS4. También se describen células y células huésped que comprenden y preferiblemente se transforman con dichos ácidos nucleicos PS4, plásmidos y vectores, y debe quedar claro que éstas también están englobadas en este documento.

En realizaciones preferidas, la secuencia de polipéptido variante PS4 se usa como un aditivo alimenticio en una forma aislada. El término "aislado" significa que la secuencia carece al menos sustancialmente de al menos otro componente con el que la secuencia está asociada naturalmente en la naturaleza y como se encuentra en la naturaleza. En un aspecto, preferiblemente la secuencia está en una forma purificada. El término "purificada" significa que la secuencia está en un estado relativamente puro - por ejemplo, al menos aproximadamente 90% pura, o al menos aproximadamente 95% pura, o al menos aproximadamente 98% pura.

Numeración de posiciones

Todas las posiciones referidas en el presente documento por 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 FSAIWMPVPW
61  RDFSSWTDGG KSGGGEGYFW HDFNKNRGYR SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVFNHMNR
121 GYPDKEINLP AGQGFWRNDC ADPCNYPNDC DDGDRFIGGE SDLN'TGHPQI YGMFRDELAN
181 LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKGPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVDFDALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHD'TGYS PG
301 QNGGQHWWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWSHMYDWG YGDFIRQLIQ VRR'TAGVRAD
361 SAISFHSYYS GLVATVSGSQ QTLVVVALNSD LANPGQVAVSG SFSEAVNASN GQVRVWRS GS
421 GDGGGNDGGE GGLVNVNFRD DNGV'TQMGS VYAVGNVSQL GNWSPASAVR LTD'TSSYPTW
481 KGSIALPDGQ NVEWKCLIRN EADATLVRQW QSGGNNQVQA AAGASTSGSF

```

La secuencia de referencia se deriva de la secuencia de *Pseudomonas saccharophila* que tiene el número de acceso SWISS-PROT P22963, pero sin la secuencia señal MSHILRAAVLAAVLLPFPALA.

5 El dominio de unión a almidón C-terminal EGGLVNVNFR CDNGVTQMGD SVYAVGNVSQ LGNWSPASAV RLTDTSYPT WKGSIAPDG QNVEWKCLIR NEADATLVRQ WQSGGNNQVQ AAAGASTSGS F puede ignorarse opcionalmente. Alternativamente, puede incluirse.

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

15 Por lo tanto, el sistema de numeración, aunque puede usar una secuencia específica como un punto de referencia básico, también es aplicable a todas las secuencias homólogas relevantes. Por ejemplo, la numeración de posición puede aplicarse a secuencias homólogas de otras especies de *Pseudomonas*, o secuencias homólogas de otras bacterias. Preferiblemente, dichos homólogos tienen 60% o más de homología, por ejemplo 70% o más, 80% o más, 90% o más ó 95% o más de homología, con la secuencia de referencia SEQ ID NO: 1 anterior, o las secuencias que tienen números de acceso SWISS-PROT P22963 o P13507, preferiblemente con todas estas secuencias. La homología de secuencia entre proteínas puede averiguarse usando programas de alineamiento muy conocidos y técnicas de hibridación descritas en la presente memoria. Dichas secuencias homólogas, así como los equivalentes funcionales descritos más adelante, se referirán en este documento como la "familia PS4".

25 Además, y como se ha indicado anteriormente, el sistema de numeración usado en este documento hace referencia a una secuencia de referencia SEQ ID NO: 1, que se deriva de la secuencia de *Pseudomonas saccharophila* que tiene el número de acceso SWISS-PROT P22963, pero sin la secuencia señal MSHILRAAVLAAVLLPFPALA. Esta secuencia señal está localizada N terminal respecto a la secuencia de referencia y consiste en 21 residuos de aminoácidos. De acuerdo con esto, será trivial identificar los residuos particulares que se van a mutar o sustituir en secuencias correspondientes que comprenden la secuencia señal, o de hecho secuencias correspondientes que comprenden cualquier otra extensión o delección N- o C- terminal. En relación con adiciones o delecciones N-terminales, todo lo que se requiere es compensar la numeración de las posiciones por el número de residuos insertados o delecionados. Por ejemplo, la posición 1 en SEQ ID NO: 1 corresponde a la posición 22 en una secuencia con la secuencia señal.

Enzima/polipéptido parental

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

40 El término "enzima parental" tal y como se usa en est documento significa la enzima que tiene una estructura química cercana, preferiblemente la más cercana, a la variante resultante, es decir, el polipéptido o ácido nucleico variante PS4. La enzima parental puede ser una enzima precursora (es decir, la enzima que está mutada realmente) o puede prepararse *de novo*. La enzima parental puede ser una enzima de tipo salvaje, o puede ser una enzima de tipo salvaje que comprende una o más mutaciones.

El término "precursor" tal y como se usa en la presente memoria 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 por mutagénesis. Asimismo, el precursor puede ser una enzima de tipo salvaje, una enzima de tipo salvaje variante o una enzima ya mutada.

45 El término "de tipo salvaje" es un término de la técnica entendido por los expertos en la técnica y significa un fenotipo que es característico de la mayoría de los miembros de una especie naturales 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 encontrada naturalmente en la mayoría de los miembros de la especie relevante. Generalmente, la enzima de tipo salvaje relevante en relación con los polipéptidos variantes descritos aquí es la enzima de tipo salvaje correspondiente relacionada más de cerca en términos de homología de secuencia. Sin embargo, cuando una secuencia de tipo salvaje particular se ha usado como la base para producir un polipéptido variante PS4 como se describe aquí, ésta será la secuencia de tipo salvaje correspondiente independientemente de la existencia de otra secuencia de tipo salvaje que está relacionada más de cerca en términos de homología de secuencia de aminoácidos.

55 La enzima parental es preferiblemente un polipéptido que preferiblemente presenta actividad exoamilasa no maltogénica. Preferiblemente, la enzima parental es una exoamilasa no maltogénica en sí misma. Por ejemplo, la enzima parental puede ser una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila*, tal como un polipéptido que tiene el número de acceso SWISS-PROT P22963, o una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri*, tal como un polipéptido que tiene el número de acceso SWISS-PROT P13507.

Otros miembros de la familia PS4 pueden usarse como enzimas parentales; dichos "miembros de la familia PS4" serán generalmente similares a, homólogos a, o equivalentes funcionalmente a cualquiera de estas dos enzimas, y pueden identificarse por métodos estándar, tal como cribado por hibridación de una biblioteca adecuada usando sondas, o por análisis de la secuencia del genoma.

- 5 En particular, los equivalentes funcionales de cualquiera de estas dos enzimas, así como otros miembros de la "familia PS4" también pueden usarse como puntos de partida o polipéptidos parentales para la generación de polipéptidos variantes PS4 como se describe aquí.

10 Un "equivalente funcional" de una proteína significa algo que comparte una o más, preferiblemente sustancialmente todas, las funciones de esa proteína. Preferiblemente, dichas funciones son funciones biológicas, preferiblemente funciones enzimáticas, tal como actividad amilasa, preferiblemente actividad exoamilasa no maltogénica. En relación con una enzima parental, el término "equivalente funcional" preferiblemente significa una molécula que tiene una función similar o idéntica a una molécula parental. La molécula parental puede ser una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila* o una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri* o un polipéptido obtenido de otras fuentes.

15 El término "equivalente funcional" en relación con una enzima parental que es una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila*, tal como polipéptido que tiene el número de acceso SWISS-PROT P22963, o una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri*, tal como un polipéptido que tiene el número de acceso SWISS-PROT P13507 significa que el equivalente funcional podría obtenerse de otras fuentes. La enzima funcionalmente equivalente puede tener una secuencia de aminoácidos diferente, pero tendrá actividad exoamilasa no maltogénica. Los ejemplos de ensayos para determinar la funcionalidad se describen en la presente memoria y son conocidos para un experto en la técnica.

25 En realizaciones altamente preferidas, el equivalente funcional tendrá homología de secuencia con cualquiera de las exoamilasas no maltogénicas de *Pseudomonas saccharophila* y *Pseudomonas stutzeri* mencionadas anteriormente, preferiblemente ambas. El equivalente funcional también puede tener homología de secuencia con cualquiera de las secuencias mostradas como SEQ ID NOs: 1 a 14, preferiblemente SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 7 o ambas. La homología de secuencia entre dichas secuencias es preferiblemente al menos 60%, preferiblemente 65% o más, preferiblemente 75% o más, preferiblemente 80% o más, preferiblemente 85% o más, preferiblemente 90% o más, preferiblemente 95% o más. Dichas homologías de secuencia pueden generarse por cualquiera de varios programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo, BLAST o FASTA, etc. Un programa informático adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (University of Wisconsin, EEUU; Devereux et al., 1984, Nucleic Acids Research 12:387). Los ejemplos de otro software que puede realizar comparaciones de secuencias incluyen, pero no están limitados a, el paquete BLAST (véase Ausubel *et al.*, 1999 *ibid* - Capítulo 18), FASTA (Atschul et al., 1990, J. Mol. Biol., 403-410) y el paquete de herramientas de comparación GENWORKS. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para la búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel *et al.*, 1999 *ibid*, páginas 7-58 a 7-60). Sin embargo, se prefiere usar el programa GCG Bestfit.

35 En otras realizaciones, los equivalentes funcionales serán capaces de hibridar específicamente con cualquiera de las secuencias mostradas anteriormente. Los métodos para determinar si una secuencia es capaz de hibridar 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 altamente preferidas, los equivalentes funcionales serán capaces de hibridar en condiciones astringentes, por ejemplo, 65°C y 0,1xSSC {1xSSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na₃ Citrato pH 7,0}.

40 Por ejemplo, los equivalentes funcionales que tienen homología de secuencia con exoamilasas no maltogénicas de *Pseudomonas saccharophila* y *Pseudomonas stutzeri* son adecuados para uso como enzimas parentales. Dichas secuencias pueden diferenciarse de la secuencia de *Pseudomonas saccharophila* en una cualquiera o más posiciones. Además, las exoamilasas no maltogénicas de otras cepas de *Pseudomonas* spp, tal como ATCC17686, también pueden usarse como un polipéptido parental. Los residuos de polipéptido variante PS4 pueden insertarse en cualquiera de estas secuencias parentales para generar las secuencias de polipéptido variante PS4.

50 Se entenderá que cuando se desea que los polipéptidos variantes PS4 comprendan adicionalmente una o más mutaciones, como se ha mostrado anteriormente, pueden hacerse las mutaciones correspondientes en las secuencias de ácido nucleico de los equivalentes funcionales de la exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas* spp, así como otros miembros de la "familia PS4", con el fin de que puedan usarse como puntos de partida o polipéptidos parentales para la generación de polipéptidos variantes PS4 como se describe aquí.

Específicamente incluidos en el término "polipéptidos variantes PS4" son los polipéptidos descritos en:

55 US 60/485.413, 60/485.539 y 60/485.616; PCT/US2004/021723 y PCT/US2004/021739; US 10/886.905 y 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.

Dichos polipéptidos son adecuados para uso en las aplicaciones descritas en la presente memoria, en particular, como aditivos alimenticios, para tratar almidón como se describe, para preparar un producto alimenticio, para

preparar un producto de panadería, para la formulación de composiciones mejoradoras, para la formulación de combinaciones, etc.

Modificación de secuencias parentales

5 Las enzimas parentales pueden modificarse a nivel de aminoácidos o a nivel de ácido nucleico para generar las secuencias variantes PS4 como se describe aquí. Por lo tanto, proporcionamos la generación de polipéptidos variantes PS4 mediante la introducción de uno o más cambios de codones correspondientes en la secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido de exoamilasa no maltogénica.

10 La numeración de los ácidos nucleicos debe ser preferiblemente con referencia a la numeración de posiciones de una secuencia de nucleótidos de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO: 6. Alternativamente, o además, puede hacerse referencia a la secuencia con el número de acceso GenBank X16732. En realizaciones preferidas, la numeración de los ácidos nucleicos debe ser preferiblemente con referencia a la secuencia de nucleótidos mostrada como SEQ ID NO: 6. Sin embargo, como con la numeración de los residuos de aminoácidos, la numeración de residuos de esta secuencia debe usarse sólo para propósitos de referencia. En particular, se apreciará que los cambios de codones anteriores pueden hacerse en cualquier secuencia de ácido nucleico de la familia PS4. Por ejemplo, los cambios de secuencia pueden hacerse en la secuencia de ácido nucleico de exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila* o *Pseudomonas stutzeri* (por ejemplo, X16732, SEQ ID NO: 6 o M24516, SEQ ID NO: 12).

20 La enzima parental puede comprender la enzima "completa", es decir, en su longitud completa como ocurre en la naturaleza (o como mutada), o puede comprender una forma truncada de ésta. La variante PS4 derivada de éstas puede estar de acuerdo con esto así truncadas, o ser de "longitud completa". El truncamiento puede estar en el extremo N-terminal, o el extremo C-terminal, preferiblemente el extremo C-terminal. La enzima parental o variante PS4 puede carecer de una o más partes, tal como subsecuencias, secuencias señal, dominios o restos, ya sean activos o no etc. Por ejemplo, la enzima parental o el polipéptido variante PS4 puede carecer de una secuencia señal, como se ha descrito anteriormente. Alternativamente, o además, la enzima parental o la variante PS4 puede carecer de uno o más dominios catalíticos o de unión.

25 En realizaciones altamente preferidas, la enzima parental o variante PS4 puede 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 PS4 pueden tener sólo la secuencia hasta la posición 429, respecto a la numeración de una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO: 1. Debe indicarse que éste es el caso para las variantes PS4 pSac-d34, pSac-D20 y pSac-D14.

30 En otras realizaciones, la enzima parental o variante PS4 puede comprender una enzima "completa", es decir, en su longitud completa como ocurre en la naturaleza (o como mutada), junto con una o más secuencias de aminoácidos adicionales en el extremo N o extremo C. Por ejemplo, la enzima parental o polipéptido variante PS4 puede comprender un único residuo de aminoácido extra en el extremo C o extremo N, por ejemplo, M, A, G, etc. Preferiblemente, el residuo de aminoácido adicional está presente en el extremo N. Cuando se incluyen uno o más residuos adicionales, la numeración de las posiciones se compensará por la longitud de la adición.

Amilasa

Los polipéptidos variantes PS4 comprenden generalmente actividad amilasa.

40 El término "amilasa" se usa en su sentido normal - por ejemplo, una enzima que *inter alia* es capaz de catalizar la degradación de almidón. En particular, hay hidrolasas que son capaces de escindir uniones O-glicosídicas α -D-(1→4) en el almidón.

45 Las amilasas son enzimas que degradan almidón, clasificadas como hidrolasas, que escinden uniones O-glicosídicas α -D-(1→4) en el almidón. Generalmente, las α -amilasas (E.C. 3.2.1.1, α -D-(1→4)-glucan glucanohidrolasa) se definen como enzimas con actividad endo que escinden uniones O-glicosídicas α -D-(1→4) en la molécula de almidón de una manera aleatoria. Por el contrario, las enzimas amilolíticas con actividad exo, tal como β -amilasas (E.C. 3.2.1.2, α -D-(1→4)-glucan maltohidrolasa), y algunas amilasas específicas de producto como alfa-amilasa maltogénica (E.C. 3.2.1.133) escinden 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 glucosidasa), glucoamilasa (E.C. 3.2.1.3, α -D-(1→4)-glucan glucohidrolasa), y amilasas específicas de producto pueden producir malto-oligosacáridos de una longitud específica a partir de almidón.

Exoamilasa no maltogénica

55 Los polipéptidos variantes PS4 descritos en este documento se derivan de (o son variantes de) polipéptidos que preferiblemente presentan actividad exoamilasa no maltogénica. Preferiblemente, estas enzimas parentales son exoamilasas no maltogénicas en sí mismas. Los polipéptidos variantes PS4 en sí mismos en realizaciones altamente preferidas también presentan actividad exoamilasa no maltogénica.

En realizaciones altamente preferidas, el término "enzima exoamilasa no maltogénica" tal y como se usa en este documento debe tomarse que significa que la enzima no degrada inicialmente almidón en cantidades sustanciales de maltosa como se analiza según el procedimiento de determinación del producto como se describe en este documento.

- 5 En realizaciones altamente preferidas, la exoamilasa no maltogénica comprende una exo-maltotetrahidrolasa. La exo-maltotetrahidrolasa (E.C.3.2.1.60) se conoce más formalmente como glucan 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa. Esta enzima hidroliza las uniones 1,4-alfa-D-glucosídicas en polisacáridos amiláceos de manera que se eliminan residuos de maltotetraosa sucesivos desde los extremos de cadena no reductores.

Las exoamilasas no maltogénicas se describen con detalle en la Patente US número 6.667.065.

10 Ensayos para actividad exoamilasa no maltogénica

El sistema siguiente se usa para caracterizar los polipéptidos que tienen actividad exoamilasa no maltogénica que son adecuados para uso según los métodos y composiciones descritos aquí. Este sistema puede usarse por ejemplo para caracterizar los polipéptidos parentales o variantes PS4 descritos aquí.

- 15 Como información de fondo inicial, la amilopectina de maíz ceroso (que se puede obtener como WAXILYS 200 de Roquette, Francia) es un almidón con un contenido muy alto en amilopectina (por encima del 90%). Se hierven 20 mg/ml de almidón de maíz ceroso durante 3 min, en un tampón de 50 mM MES (ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico), 2 mM cloruro de calcio, pH 6,0 y posteriormente se incubaba a 50°C y se usa en media hora.

- 20 Una unidad de la exoamilasa no maltogénica se define como la cantidad de enzima que libera productos de hidrólisis equivalentes a 1 μ mol de azúcar reductor por min, cuando se incubaba a 50 grados C en un tubo de ensayo con 4 ml de 10 mg/ml almidón de maíz ceroso en 50 mM MES, 2 mM cloruro de calcio, pH 6,0 preparado como se ha descrito anteriormente. Los azúcares reductores se miden usando maltosa como estándar 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.

- 25 El patrón de los productos de hidrólisis de la exoamilasa no maltogénica se determina incubando 0,7 unidades de exoamilasa no maltogénica durante 15 ó 300 min, a 50°C en un tubo de ensayo con 4 ml de 10 mg/ml almidón de maíz ceroso en el tampón preparado como se ha descrito anteriormente. La reacción se para sumergiendo el tubo de ensayo durante 3 min en un baño de agua hirviendo.

- 30 Los productos de hidrólisis se analizan y cuantifican por HPLC de intercambio aniónico usando una columna Dionex PA 100 con acetato de sodio, hidróxido de sodio y agua como eluyentes, con detección amperométrica pulsada y con maltooligosacáridos lineales conocidos de glucosa a maltoheptaosa como estándares. El factor de respuesta usado para maltooctaosa a maltodecaosa es el factor de respuesta encontrado para maltoheptaosa.

- 35 Preferiblemente, los polipéptidos variantes PS4 tienen actividad exoamilasa no maltogénica de manera que si una cantidad de 0,7 unidades de dicha exoamilasa no maltogénica se incubaran 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 pre-hervido por ml de disolución tamponada que contiene 50 mM 2-(ácido N-morfolino)etano sulfónico y 2 mM cloruro de calcio entonces la enzima rendiría producto(s) de hidrólisis que consistirían en uno o más malto-oligosacáridos lineales de dos a diez unidades de D-glucopiranosilo y opcionalmente glucosa; tal como 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 hidrólisis consistiría en maltooligosacáridos lineales de tres a diez unidades de D-glucopiranosilo, preferiblemente de maltooligosacáridos lineales que consisten en cuatro a ocho unidades de D-glucopiranosilo.

- 45 Para facilitar la referencia, y para los presentes propósitos, 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 pre-hervido por ml de disolución tamponada que contiene 50 mM 2-(ácido N-morfolino)etano sulfónico y 2 mM cloruro de calcio, puede referirse como el "Ensayo de Incubación del Almidón de Maíz Ceroso".

- 50 Así, expresado de forma alternativa, los polipéptidos variantes PS4 preferidos que son exoamilasas no maltogénicas se caracterizan por tener la capacidad en el ensayo de incubación de almidón de maíz ceroso de rendir producto(s) de hidrólisis que consistirían en uno o más malto-oligosacáridos lineales de dos a diez unidades de D-glucopiranosilo y opcionalmente glucosa; tal como al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80% y lo más preferiblemente al menos 85% en peso de dichos producto(s) de hidrólisis consistiría en maltooligosacáridos lineales de tres a diez unidades de D-glucopiranosilo, preferiblemente de maltooligosacáridos lineales que consisten en cuatro a ocho unidades de D-glucopiranosilo.

- 55 Los productos de hidrólisis en el ensayo de incubación del 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 hidrólisis en el ensayo de incubación del almidón de maíz ceroso también pueden incluir otros productos hidrolíticos. No obstante, las cantidades en % en peso de maltooligosacáridos lineales de tres a diez unidades de D-

- glucopiranosilo se basan en la cantidad del producto de 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 en % en peso de maltooligosacáridos lineales de tres a diez unidades de D-glucopiranosilo no se basan en la cantidad de productos de hidrólisis distintos de uno o más malto-oligosacáridos lineales de dos a diez unidades de D-glucopiranosilo y glucosa.
- Los productos de hidrólisis pueden analizarse por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, los productos de hidrólisis pueden analizarse por HPLC de intercambio aniónico usando una columna Dionex PA 100 con detección amperométrica pulsada y con, por ejemplo, maltooligosacáridos lineales conocidos de glucosa a maltoheptaosa como estándares.
- Para facilitar la referencia, y para los presentes propósitos, la característica de analizar el o los productos de hidrólisis usando HPLC de intercambio aniónico usando una columna Dionex PA 100 con detección amperométrica pulsada y con maltooligosacáridos lineales conocidos de glucosa a maltoheptaosa usados como estándares, puede referirse como "analizar por intercambio aniónico". Por supuesto, y como se acaba de indicar, serían suficientes otras técnicas analíticas, así como otras técnicas de intercambio aniónico específicas.
- Así, expresado de forma alternativa, un polipéptido variante PS4 preferido es uno que tiene exoamilasa no maltogénica tal que tiene la capacidad en un ensayo de incubación de almidón de maíz ceroso de rendir producto o productos de hidrólisis que consistirían en uno o más malto-oligosacáridos lineales de dos a diez unidades de D-glucopiranosilo y opcionalmente glucosa, siendo capaces dichos productos de hidrólisis de ser analizados por intercambio aniónico; de manera que al menos 60%, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80% y lo más preferiblemente al menos 85% en peso de dicho o dichos productos de hidrólisis consistirían en maltooligosacáridos lineales de tres a diez unidades de D-glucopiranosilo, preferiblemente de maltooligosacáridos lineales que consisten en de cuatro a ocho unidades de D-glucopiranosilo.
- Tal y como se usa en la presente memoria, el término "malto-oligosacárido lineal" se usa en el sentido normal como que significa 2-10 unidades de α -D-glucopiranosas unidas por un enlace α -(1 \rightarrow 4).
- En realizaciones altamente preferidas, los polipéptidos PS4 descritos aquí tienen actividad exoamilasa mejorada, preferiblemente actividad exoamilasa no maltogénica, cuando se comparan con el polipéptido parental, preferiblemente cuando se ensayan en las mismas condiciones. En particular, en realizaciones altamente preferidas, los polipéptidos variantes PS4 tienen 10% o más, preferiblemente 20% o más, preferiblemente 50% o más, actividad exoamilasa comparados con sus parentales, preferiblemente cuando se mide en un ensayo de almidón de maíz ceroso.
- Los productos de hidrólisis pueden analizarse por cualquier medio adecuado. Por ejemplo, los productos de hidrólisis pueden analizarse por HPLC de intercambio aniónico usando una columna Dionex PA 100 con detección amperométrica pulsada y con, por ejemplo, maltooligosacáridos lineales conocidos de glucosa a maltoheptaosa como estándares.
- Tal y como se usa en la presente memoria, el término "malto-oligosacárido lineal" se usa en el sentido normal como que significa 2-20 unidades de α -D-glucopiranosas unidas por un enlace α -(1 \rightarrow 4).
- Propiedades mejoradas**
- Las variantes PS4 descritas aquí tienen preferiblemente propiedades mejoradas cuando se comparan con sus enzimas parentales, tal como una cualquiera o más de termoestabilidad mejorada, estabilidad en pH mejorada, o exo-especificidad mejorada.
- En particular, los polipéptidos variantes PS4 que tienen mutaciones en la posición 303, por ejemplo, 303E, 303D, 306T y 306G tienen exo-especificidad incrementada. Aquellos que tienen mutaciones en cualquiera de las posiciones 146, 157, 158, 198, 229, (preferiblemente ambas 198 y 229), 309, 316, 316 y 353, por ejemplo, 146G, 157M, 158T, 198W, 229P, (198W, 229P), 309P, 316S, 316P y 353T presentan termoestabilidad mejorada.
- Sin pretender la vinculación a ninguna teoría particular, creemos que las mutaciones en las posiciones particulares tienen efectos individuales y acumulativos en las propiedades de un polipéptido que comprende dichas mutaciones.
- Termoestabilidad y estabilidad en pH**
- Preferiblemente, el polipéptido variante PS4 es termoestable; preferiblemente, tiene una mayor termoestabilidad que su enzima parental.
- Por lo tanto, proporcionamos polipéptidos variantes PS4 que tienen una mayor termoestabilidad comparados con el polipéptido parental o un polipéptido de tipo salvaje cuando se ensayan en las mismas condiciones. Específicamente, proporcionamos polipéptidos variantes PS4 que comprenden mutaciones en una cualquiera o más de las posiciones 121, 145, 146, 157, 158, 188, 198, 223, 229, 316, 353, más preferiblemente una cualquiera o más

de las mutaciones 121A, 121D, 121F, 121H, 121M, 121W, 121Y, 145D, 146G, 157M, 158T, 188H, 188S, 198W, 223A, 223E, 223K, 223R, 223V, 229P, 316P, 316S, 353T.

5 En trigo y otros cereales, las cadenas laterales externas en la amilopectina están en el intervalo de DP 12-19. Así, la hidrólisis enzimática de las cadenas laterales de la amilopectina, por ejemplo, por polipéptidos variantes PS4 como se describe que tienen actividad exoamilasa no maltogénica, puede reducir de forma importante sus tendencias a la cristalización.

10 El almidón en el trigo y otros cereales usados para propósitos de horneado está presente en la forma de gránulos de almidón que generalmente son resistentes al ataque enzimático por amilasas. Así, la modificación del almidón está limitada principalmente a almidón dañado y progresa muy lentamente durante el procesamiento de la masa y horneado inicial hasta que empieza la gelatinización a aproximadamente 60°C. Como consecuencia de esto, sólo las amilasas con un alto grado de termoestabilidad son capaces de modificar el almidón eficientemente durante el horneado. y generalmente la eficiencia de las amilasas se incrementa con termoestabilidad incrementada. Esto es porque cuanto más termoestable es la enzima mayor es el tiempo en el que puede estar activa durante el horneado y así mayor será el efecto antiendurecimiento que proporcione.

15 De acuerdo con esto, el uso de polipéptidos variantes PS4 como se describe aquí cuando se añaden al almidón en cualquier estadio de su procesamiento en un producto alimenticio, por ejemplo, antes, durante o después del horneado en pan puede retardar o impedir o ralentizar la retrogradación. Dicho uso se describe con más detalle más adelante.

20 Tal y como se usa en la presente memoria el término "termoestable" se refiere a la capacidad de la enzima de retener actividad después de exposición a temperaturas elevadas. Preferiblemente, el polipéptido variante PS4 es capaz de degradar almidón a temperaturas de aproximadamente 55°C a aproximadamente 80°C o más. Adecuadamente, la enzima retiene su actividad después de exposición a temperaturas de hasta aproximadamente 95°C.

25 La termoestabilidad de una enzima tal como una exoamilasa no maltogénica se mide por su vida media. Así, los polipéptidos variantes PS4 descritos aquí tienen vidas medias prolongadas respecto a la enzima parental preferiblemente un 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.

30 Tal y como se usa aquí, la vida media ($t_{1/2}$) es el tiempo (en minutos) durante el que la mitad de la actividad de la enzima se inactiva en condiciones de calor definidas. En realizaciones preferidas, la vida media se ensaya a 80 grados C. Preferiblemente, la muestra se calienta durante 1-10 minutos a 80°C o más. El valor de la vida media se calcula entonces midiendo la actividad amilasa residual, por cualquiera de los métodos descritos aquí. Preferiblemente, un ensayo de vida media se lleva a cabo como se describe con más detalle en los Ejemplos.

35 Preferiblemente, las variantes PS4 descritas aquí son activas durante el horneado e hidrolizan almidón durante y después de la gelatinización de los gránulos de almidón que empieza a temperaturas de aproximadamente 55°C. Cuanto más termoestable es la exoamilasa no maltogénica mayor es el tiempo en el que puede ser activa y así mayor será el efecto antiendurecimiento que proporcionará. Sin embargo, durante el horneado por encima de temperaturas de aproximadamente 85°C, puede tener lugar la inactivación de la enzima. Si esto pasa, la exoamilasa no maltogénica puede inactivarse gradualmente de manera que sustancialmente no hay actividad después del proceso de horneado en el pan final. Por lo tanto, preferentemente las exoamilasas no maltogénicas adecuadas para uso como se describe tienen una temperatura óptima por encima de 50°C y por debajo de 98°C.

40 La termoestabilidad de las variantes PS4 descritas aquí puede mejorarse usando ingeniería de proteínas para hacerlas más termoestables y así más adecuadas para los usos descritos aquí; por lo tanto, se engloba el uso de variantes PS4 modificadas para hacerlas más termoestables por ingeniería de proteínas.

45 Preferiblemente, el polipéptido variante PS4 es estable al pH; más preferiblemente, tiene una mayor estabilidad a pH que su polipéptido parental cognado. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "estable a pH" se refiere a la capacidad de la enzima de retener actividad en un intervalo amplio de pH. Preferiblemente, el polipéptido variante PS4 es capaz de degradar almidón a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10,5. En una realización, el grado de estabilidad a pH puede ensayarse midiendo la vida media de la enzima en condiciones específicas de pH. En otra realización, el grado de estabilidad a pH puede ensayarse midiendo la actividad o actividad específica de la enzima en condiciones específicas de pH. Las condiciones específicas de pH pueden ser cualquier pH de pH5 a pH10,5.

55 Así, el polipéptido variante PS4 puede tener una vida media más larga, o una mayor actividad (dependiendo del ensayo), cuando se compara con el polipéptido parental en condiciones idénticas. Los polipéptidos variantes PS4 pueden tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o vida media más larga cuando se compara con sus polipéptidos parentales en condiciones idénticas de pH. Alternativamente, o además, pueden tener dicha mayor actividad cuando se compara con el polipéptido parental en condiciones idénticas de pH.

Exo-especificidad

Se sabe que algunas exoamilasas no maltogénicas pueden tener algún grado de actividad endoamilasa. En algunos casos, puede ser necesario reducir o eliminar este tipo de actividad ya que la actividad endoamilasa puede posiblemente afectar negativamente la calidad del producto de pan final mediante la producción de una miga pegajosa o gomosa debido a la acumulación de dextrinas ramificadas.

Proporcionamos polipéptidos variantes PS4 que tienen una exo-especificidad mayor comparado con el polipéptido parental o un polipéptido de tipo salvaje cuando se ensaya en las mismas condiciones. Específicamente, proporcionamos polipéptidos variantes PS4 que comprenden mutaciones en una cualquiera o más de las posiciones 26, 70, 121, 145, 161, 223, 223, 303, 306, 309, 339, 339, más preferiblemente una cualquiera o más de las mutaciones 26E, 70D, 121A, 121D, 121H, 121M, 121W, 121Y, 145D, 161A, 223A, 223E, 223K, 223R, 223V, 303D, 303E, 306G, 306T, 309P, 339A, 339E.

La exo-especificidad puede medirse de manera útil determinando la relación de actividad amilasa total respecto a la actividad endoamilasa total. Esta relación se refiere en este documento como un "índice de exo-especificidad". En realizaciones preferidas, una enzima se considera una exoamilasa si tiene un índice de exo-especificidad de 20 o más, es decir, su actividad amilasa total (incluyendo actividad exo-amilasa) es 20 veces o mayor que su actividad endoamilasa. En realizaciones altamente preferidas, el índice de exo-especificidad de exoamilasas es 30 o más, 40 o más, 50 o más, 60 o más, 70 o más, 80 o más, 90 o más, ó 100 o más. En realizaciones altamente preferidas, el índice de exo-especificidad es 150 o más, 200 o más, 300 o más, 400 o más, 500 o más ó 600 o más.

La actividad amilasa total y actividad endoamilasa pueden medirse por 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. Alternativamente, se describe el uso de un ensayo Betamyl con más detalle en los Ejemplos, y para conveniencia, la actividad amilasa como se ensaya en los Ejemplos se describe en términos de "Unidades Betamyl" en las Tablas.

La actividad endoamilasa puede ensayarse por el uso de un Kit Phadebas (Farmacia y Upjohn). Éste usa un almidón entrecruzado marcado azul (marcado con un agente de tinción azo); sólo los cortes internos en la molécula de almidón liberan marcador, mientras los cortes externos no lo hacen. La liberación de agente de tinción puede medirse por espectrofotometría. De acuerdo con esto, el Kit Phadebas mide actividad endoamilasa, y por conveniencia, los resultados de dicho ensayo (descrito en los Ejemplos) se refieren en este documento como "unidades Phadebas".

En una realización altamente preferida, por lo tanto, el índice de exo-especificidad se expresa en términos de Unidades Betamyl / Unidades Phadebas, también referido como "B/Phad".

La exo-especificidad también puede ensayarse según los métodos descritos en la técnica anterior, por ejemplo, en nuestra Publicación de Patente Internacional Número WO99/50399. Éste mide la exo-especificidad mediante una relación entre la actividad endoamilasa a la actividad exoamilasa. Así, en un aspecto preferido, las variantes PS4 descritas aquí tendrán menos de 0,5 unidades de endoamilasa (EAU) por unidad de actividad exoamilasa. Preferiblemente, las exoamilasas no maltogénicas que son adecuadas para uso según la presente invención tienen menos de 0,05 EAU por unidad de actividad exoamilasa y más preferiblemente menos de 0,01 EAU por unidad de actividad exoamilasa.

Las variantes PS4 descritas aquí tendrán preferiblemente exoespecificidad, por ejemplo, medida por índices de exo-especificidad, como se ha descrito anteriormente, consistente con que son exoamilasas. Además, tienen preferiblemente una exoespecificidad mayor o incrementada cuando se comparan con las enzimas o polipéptidos parentales de los que derivan. Así, por ejemplo, los polipéptidos variantes PS4 pueden tener un índice de exo-especificidad un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o mayor cuando se compara con sus polipéptidos parentales, 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 parentales, preferiblemente en condiciones idénticas.

Usos de polipéptidos y ácidos nucleicos variantes PS4

Los polipéptidos variantes PS4, ácidos nucleicos, células huésped, vector de expresión, etc, pueden usarse en cualquier aplicación para la que puede usarse una amilasa. En particular, pueden usarse para sustituir cualquier exoamilasa no maltogénica. Pueden usarse para suplementar la actividad amilasa o exoamilasa no maltogénica, bien solos o en combinación con otras amilasas o exoamilasas no maltogénicas conocidas.

Las secuencias variantes PS4 descritas aquí pueden usarse en varias aplicaciones en la industria alimentaria - tal como productos de panadería y bebidas, también pueden usarse en otras aplicaciones tales como una composición farmacéutica, o incluso en la industria química. En particular, los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes PS4 son útiles para varias aplicaciones industriales incluyendo horneado (como se describe en WO 99/50399) y estandarización de harinas (aumento o mejora del volumen). Pueden usarse para producir maltotetraosa de almidón y otros sustratos.

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

5 Los polipéptidos variantes PS4 pueden usarse para aumentar el volumen de los productos de panadería tal como pan. Sin pretender la vinculación a ninguna teoría particular, creemos que esto resulta de la reducción de viscosidad de la masa durante el calentamiento (tal como horneado) como resultado del acortamiento por exoamilasa de las moléculas de amilosa. Esto permite que el dióxido de carbono generado por la fermentación incremente el tamaño del pan con menor impedimento.

10 Así, los productos alimenticios que comprenden o se tratan con polipéptidos variantes PS4 se expanden en volumen cuando se comparan con productos que no se han tratado de esta manera, o se tratan con polipéptidos parentales. En otras palabras, los productos alimenticios tienen un volumen de aire mayor por volumen de producto alimenticio. Alternativamente, o además, los productos alimenticios tratados con polipéptidos variantes PS4 tienen una menor densidad, o peso (o masa) por relación de volumen. En realizaciones particularmente preferidas, los polipéptidos
15 variantes PS4 se usan para aumentar el volumen del pan. El aumento o expansión del volumen es beneficioso porque reduce la gomosidad o contenido en almidón de los alimentos. Los consumidores prefieren los alimentos ligeros, y se potencia la experiencia del consumidor. En realizaciones preferidas, el uso de polipéptidos variantes PS4 aumenta el volumen un 10%, 20%, 30% 40%, 50% o más.

20 El uso de polipéptidos variantes PS4 para incrementar el volumen de alimentos se describe con detalle en los Ejemplos.

Usos en alimentos

Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes PS4 descritos aquí pueden usarse como - o en la preparación de - un alimento. En particular, pueden añadirse a un alimento, es decir, como un aditivo alimenticio. El término "alimento"
25 se pretende que incluya tanto alimentos preparados, así como un ingrediente de un alimento, tal como harina. En un aspecto preferido, el alimento es para consumo humano. El alimento puede estar en la forma de una disolución o como un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes PS4 pueden usarse como un ingrediente alimenticio. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "ingrediente alimenticio" incluye una formulación, que se añade o puede
30 añadirse a alimentos o productos alimenticios funcionales e incluye formulaciones que pueden usarse a niveles bajos en una amplia variedad de productos que requieren, por ejemplo, acidificación o emulsión. El ingrediente alimenticio puede estar en la forma de una disolución o como un sólido - dependiendo del uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes PS4 descritos aquí pueden ser - o pueden añadirse a - suplementos alimenticios. Los polipéptidos y ácidos nucleicos variantes PS4 descritos aquí pueden ser - o pueden añadirse a -
35 alimentos funcionales. Tal y como se usa en la presente memoria, el término "alimento funcional" significa alimento que es capaz de proporcionar no solo un efecto nutritivo y/o una satisfacción al gusto, sino también es capaz de proporcionar un efecto beneficioso adicional al consumidor. Aunque no existe una definición legal de un alimento funcional, la mayoría de las partes con un interés en esta área están de acuerdo en que son alimentos comercializados como que tienen efectos específicos en la salud.

40 Los polipéptidos variantes PS4 también pueden usarse en la fabricación de un producto de alimento o un producto alimenticio. Los productos alimenticios típicos incluyen productos lácteos, productos cárnicos, productos de pollo, productos de peces y productos de masa. El producto de masa puede ser cualquier producto de masa procesado, incluyendo masas fritas, fritas en aceite abundante, asadas, horneadas, al vapor y hervidas, tal como pan y torta de arroz al vapor. En realizaciones altamente preferidas, el producto alimenticio es un producto de panadería.

45 Preferiblemente, el producto alimenticio es un producto de panadería. Los productos de panadería típicos (horneados) incluyen pan - tal como hogazas, bollos, magdalenas, bases de pizza etc. hojaldre, pretzels, tortillas, pasteles, pasteles, galletas, galletas saladas etc.

Por lo tanto, describimos un método para modificar un aditivo alimenticio que comprende una exoamilasa no maltogénica, comprendiendo el método introducir una mutación en una cualquiera o más de las posiciones de la
50 exoamilasa no maltogénica como se muestra en este documento. El mismo método puede usarse para modificar un ingrediente alimenticio, o un suplemento alimenticio, un producto de alimento, o un producto alimenticio.

Retrogradación/endurecimiento

55 Describimos el uso de proteínas variantes PS4 que son capaces de retardar el endurecimiento de medios de almidón, tal como geles de almidón. Los polipéptidos variantes PS4 son especialmente capaces de retardar la retrogradación perjudicial del almidón.

La mayor parte de los gránulos de almidón están compuestos por una mezcla de dos polímeros: una amilosa esencialmente lineal y una amilopectina altamente ramificada. La amilopectina es una molécula ramificada muy grande que consiste en cadenas de unidades de α -D-glucopiranosilo unidas por uniones (1-4), en el que dichas cadenas están unidas por uniones α -D-(1-6) para formar ramificaciones. La amilopectina está presente en todos los almidones naturales, constituyendo aproximadamente el 75% de los almidones más comunes. La amilosa es una cadena esencialmente lineal de unidades de α -D-glucopiranosilo unidas en (1-4) que tiene pocas ramificaciones α -D-(1-6). La mayor parte de los almidones contiene aproximadamente 25% de amilosa.

Los gránulos de almidón calentados en presencia de agua experimentan una transición de fase orden-desorden denominada gelatinización, en la que los gránulos que se están hinchando captan líquido. Las temperaturas de gelatinización varían para los diferentes almidones. Después de enfriar el pan recién horneado la fracción de amilosa, en horas, se retrograda para desarrollar una red. Este proceso es beneficioso ya que crea una estructura de miga deseable con un bajo grado de firmeza y propiedades de corte en rebanadas mejoradas. Más gradualmente, tiene lugar la cristalización de la amilopectina en los gránulos de almidón gelatinizados durante los días posteriores al horneado. En este proceso, se cree que la amilopectina refuerza la red de amilosa en la que están incluidos los gránulos de almidón. Este refuerzo da lugar a una firmeza incrementada de la miga del pan. Este refuerzo es una de las causas principales del endurecimiento del pan.

Se sabe que la calidad de los productos horneados se deteriora gradualmente durante el almacenamiento. Como consecuencia de la recristalización del almidón (también denominada retrogradación), la capacidad de mantener agua de la miga cambia con implicaciones importantes en las propiedades organolépticas y dietéticas. La miga pierde suavidad y elasticidad y se vuelve firme y desmenuzable. El incremento en la firmeza de la miga se usa frecuentemente como una medida del proceso de endurecimiento del pan.

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

De acuerdo con esto, el uso de polipéptidos variantes PS4 como se describe aquí cuando se añaden al almidón en cualquier estadio de su procesamiento en un producto alimenticio, por ejemplo, antes, durante o después del horneado en pan, puede retardar o impedir o ralentizar la retrogradación. Dicho uso se describe con más detalle más adelante.

Por lo tanto, describimos un método para mejorar la capacidad de una exoamilasa no maltogénica para prevenir el endurecimiento, preferiblemente retrogradación perjudicial, de un producto de masa, comprendiendo el método introducir una mutación en una cualquiera o más de las posiciones de la exoamilasa no maltogénica como se muestra en este documento.

Ensayos para la medida de la retrogradación (inc. endurecimiento)

Para la evaluación del efecto antiendurecimiento de los polipéptidos variantes PS4 que tienen actividad exoamilasa no maltogénica descritos aquí, la firmeza de la miga puede medirse 1, 3 y 7 días después del horneado mediante un Analizador de la Textura de Alimentos Universal Instron 4301 o equipo similar conocido en la técnica.

Otro método usado tradicionalmente en la técnica y que se usa para evaluar el efecto de la retrogradación del almidón de un polipéptido variante PS4 que tiene actividad exoamilasa no maltogénica se basa en DSC (calorimetría de barrido diferencial). Aquí, se mide la entalpía de fusión de amilopectina retrodegradada en miga de pan o 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 operado 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 miga y se transfieren a las bandejas de aluminio del Mettler-Toledo que entonces se sellan herméticamente.

Las masas del sistema modelo usadas en los ejemplos descritos contienen harina de trigo estándar y cantidades óptimas de agua o tampón con o sin la exoamilasa no maltogénica variante PS4. Se mezclan en un Harinógrafo Brabender de 10 ó 50 g durante 6 ó 7 min., respectivamente. Las muestras de las masas se ponen 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 empezando con una incubación de 30 min. a 33°C seguido de calentamiento desde 33 a 95°C con un gradiente de 1,1 °C por min. y finalmente una incubación de 5 min. a 95°C. Posteriormente, los tubos se almacenan en un termostato a 20°C antes del análisis por DSC.

En realizaciones preferidas, las variantes PS4 descritas aquí tienen una entalpía de fusión reducida, comparado con el control. En realizaciones altamente preferidas, las variantes PS4 tienen una entalpía de fusión reducida en 10% o más. Preferiblemente, tienen una entalpía de fusión reducida en 20% o más, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más cuando se compara con el control.

Tabla 2

| | DSC (J/g) |
|---------|-----------|
| Control | 2,29 |
| 0,5 D34 | 1,91 |
| 1 D34 | 1,54 |
| 2 D34 | 1,14 |

La Tabla 2 anterior muestra valores de DSC de sistemas de masa modelo preparados con diferentes dosis de PSac-D34 después de 7 días de almacenamiento. Se ensayan 0,5, 1 y 2 partes por millón (o microgramos por gramo) de harina.

5 Preparación de productos de almidón

Proporcionamos el uso de polipéptidos variantes PS4 en la preparación de productos alimenticios, en particular, productos de almidón. El método comprende formar el producto de almidón añadiendo una enzima exoamilasa no maltogénica tal como un polipéptido variante PS4, a un medio de almidón. Si el medio de almidón es una masa, entonces la masa se prepara mezclando conjuntamente harina, agua, la exoamilasa no maltogénica que es un polipéptido variante PS4 y opcionalmente otros posibles ingredientes y aditivos.

El término "almidón" debe tomarse como que significa almidón *per se* o un componente de éste, especialmente amilopeptina. El término "medio de almidón" significa cualquier medio adecuado que comprende almidón. El término "producto de almidón" significa cualquier producto que contiene o está basado en o deriva de almidón. Preferiblemente, el producto de almidón contiene o está basado en o deriva de almidón obtenido de harina de trigo.

El término "harina" tal y como se usa en la presente memoria es un sinónimo del triturado finamente molido de trigo u otro grano. Preferiblemente, sin embargo, el término significa harina obtenida de trigo *per se* y no de otro grano. Así, y a no ser que se exprese otra cosa, las referencias a "harina de trigo" tal y como se usa en la presente memoria preferiblemente significan referencia a harina de trigo *per se* así como a harina de trigo cuando está presente en un medio, tal como una masa.

Una harina preferida es harina de trigo o harina de centeno o mezclas de harina de trigo y de centeno. Sin embargo, la masa que comprende harina derivada de otros tipos de cereales tal como por ejemplo de arroz, maíz, cebada, y durra también se contemplan. Preferiblemente, el producto de almidón es un producto de panadería. Más preferiblemente, el producto de almidón es un producto de pan. Incluso más preferiblemente, el producto de almidón es un producto de pan harinoso horneado. El término "producto de pan harinoso horneado" se refiere a cualquier producto horneado basado en una masa que se puede obtener mezclando harina, agua, y un agente leudante en condiciones de formación de masa. Por supuesto, pueden añadirse componentes adicionales a la mezcla de masa.

Así, si el producto de almidón es un producto de pan harinoso horneado, entonces el proceso comprende mezclar - en cualquier orden adecuado - harina, agua, y un agente leudante en condiciones de formación de masa y añadir además un polipéptido variante PS4, opcionalmente e la forma de una premezcla. El agente leudante puede ser un agente leudante químico tal como bicarbonato de sodio o cualquier cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero).

La exoamilasa no maltogénica variante PS4 puede añadirse junto con cualquier ingrediente de la masa incluyendo el agua o mezcla de ingredientes de la masa o con cualquier aditivo o mezcla de aditivos. La masa puede prepararse por cualquier método de preparación de masa convencional común en la industria panadera o en cualquier otra industria de preparación de productos basados en masa de harina.

El horneado de productos de pan harinosos tal como por ejemplo pan blanco, pan hecho de harina de centeno y harina de trigo enrollada, bollos y semejantes típicamente se consigue horneando la masa de pan a temperaturas de horno en el intervalo de 180 a 250°C durante aproximadamente 15 a 60 minutos. Durante el proceso de horneado, prevalece un gradiente de temperatura pronunciado (200 → 120°C) en las capas externas de la masa en las que se desarrolla la corteza característica del producto horneado. Sin embargo, debido al consumo de calor debido a la generación de vapor, la temperatura en la miga es sólo cerca de 100°C al final del proceso de horneado.

Por lo tanto, describimos un proceso para preparar un producto de pan que comprende: (a) proporcionar un medio de almidón; (b) añadir al medio de almidón un polipéptido variante PS4 como 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 describimos un proceso para preparar un producto de pan que comprende añadir a un medio de almidón un polipéptido variante PS4 como se describe.

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

Composición mejoradora

Describimos composiciones mejoradoras, que incluyen composiciones mejoradoras de pan y composiciones mejoradoras de masa. Éstas comprenden un polipéptido variante PS4, opcionalmente junto con un ingrediente adicional, o una enzima adicional, o ambos.

- 5 También proporcionamos el uso de dichas composiciones mejoradoras de pan y masa en el horneado. En un aspecto adicional, proporcionamos un producto o masa horneado obtenido a partir de la composición mejoradora de pan o composición mejoradora de masa. En otro aspecto, describimos un producto o masa horneado obtenido a partir del uso de una composición mejoradora de pan o una composición mejoradora de masa.

Preparación de la masa

- 10 Una masa puede prepararse mezclando harina, agua, una composición mejoradora de la masa que comprende polipéptido variante PS4 (como se ha descrito anteriormente) y opcionalmente otros ingredientes y aditivos.

15 La composición mejoradora de la masa puede añadirse junto con cualquier ingrediente de la masa incluyendo la harina, agua u otros ingredientes o aditivos opcionales. La composición mejoradora de la masa puede añadirse antes de la harina o agua u otros ingredientes y aditivos opcionales. La composición mejoradora de la masa puede añadirse después de la harina o agua, u otros ingredientes y aditivos opcionales. La masa puede prepararse por cualquier método de preparación de masa convencional común en la industria del pan o en cualquier otra industria para preparar productos basados en masa de harina.

20 La composición mejoradora de la masa puede añadirse como una preparación líquida o en la forma de una composición de polvo seco bien que comprende la composición como el único componente activo o mezclado con uno o más otros ingredientes o aditivos de la masa.

25 La cantidad del polipéptido de exoamilasa no maltogénica variante PS4 que se añade es normalmente una cantidad que resulta en la presencia en la masa acabada de 50 a 100.000 unidades por kg de harina, preferiblemente 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. Alternativamente, el polipéptido de exoamilasa no maltogénica variante PS4 se añade en una cantidad que resulta en la presencia en la masa acabada de 0,02 - 50 ppm de enzima sobre la base de harina (0,02 - 50 mg de enzima por kg de harina), preferiblemente 0,2 - 10 ppm.

30 En el presente contexto, 1 unidad de la exoamilasa no maltogénica se define como la cantidad de enzima que libera productos de hidrólisis equivalentes a 1 μ mol de azúcar reductor por min, cuando se incuba a 50 grados C en un tubo de ensayo con 4 ml de 10 mg/ml de almidón de maíz ceroso en 50 mM MES, 2 mM cloruro de calcio, pH 6,0 como se describe más adelante en la presente memoria.

35 La masa como se describe aquí generalmente comprende triturado de trigo o harina de trigo y/o otros tipos de triturado, harina o almidón tal como harina de maíz, almidón de maíz, harina de mijo, harina de arroz, triturado de centeno, harina de centeno, harina de avena, triturado de avena, harina de soja, triturado de sorgo, harina de sorgo, triturado de patata, harina de patata o almidón de patata. La masa puede ser fresca, congelada, o parcialmente horneada.

40 La masa puede ser una masa leudada o una masa que se va a someter a leudación. La masa puede leudarse de varias maneras, tal como añadiendo agentes leudantes químicos, por ejemplo, bicarbonato de sodio o añadiendo un leudante (masa en fermentación), pero se prefiere leudar la masa añadiendo un cultivo de levaduras adecuado, tal como un cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* (levadura de panadero), por ejemplo, una cepa disponible comercialmente de *S. cerevisiae*.

La masa puede comprender grasa tal como una grasa granulada o manteca vegetal. La masa puede comprender además un emulsionante adicional tal como mono- o diglicéridos, ésteres de azúcar de ácidos grasos, ésteres de poliglicerol de ácidos grasos, ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, estearatos de polioxetileno, o lisolectina.

45 También describimos una pre-mezcla que comprende harina junto con la combinación como se describe en la presente memoria. La pre-mezcla puede contener otros aditivos mejoradores de la masa y/o mejoradores del pan, por ejemplo, cualesquiera de los aditivos, incluyendo enzimas, mencionados en la presente memoria.

Aditivos o ingredientes de la masa adicionales

50 Con el fin de mejorar adicionalmente las propiedades del producto horneado e impartir calidades distintivas al producto horneado, pueden incorporarse en la masa ingredientes y/o aditivos de la masa adicionales. Típicamente, dichos componentes adicionales añadidos incluyen ingredientes de la masa tales como sal, granos, grasas y aceites, azúcar o edulcorante, fibras dietéticas, fuentes de proteína tal como polvo de leche, gluten de soja o huevos y aditivos de la masa tales como emulsionantes, otras enzimas, hidrocoloides, agentes saporíferos, agentes oxidantes, minerales y vitaminas.

Los emulsionantes son útiles como reforzadores de la masa y suavizantes de la miga. Como reforzadores de la masa, los emulsionantes pueden proporcionar tolerancia respecto al tiempo de reposo y tolerancia al choque durante la fermentación. Además, los reforzadores de la masa mejorarán la tolerancia de una masa dada a variaciones en el tiempo de fermentación. La mayor parte de los reforzadores de la masa también mejoran la esponjadura en el horno que significa el incremento en el volumen de los productos fermentados a horneados. Por último, los reforzadores de la masa emulsionarán cualesquiera grasas presentes en la mezcla de la receta.

Los emulsionantes adecuados incluyen lecitina, estearato de polioxietileno, mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres de ácido acético de mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres de ácido láctico de mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres de ácido cítrico de mono- y diglicéridos de ácidos grasos comestibles, ésteres de ácido diacetil tartárico 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 aditivo o ingrediente de la masa adicional puede añadirse junto con cualquier ingrediente de la masa incluyendo la harina, agua u otros ingredientes o aditivos opcionales, o la composición mejoradora de la masa. El aditivo o ingrediente de la masa adicional puede añadirse antes de la harina, agua, otros ingredientes y aditivos opcionales o la composición mejoradora de la masa. El aditivo o ingrediente de la masa adicional puede añadirse después de la harina, agua, otros ingredientes y aditivos opcionales o la composición mejoradora de la masa.

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

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

Enzima adicional

Además de los polipéptidos variantes PS4, pueden usarse una o más enzimas adicionales, por ejemplo, añadidas al alimento, preparación de la masa, producto alimenticio o composición de almidón.

Las enzimas adicionales que pueden añadirse a la masa incluyen óxidorreductasas, hidrolasas, tal como lipasas y estererasas, así como glicosidasas como α -amilasa, pululanasa, y xilanasa. Las óxidorreductasas, tal como por ejemplo glucosa oxidasa y hexosa oxidasa, pueden usarse para el refuerzo de la masa y control del volumen de los productos horneados y pueden añadirse xilanasas y otras hemicelulasas para mejorar las propiedades de manejo de la masa, suavidad de la miga y volumen del pan. Las lipasas son útiles como reforzadores de la masa y suavizantes de la miga y pueden incorporarse α -amilasas y otras enzimas amilolíticas en la masa para controlar el volumen del pan y reducir adicionalmente la firmeza de la miga.

Las enzimas adicionales que pueden usarse pueden seleccionarse del grupo que consiste en una celulasa, una hemicelulasa, una enzima que degrada almidón, una proteasa, una lipoxigenasa.

Los ejemplos de óxidorreductasas útiles incluyen oxidasas tal como enzima que oxida 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).

Entre las enzimas que degradan almidón, las amilasas son particularmente útiles como aditivos mejoradores de la masa. La α -amilasa degrada el almidón en dextrinas que se degradan adicionalmente por β -amilasa a maltosa. Otras enzimas que degradan almidón útiles que pueden añadirse a una composición de masa incluyen glucoamilasas y pululanasas.

Preferiblemente, la enzima adicional es al menos una xilanasa y/o al menos una amilasa. El término "xilanasa" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a xilanasas (EC 3.2.1.32) que hidrolizan uniones xilosídicas.

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

La enzima adicional puede añadirse junto con cualquier ingrediente de la masa incluyendo la harina, agua u otros ingredientes o aditivos opcionales, o la composición mejoradora de la masa. La enzima adicional puede añadirse antes de la harina, agua, y opcionalmente otros ingredientes y aditivos o la composición mejoradora de la masa. La enzima adicional puede añadirse después de la harina, agua, y opcionalmente otros ingredientes y aditivos o la composición mejoradora de la masa. La enzima adicional puede ser convenientemente una preparación líquida. Sin embargo, la composición puede estar convenientemente en la forma de una composición seca.

Algunas enzimas de la composición mejoradora de la masa son capaces de interactuar entre sí en las condiciones de la masa hasta un grado en el que el efecto en la mejora de las propiedades reológicas y/o maquinabilidad de una

masa de harina y/o la calidad del producto hecho a partir de la masa por las enzimas no es sólo aditivo, sino que el efecto es sinérgico.

5 En relación con la mejora del producto hecho a partir de la masa (producto acabado), puede encontrarse que la combinación resulta en un efecto sinérgico sustancial respecto a la estructura de la miga. También, respecto al volumen específico del producto horneado puede encontrarse un efecto sinérgico.

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 están limitados 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 lipoprotein lipasa A2 (EC 3.1.1.34).

10 Otros usos

Las variantes PS4 son adecuadas para la producción de jarabes de maltosa y con alto contenido en maltosa. Dichos productos tienen un interés considerable en la producción de determinados productos de confitería debido a la baja higroscoposidad, baja viscosidad, buena estabilidad frente al calor y sabor a maltosa suave, no demasiado dulce. El proceso industrial para producir jarabes de maltosa comprende licuar el almidón, entonces sacarificación con una enzima productora de maltosa, y opcionalmente con una enzima que escinde los puntos de ramificación 1.6 en la amilopectina, por ejemplo, una alfa-1.6-amiloglucosidasa.

15 Las variantes PS4 descritas aquí pueden añadirse a y así convertirse en un componente de una composición de detergente. La composición de detergente puede formularse, por ejemplo, como una composición de detergente de lavado a mano o a máquina incluyendo una composición de aditivo de lavado adecuada para pre-tratamiento de
20 telas teñidas y una composición de suavizante de telas añadida al aclarado, o puede formularse como una composición de detergente para uso en operaciones generales de limpieza doméstica de superficies duras, o puede formularse para operaciones de lavavajillas a mano o a máquina. En un aspecto específico, describimos un aditivo de detergente que comprende la variante PS4. El aditivo de detergente, así como la composición de detergente pueden comprender una o más otras enzimas tal como una proteasa, una lipasa, una cutinasa, una amilasa, una
25 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 o las enzimas elegidas deberían ser compatibles con el detergente seleccionado, (es decir, pH óptimo, compatibilidad con otros ingredientes enzimáticos y no enzimáticos, etc.), y la o las enzimas deberían estar presentes en cantidades efectivas.

30 La variante PS4 también puede usarse en la producción de materiales lignocelulósicos, tal como pulpa, papel y cartón, a partir de residuos de papel y cartón reforzado con almidón, especialmente donde el repulpeo ocurre a pH por encima de 7 y donde las amilasas pueden facilitar la disgregación del material de desecho a través de degradación del almidón de refuerzo. Las variantes PS4 pueden ser especialmente útiles en un proceso para producir una pulpa para producir papel a partir de papel impreso recubierto con almidón. El proceso puede realizarse como se describe en WO 95/14807, que comprende las etapas siguientes: a) disgregar el papel para producir una pulpa, b) tratar con una enzima que degrada 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). La variante PS4 también puede ser muy útil para
35 modificar almidón donde el almidón modificado enzimáticamente se usa en la preparación de papel junto con rellenos alcalinos tal como carbonato de calcio, caolín y arcillas. Con las variantes PS4 descritas aquí, se vuelve posible modificar el almidón en presencia del relleno permitiendo así un proceso integrado más simple. Una variante PS4 también puede ser muy útil en el desapesto de tejidos. En la industria de procesado textil, las amilasas se usan tradicionalmente como auxiliares en el proceso de desapesto para facilitar la eliminación de apesto que contiene almidón que ha servido como un recubrimiento protector en ovillos tejidos durante el tejido. La eliminación completa del recubrimiento de apesto después del tejido es importante para asegurar resultados óptimos en los procesos posteriores, en los que la tela se somete a abrasión, destefido y tinción. La degradación enzimática del almidón se prefiere porque no implica ningún efecto perjudicial en el material de fibra. La variante PS4 puede usarse sola o en
45 combinación con una celulasa cuando se somete a desapesto tela o tejido que contiene celulosa.

La variante PS4 también puede ser una amilasa de elección para la producción de edulcorantes a partir de almidón. Un proceso "tradicional" para la conversión de almidón en jarabes de fructosa consiste normalmente en tres procesos enzimáticos consecutivos, a saber, un proceso de licuación seguido de un proceso de sacarificación y un proceso de isomerización. Durante el proceso de licuación, el almidón se degrada a dextrinas por una amilasa a valores de pH entre 5,5 y 6,2 y a temperaturas de 95-160°C durante un periodo de aprox. 2 horas. Con el fin de asegurar una estabilidad óptima de la enzima en estas condiciones, se añade 1 mM de calcio (40 ppm libre de iones calcio). Después del proceso de licuación, las dextrinas se convierten en dextrosa por 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 alta temperatura (por encima de 95°C), y la actividad de la amilasa que licúa se desnaturaliza. La temperatura se disminuye hasta 60°C, y se añaden la glucoamilasa y enzima desramificante. El proceso de sacarificación continúa durante 24-72 horas.

55

Aplicación en pienso

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

Tal y como se usa en la presente memoria, el término 'degradar' se refiere a la hidrólisis o degradación parcial o completa de almidón resistente a glucosa y/o oligosacáridos - tal como maltosa y/o dextrinas.

5 El polipéptido variante PS4 puede degradar almidón resistente residual que no se ha degradado completamente por la amilasa de un animal. Como ejemplo, el polipéptido variante PS4 puede usarse para ayudar a la amilasa de un animal (por ejemplo, amilasa pancreática) en la mejora de la degradación de almidón resistente. La α -amilasa pancreática se excreta en el sistema digestivo por los animales. La α -amilasa pancreática degrada el almidón en el
 10 pienso. Sin embargo, una parte del almidón, el almidón resistente, no se degrada completamente por la α -amilasa pancreática y por lo tanto no se absorbe en el intestino delgado (véase la definición de almidón resistente). El polipéptido variante PS4 en algunas realizaciones es capaz de ayudar a la α -amilasa pancreática en la degradación de almidón en el sistema digestivo y de esta manera incrementa la utilización de almidón por el animal.

15 La capacidad de una enzima para degradar almidón resistente puede analizarse por ejemplo por un método desarrollado y descrito por Megazyme International Ireland Ltd. para la medida del contenido de almidón resistente, almidón solubilizado y almidón total de una muestra (Resistant Starch Assay Procedure, AOAC Method 2002.02, AACC Method 32-40).

De acuerdo con esto, los polipéptidos variantes PS4 pueden ingerirse por un animal para propósitos beneficiosos, y puede por lo tanto incorporarse en piensos de animales.

20 Por lo tanto, describimos el uso de un polipéptido variante PS4 como un componente para uso en un pienso que comprende almidón, o para uso en una composición mejoradora de un pienso, en el que el polipéptido variante PS4 es capaz de degradar almidón resistente. También describimos un pienso que comprende un almidón y un polipéptido variante PS4. Describimos además un método para degradar almidón resistente en un pienso que comprende poner en contacto dicho almidón resistente con un polipéptido variante PS4.

25 Describimos además el uso de un polipéptido variante PS4 en la preparación de un pienso que comprende un almidón, para degradar almidón resistente. Además, describimos el uso de un polipéptido variante PS4 en la preparación de un pienso para mejorar el valor calorífico de dicho pienso. Describimos el uso de una enzima en la preparación de un pienso para mejorar el rendimiento de un animal. En una realización adicional, describimos un proceso para preparar un pienso que comprende mezclar un almidón y una enzima polipéptido variante PS4.

30 Como ejemplo, el uso de un componente que comprende polipéptidos variantes PS4 y que es capaz de degradar almidón resistente es ventajoso porque hay un incremento importante en la degradación de almidón y/o productos de degradación de almidón en un animal. Además, dicho uso es ventajoso porque hay un incremento importante en la digestibilidad del almidón y/o productos de degradación de almidón por un animal. Además, dicho uso es ventajoso porque proporciona un medio para aumentar la eficiencia de obtener energía de un pienso por un animal. Además, dicho uso es ventajoso porque proporciona un medio para aumentar la biodisponibilidad de almidón
 35 resistente.

Piensos animales

Los piensos animales para los que son adecuados para uso los polipéptidos variantes PS4 pueden formularse para satisfacer las necesidades específicas de grupos de animales particulares y para proporcionar los carbohidratos, grasa, proteínas y otros nutrientes necesarios en una forma que pueda metabolizarse por el animal.

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

Tal y como se usa en la presente memoria, el término 'suido' se refiere a omnívoros no rumiantes tal como cerdos, porcinos o jabalíes. Típicamente, el pienso de suidos incluye aproximadamente 50 por ciento de carbohidratos, aproximadamente 20 por ciento de proteína y aproximadamente 5% de grasa. Un ejemplo de un pienso de suidos de alta energía se basa en maíz que se combina frecuentemente con suplementos de pienso, por ejemplo, proteína, minerales, vitaminas y aminoácidos tal como lisina y triptófano. Los ejemplos de piensos de suidos incluyen productos de proteína animal, productos marinos, productos lácteos, productos de grano y productos de proteína vegetal, todos los cuales pueden comprender además sabores naturales, sabores artificiales, micro y macro minerales, grasas animales, grasas vegetales, vitaminas, conservantes o medicaciones tales como antibióticos.
 45

50 Debe entenderse que cuando se hace referencia en la presente especificación, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, a 'pienso de suidos' dicha referencia se pretende que incluya piensos de "transición" o "iniciadores" (usado para suidos jóvenes destetados) y piensos "finalizadores" o "de crecimiento" (usado después del estadio de transición para el crecimiento de suidos hasta una edad y/o tamaño adecuado para comercialización).

Tal y como se usa en la presente memoria, el término 'ave de corral' se refiere a aves tales como pollos, pollos de engorde, gallinas, gallos, capones, pavos, patos, ave de juego, pulardas o polluelos. Los piensos de aves de corral

5 pueden referirse como piensos "completos" porque contienen todas las proteínas, energía, vitaminas, minerales, y otros nutrientes necesarios para el crecimiento apropiado, producción de huevos, y salud de las aves. Sin embargo, los piensos de aves de corral pueden comprender además vitaminas, minerales o medicaciones tales como coccidiostáticos (por ejemplo, Monensina sodio, Lasalocid, Amprolio, Salinomycin, y Sulfaquinoxalina) y/o antibióticos (por ejemplo, Penicilina, Bacitracina, Clortetraciclina, y Oxitetraciclina).

Los pollos o pollos de cebado jóvenes, pavos y patos criados para producción de carne se alimentan de forma diferente a las gallinas mantenidas para la producción de huevos. Los pollos de engorde, patos y pavos tienen cuerpos más grandes y ganan peso más rápidamente de lo que lo hacen los tipos de pollos productores de huevos. Por lo tanto, estas aves se alimentan con dietas con mayores niveles de proteína y energía.

10 Debe entenderse que cuando se hace referencia en la presente especificación, incluyendo las reivindicaciones adjuntas, a 'pienso de aves de corral' dicha referencia se pretenden que incluya piensos "iniciadores" (posteriores a la salida del huevo), piensos "finalizadores", "de crecimiento" o "de desarrollo" (desde las 6-8 semanas de edad hasta que se alcanza el tamaño de matanza) y piensos "de puesta" (alimento durante la producción de huevos).

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

En un aspecto preferido, el pienso animal contiene un material bruto tal como una legumbre, por ejemplo, guisante o soja o un cereal, por ejemplo, trigo, maíz (mijo), centeno o cebada. Adecuadamente, el material bruto puede ser patata.

20 **Productos de pienso**

Los polipéptidos variantes PS4 pueden usarse en piensos para consumo animal por la aplicación indirecta o directa de los polipéptidos variantes PS4 al pienso, bien solos o en combinación con otros ingredientes, tal como ingredientes alimenticios.

25 Los ingredientes alimenticios típicos pueden incluir uno cualquiera o más de un aditivo tal como una grasa animal o vegetal, un aderezo natural o sintético, antioxidante, modificador de la viscosidad, aceite esencial, y/o sabor, tinte y/o colorante, vitamina, mineral, aminoácido natural y/o no natural, nutriente, enzima adicional (incluyendo enzimas genéticamente manipuladas), un agente aglutinante tal como goma guar o goma de xantano, tampón, emulsionante, lubricante, adyuvante, agente de suspensión, conservante, agente de recubrimiento o agente solubilizante y semejantes.

30 Los ejemplos de los métodos de aplicación incluyen, pero no están limitados a, recubrimiento del pienso en un material que comprende el polipéptido variante PS4, aplicación directa por mezclado del polipéptido variante PS4 con el pienso, pulverización del polipéptido variante PS4 en la superficie del pienso o inmersión del pienso en una preparación del polipéptido variante PS4.

35 El polipéptido variante PS4 se aplica preferiblemente mezclándolo con un pienso o por pulverización en las partículas de pienso para consumo animal. Alternativamente, el polipéptido variante PS4 puede incluirse en la emulsión de un pienso, o el interior de productos sólidos por inyección o tabor rotatorio.

40 El polipéptido variante PS4 puede aplicarse para intercalar, recubrir y/o impregnar un pienso. Las mezclas con otros ingredientes también pueden usarse y pueden aplicarse separadamente, simultáneamente o secuencialmente. Los agentes quelantes, agentes aglutinantes, emulsionantes y otros aditivos tales como micro y macro minerales, aminoácidos, vitaminas, grasas animales, grasas vegetales, conservantes, saporíferos, colorantes, pueden aplicarse de forma similar al pienso simultáneamente (bien en mezcla o separadamente) o aplicarse secuencialmente.

Cantidad de Polipéptido Variante PS4

45 La cantidad óptima del polipéptido variante PS4 que se va a usar dependerá del pienso que se va a tratar y/o del método de contacto del pienso con el polipéptido variante PS4 y/o del uso pretendido para el mismo. La cantidad de polipéptido variante PS4 debería ser una cantidad suficiente para ser efectiva para degradar sustancialmente el almidón resistente después de ingestión y durante la digestión del pienso.

Ventajosamente, el polipéptido variante PS4 permanecerá efectivo después de la ingestión de un pienso para consumo animal y durante la digestión del pienso hasta que se obtiene una digestión más completa del pienso, es decir, se libera un valor calorífico incrementado del pienso.

50 **Combinaciones de amilasa**

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

Una alfa-amilasa maltogénica de Bacillus (EP 120 693) está disponible comercialmente con el nombre comercial Novamyl (Novo Nordisk A/S, Dinamarca) y se usa ampliamente en la industria panadera como un agente anti-endurecimiento debido a su capacidad de reducir la retrogradación del almidón. Novamyl se describe con detalle en la Publicación de Patente Internacional WO 91/04669. La alfa-amilasa maltogénica Novamyl comparte varias características con ciclodextrina glucanotransferasas (CGTasas), incluyendo homología de secuencia (Henrissat B, Bairoch A; Biochem. J., 316, 695-696 (1996)) y formación de productos de transglicosilación (Christophersen, C., et al., 1997, Starch, vol. 50, No. 1, 39-45).

En realizaciones altamente preferidas, describimos combinaciones que comprenden polipéptidos variantes PS4 junto con Novamyl o cualquiera de sus variantes. Dichas combinaciones son útiles para la producción de alimentos tal como horneado. El Novamyl puede comprender en particular Novamyl 1500 MG.

Otros documentos que describen Novamyl y sus usos incluyen Christophersen, C., Pedersen, S., y Christensen, T., (1993) Method for producción of maltosa an a limit dextrin, the limit dextrin, and use of the limit dextrin. Dinamarca, y WO 95/10627. Se describe adicionalmente en la Pat. U.S. No. 4.598.048 y la Pat. U.S. No. 4.604.355. Cada uno de estos documentos se incorpora por la presente por referencia, y cualquiera de los polipéptidos Novamyl descritos allí puede usarse en combinaciones con cualquiera de los polipéptidos variantes PS4 descritos aquí.

Las variantes, homólogos, y mutantes de Novamyl pueden usarse para las combinaciones, siempre que retengan su actividad alfa amilasa. Por ejemplo, cualquiera de las variantes de Novamyl descritas en la Patente US Número 6.162.628, cuya descripción completa se incorpora por la presente por referencia, pueden usarse en combinación con los polipéptidos variantes PS4 descritos aquí. En particular, pueden usarse cualquiera de los polipéptidos descritos en ese documento, específicamente las variantes de SEQ ID NO:1 de US 6.162.628 en una cualquiera o más posiciones correspondientes a 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 hace uso de un ácido nucleico variante PS4, y las secuencias de aminoácidos de dichos ácidos nucleicos variantes PS4 están englobadas por los métodos y composiciones descritos aquí.

Tal y como se usa en la presente memoria, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "polipéptido" y/o el término "proteína". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "péptido". En algunos casos, el término "secuencia de aminoácidos" es sinónimo del término "enzima".

La secuencia de aminoácidos puede prepararse/aislarse a partir de una fuente adecuada, o puede prepararse sintéticamente o puede prepararse por el uso de técnicas de ADN recombinante.

La enzima variante PS4 descrita aquí puede usarse conjuntamente con otras enzimas. Así, describimos además una combinación de enzimas en la que la combinación comprende una enzima polipéptido variante PS4 descrita aquí y otra enzima, que en sí misma puede ser otra enzima polipéptido variante PS4.

Secuencia de nucleótidos variante PS4

Como se ha indicado anteriormente, describimos secuencias de nucleótidos que codifican las enzimas variantes PS4 que tienen las propiedades específicas descritas.

El término "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" tal y como se usa en la presente memoria se refiere a una secuencia de oligonucleótido o secuencia de polinucleótido, y variante, homólogos, fragmentos y derivados de ésta (tal como partes de ésta). La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico o sintético o recombinante, que puede ser bicatenario o monocatenario ya represente la cadena con sentido o anti-sentido.

El término "secuencia de nucleótidos" tal y como se usa en este documento incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético, y RNA. Preferiblemente, significa ADN, más preferiblemente secuencia de ADNc que codifica un polipéptido variante PS4.

Típicamente, la secuencia de nucleótidos variante PS4 se prepara usando técnicas de ADN recombinante (es decir, ADN recombinante). Sin embargo, en una realización alternativa, la secuencia de nucleótidos podría sintetizarse, todo o en parte, usando métodos químicos muy conocidos en la técnica (véase Caruthers MH et al., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 215-23 y Horn T et al., (1980) Nuc Acids Res Symp Ser 225-232).

Preparación de secuencias de ácido nucleico

Una secuencia de nucleótidos que codifica bien una enzima que tiene las propiedades específicas como se define en la presente memoria (por ejemplo, un polipéptido variante PS4) o una enzima que es adecuada para modificación, tal como una enzima parental, puede identificarse y/o aislarse y/o purificarse de cualquier célula u organismo que produce dicha enzima. En la técnica son muy conocidos varios métodos para la identificación y/o aislamiento y/o purificación de secuencias de nucleótidos. Como ejemplo, las técnicas de amplificación por PCR para preparar más de una secuencia pueden usarse una vez una secuencia adecuada se ha identificado y/o aislado y/o purificado.

Como ejemplo adicional, puede construirse una biblioteca de ADN genómico y/o ADNc usando 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 se conoce, pueden sintetizarse sondas de oligonucleótidos marcadas y usarse para identificar clones que codifican la enzima de la biblioteca genómica preparada del organismo. Alternativamente, una sonda de oligonucleótido marcada que contiene secuencias homólogas a otro gen de enzima conocido podría usarse para identificar los clones que codifican la enzima. En el último caso, se usan condiciones de hibridación y lavado de menor astringencia.

Alternativamente, los clones que codifican la enzima podrían identificarse insertando fragmentos de ADN genómico en un vector de expresión, tal como un plásmido, transformando bacterias negativas para la enzima con la biblioteca de ADN genómico resultante, y después plaqueando las bacterias transformadas en placas de agar que contienen un sustrato para la enzima (es decir, maltosa), permitiendo de esta manera identificar los clones que expresan la enzima.

En una alternativa adicional más, la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima puede prepararse sintéticamente por métodos estándar establecidos, por ejemplo, el método de fósforoamidita 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, p 801-805. En el método de fósforoamidita, se sintetizan oligonucleótidos, por ejemplo, en un sintetizador automático de ADN, se purifican, se hibridan, se ligan y se clonan en vectores apropiados.

La secuencia de nucleótidos puede ser de origen mixto genómico y sintético, origen mixto sintético y ADNc, u origen mixto genómico y ADNc, preparada ligando fragmentos de origen sintético, genómico o ADNc (según sea apropiado) según técnicas estándar. Cada fragmento ligado corresponde a varias partes de la secuencia de nucleótidos completa. La secuencia de ADN también puede prepararse por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores específicos, por ejemplo, como se describe en US 4.683.202 o en Saiki R K et al., (Science (1988) 239, pp 487-491).

Variantes/homólogos/derivados

Describimos además el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de una enzima o de cualquier secuencia de nucleótidos que codifica dicha enzima, tal como un polipéptido variante PS4 o un ácido nucleico variante PS4. A no ser que el contexto dicte otra cosa, el término "ácido nucleico variante PS4" debería tomarse para incluir cada una de las entidades del ácido nucleico descritas más adelante, y el término "polipéptido variante PS4" debería asimismo tomarse para incluir cada una de las entidades del polipéptido o aminoácido descritas más adelante.

Aquí, el término "homólogo" significa una entidad que tiene una determinada homología con las secuencias de aminoácidos objeto y las secuencias de nucleótidos objeto. Aquí, el término "homología" puede igualarse con "identidad".

En el presente contexto, una secuencia homóloga se toma para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos 75, 80, 85 ó 90% idéntica, preferiblemente al menos 95, 96, 97, 98 ó 99% idéntica a la secuencia objeto. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos etc. que la secuencia de aminoácidos objeto. Aunque la homología también puede considerarse en términos de similitud (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades químicas/funciones similares), en el contexto de este documento se prefiere expresar homología en términos de identidad de secuencia.

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

Las comparaciones de homología pueden realizarse a simple vista, o más habitualmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles comercialmente pueden calcular el % de homología entre dos o más secuencias.

El % de homología puede calcularse sobre secuencias contiguas, es decir, una secuencia se alinea con la otra secuencia y cada aminoácido en una secuencia se compara directamente con el aminoácido correspondiente en la otra secuencia, un residuo cada vez. Esto se denomina alineamiento "sin huecos". Típicamente, dichos alineamientos sin huecos se realizan sólo sobre un número relativamente pequeño de residuos.

5 Aunque éste es un método muy simple y consistente, falla al no tener en consideración que, por ejemplo, en un par de secuencias de otra manera idénticas, una inserción o delección causará que los residuos de aminoácidos siguientes estén fuera del alineamiento, resultando así potencialmente en una gran reducción en el % de homología cuando se realiza un alineamiento global. Consecuentemente, la mayor parte de los métodos de comparación de secuencias se diseñan para producir alineamientos óptimos que tienen en consideración inserciones y delecciones
10 posibles sin penalización indebida de la puntuación de homología global. Esto se consigue insertando "huecos" en el alineamiento de las secuencias para intentar maximizar la homología local.

Sin embargo, estos métodos más complejos asignan "penalizaciones por hueco" a cada hueco que ocurre en el alineamiento de manera que, para el mismo número de aminoácidos idénticos, un alineamiento de secuencias con tan pocos huecos como sea posible - lo que refleja una mayor relación entre las dos secuencias comparadas - conseguirá una mayor puntuación que uno con muchos huecos. Se usan "costes de hueco afines" típicamente que cargan un coste relativamente alto para la existencia de un hueco y una penalización menor para cada residuo posterior en el hueco. Éste es el sistema de puntuación de huecos usado más comúnmente. Las altas penalizaciones por hueco producirán por supuesto alineamientos optimizados con menores huecos. La mayor parte de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones por hueco. Sin embargo, se prefiere usar los valores por defecto cuando se usa dicho software para comparaciones de secuencias. Por ejemplo, cuando se usa el paquete GCG Wisconsin Bestfit, la penalización por hueco por defecto para secuencias de aminoácidos es -12 para un hueco y -4 para cada extensión.

El cálculo del % de homología máximo por lo tanto requiere en primer lugar la producción de un alineamiento óptimo, que tiene en consideración penalizaciones por hueco. Un programa de ordenador adecuado para llevar a cabo dicho alineamiento es el paquete GCG Wisconsin Bestfit (Devereux et al 1984 Nuc. Acids Research 12 p387). Los ejemplos de otros software que pueden realizar comparaciones de secuencias, incluyen, pero no están limitados a, el 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 GENWORKS de herramientas de comparación. Tanto BLAST como FASTA están disponibles para búsqueda fuera de línea y en línea (véase Ausubel et al., 1999, Short Protocols in Molecular Biology, páginas 7-58 a 7-60).

Sin embargo, para algunas aplicaciones, se prefiere usar 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): 247-50; FEMS Microbiol Lett 1999 177(1): 187-8 y tatiana@ncbi.nlm.nih.gov).

35 Aunque el % de homología final puede medirse en términos de identidad, el proceso de alineamiento en sí mismo no está basado típicamente en una comparación por pares de todo o nada. En lugar de esto, se usa generalmente una matriz de puntuación de similitud escalada que asigna puntuaciones a cada comparación por pares sobre la base de similitud química o distancia evolutiva. Un ejemplo de dicha matriz usada comúnmente es la matriz BLOSUM62 - la matriz por defecto para el paquete de programas BLAST. Los programas GCG Wisconsin generalmente usan bien los valores por defecto públicos o una tabla de comparación de símbolos personalizada si se suministra (véase el manual del usuario para detalles adicionales). Para algunas aplicaciones, se prefiere usar los valores por defecto públicos para el paquete GCG, o en el caso de otro software, la matriz por defecto, tal como BLOSUM62.

45 Alternativamente, los porcentajes de homología pueden calcularse usando la característica de alineamiento múltiple en DNASIS™ (Software Hitachi), basada en un algoritmo, análogo a CLUSTAL (Higgins DG y Sharp PM (1988), Gene 73(1), 237-244).

Una vez que el software ha producido un alineamiento óptimo, es posible calcular el % de homología, preferiblemente el % de identidad de secuencia. El software típicamente hace esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

50 Las secuencias también pueden tener delecciones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y resultan en una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones deliberadas de aminoácidos pueden hacerse sobre la base de similitud en las propiedades de los aminoácidos (tales como polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos) y es por lo tanto útil para agrupar a los aminoácidos conjuntamente en grupos funcionales. Los aminoácidos pueden agruparse conjuntamente sólo sobre la base de las propiedades de su cadena lateral. Sin embargo, es más útil
55 incluir también datos de mutación. Los conjuntos de aminoácidos así obtenidos se conservan probablemente por razones estructurales. Estos conjuntos pueden describirse en la 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 hacerse sustituciones conservativas, por ejemplo, según la tabla siguiente que describe un agrupamiento de aminoácidos por el diagrama de Venn aceptado generalmente.

| Conjunto | | Sub-conjunto | |
|-------------|-------------------------|-----------------------|-----------|
| Hidrofóbico | F W Y H K M I L V A G C | Aromático | F W Y H |
| | | Alifático | I L V |
| Polar | W Y H K R E D C S T N Q | Cargado | H K R E D |
| | | Cargado positivamente | H K R |
| | | Cargado negativamente | E D |
| Pequeño | V C A G S P T N D | Muy pequeño | A G S |

5 Describimos además secuencias que comprenden sustitución homóloga (sustitución y reemplazo se usan ambos en la presente memoria para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente, con un residuo alternativo) que puede ocurrir, es decir, sustitución de semejante por semejante, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar etc. La sustitución no homóloga también puede ocurrir, es decir, de una clase de residuo a otra o alternativamente que implica la inclusión de aminoácidos no naturales tal como ornitina (de aquí en adelante en la presente memoria referido como Z), ácido diaminobutírico ornitina (de aquí en adelante en la presente memoria referido como B), norleucina ornitina (de aquí en adelante en la presente memoria referido como O), piriilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

15 Las secuencias de aminoácidos variantes pueden incluir grupos espaciadores adecuados que pueden insertarse entre cualesquiera dos residuos de aminoácidos de la secuencia incluyendo grupos alquilo tal como grupos metilo, etilo o propilo además de espaciadores de aminoácidos tales como residuos de glicina o β -alanina. Una forma entendida por los expertos en la técnica. Para evitar dudas, "la forma peptoide" se usa para hacer referencia a residuos de aminoácidos variantes en los que el grupo sustituyente del carbono α está en el átomo de nitrógeno del residuo en lugar del carbono α . Los procesos para preparar péptidos en la forma peptoide son conocidos en la técnica, por ejemplo, Simon RJ et al., PNAS (1992) 89(20), 9367-9371 y Horwell DC, Trends Biotechnol. (1995) 13(4), 132-134.

20 Las secuencias de nucleótidos descritas aquí, y adecuadas para uso en los métodos y composiciones descritos aquí (tal como ácidos nucleicos variantes PS4) pueden incluir en ellas nucleótidos sintéticos o modificados. En la técnica se conocen varios tipos diferentes de modificación de oligonucleótidos. Éstas incluyen núcleos de metilfosfonato y fósforotioato y/o la adición de cadenas de acridina o polilisina en los extremos 3' y/o 5' de la molécula. Para los propósitos de este documento, debe entenderse que las secuencias de nucleótidos como se describen aquí, pueden modificarse por cualquier método disponible en la técnica. Dichas modificaciones pueden llevarse a cabo con el fin de aumentar la actividad o vida útil *in vivo* de las secuencias de nucleótidos.

30 Describimos además el uso de secuencias de nucleótidos que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de éstas. Si la secuencia es complementaria a un fragmento de éstas, entonces esa secuencia puede usarse como una sonda para identificar secuencias codificadoras similares en otros organismos etc.

35 Los polinucleótidos que no son 100% homólogos a las secuencias variantes PS4 pueden obtenerse de diferentes formas. Otras variantes de las secuencias descritas en la presente memoria pueden obtenerse por ejemplo ensayando con sondas bibliotecas de ADN hechas a partir de un rango de individuos, por ejemplo, individuos de diferentes poblaciones. Además, pueden obtenerse otros homólogos y dichos homólogos y fragmentos de éstos en general serán capaces de hibridar selectivamente con las secuencias mostradas en el listado de secuencias de la presente memoria. Dichas secuencias pueden obtenerse ensayando bibliotecas de ADNc hechas a partir de o bibliotecas de ADN genómico de otras especies, y ensayando dichas bibliotecas con sondas que comprenden todo o parte de una cualquiera de las secuencias en el listado de secuencias adjunto en condiciones de astringencia media a alta. Se aplican consideraciones similares para obtener homólogos de especies y variantes alélicas de las secuencias de polipéptidos o nucleótidos descritas aquí.

45 Las variantes y homólogos de cepa/especie también pueden obtenerse usando PCR degenerada que usará cebadores diseñados para tomar como diana secuencias en las variantes y homólogos que codifican secuencias de aminoácidos conservadas. Las secuencias conservadas pueden predecirse, por ejemplo, alineando las secuencias de aminoácidos de varias variantes/homólogos. Los alineamientos de secuencia pueden realizarse usando software informático conocido en la técnica. Por ejemplo, el programa GCG Wisconsin PileUp se usa ampliamente.

Los cebadores usados en PCR degenerada contendrán una o más posiciones degeneradas y se usarán en condiciones de astringencia menores que las usadas para clonar secuencias con cebadores de secuencia única frente a secuencias conocidas.

Alternativamente, dichos polinucleótidos pueden obtenerse por mutagénesis dirigida a sitio de secuencias caracterizadas. Esto puede ser útil cuando, por ejemplo, se requieren cambios silenciosos en la secuencia de codones para optimizar preferencias de codones para una célula huésped particular en las que se están expresando las secuencias de polinucleótidos. Pueden desearse otros cambios de secuencia con el fin de introducir sitios de reconocimiento de enzimas de restricción, o para alterar la propiedad o función de los polipéptidos codificados por los polinucleótidos.

Los polinucleótidos (secuencias de nucleótidos) tal como ácidos nucleicos variantes PS4 descritos en este documento, pueden usarse 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 informador por medios convencionales usando marcadores radiactivos o no radiactivos, o los polinucleótidos pueden clonarse en vectores. Dichos cebadores, sondas y otros fragmentos tendrán una longitud de al menos 15, preferiblemente al menos 20, por ejemplo al menos 25, 30 ó 40 nucleótidos, y también están englobados por el término polinucleótidos.

Los polinucleótidos tal como polinucleótidos y sondas de ADN pueden producirse recombinantemente, sintéticamente, o por cualquier medio disponible para los expertos en la técnica. También pueden clonarse por técnicas estándar. En general, los cebadores se producirán por medios sintéticos, que implican una fabricación por etapas de la secuencia de ácido nucleico deseada con un nucleótido cada vez. Las técnicas para conseguir esto usando técnicas automatizadas están fácilmente disponibles en la técnica.

Los polinucleótidos más largos se producirán generalmente usando medios recombinantes, por ejemplo, usando técnicas de clonación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Los cebadores pueden diseñarse para contener sitios de reconocimiento de enzimas de restricción adecuados de manera 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 memoria.

Tal y como se usa en la presente memoria "biológicamente activo" se refiere a una secuencia que tiene una función estructural similar (pero no necesariamente de la misma magnitud), y/o función reguladora similar (pero no necesariamente de la misma magnitud), y/o función bioquímica similar (pero no necesariamente de la misma magnitud) que la secuencia natural.

Hibridación

Describimos además secuencias que son complementarias a las secuencias de ácido nucleico de variantes PS4 o secuencias que son capaces de hibridar bien con las secuencias variantes PS4 o con secuencias que son complementarias de éstas.

El término "hibridación" tal y como se usa en la presente memoria incluirá "el proceso por el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria mediante emparejamiento de bases" así como el proceso de amplificación como se lleva a cabo en tecnologías de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Por lo tanto, describimos el uso de secuencias de nucleótidos que son capaces de hibridar con las secuencias que son complementarias a las secuencias presentadas en la presente memoria, o cualquier derivado, fragmento o derivado de éstas.

El término "variante" también engloba secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

Preferiblemente, el término "variante" engloba secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridar en condiciones astringentes (por ejemplo, 50°C y 0,2xSSC {1xSSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na₃ citrato pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria. Más preferiblemente, el término "variante" engloba secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridar en condiciones de alta astringencia (por ejemplo, 65°C y 0,1xSSC {1xSSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Na₃ citrato pH 7,0}) con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria.

Describimos además secuencias de nucleótidos que pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos de variantes PS4 (incluyendo secuencias complementarias a las presentadas en la presente memoria), así como secuencias de nucleótidos que con complementarias a las secuencias que pueden hibridar con las secuencias de nucleótidos de variantes PS4 (incluyendo secuencias complementarias a las presentadas en la presente memoria). Describimos además secuencias de polinucleótidos que son capaces de hibridar con las secuencias de nucleótidos presentadas en la presente memoria en condiciones de astringencia intermedia a máxima.

En un aspecto preferido, describimos secuencias de nucleótidos que pueden hibridar con la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico variante PS4, o el complemento de éste, en condiciones astringentes (por ejemplo, 50°C y 0,2xSSC). Más preferiblemente, las secuencias de nucleótidos pueden hibridar con la secuencia de nucleótidos de una variante PS4, o el complemento de éste, en condiciones de alta astringencia (por ejemplo, 65°C y 0,1xSSC).

Mutagénesis dirigida a sitio

Una vez que se ha aislado la secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, o se ha identificado una posible secuencia de nucleótidos que codifica la enzima, puede ser deseable mutar la secuencia con el fin de preparar una enzima. De acuerdo con esto, una secuencia variante PS4 puede prepararse a partir de una secuencia parental. Pueden introducirse mutaciones usando oligonucleótidos sintéticos. Estos oligonucleótidos contienen secuencias de nucleótidos que flanquean los sitios de mutación deseados.

Un método adecuado se describe en Morinaga et al., (Biotechnology (1984) 2, p646-649). Otro método para introducir mutaciones en secuencias de nucleótidos que codifican una enzima se describe en Nelson y Long (Analytical Biochemistry (1989), 180, p 147-151). Un método adicional se describe en Sarkar y Sommer (Biotechniques (1990), 8, p404-407 - "The megaprimer method of site directed mutagenesis").

En un aspecto, la secuencia para uso en los métodos y composiciones descritos aquí es una secuencia recombinante - es decir, una secuencia que se ha preparado usando técnicas de ADN recombinante. Estas técnicas de ADN recombinante están dentro de las capacidades de un experto en la técnica. Dichas técnicas se explican en la bibliografía, por ejemplo, J. Sambrook, E. F. Fritsch, y T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición, Libros 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

En un aspecto, la secuencia para uso en los métodos y composiciones descritos aquí es una secuencia sintética - es decir, una secuencia que se ha preparado por síntesis química o enzimática *in vitro*. Incluye, pero no está limitado a, secuencias preparadas con uso de codones óptimo para organismos huésped - tal como las levaduras metilotróficas *Pichia* y *Hansenula*.

La secuencia de nucleótidos para uso en los métodos y composiciones descritos aquí puede incorporarse en un vector replicable recombinante. El vector puede usarse para replicar y expresar la secuencia de nucleótidos, en forma de enzima, en y/o a partir de una célula huésped compatible. La expresión puede controlarse usando secuencias de control, por ejemplo, secuencias reguladoras. La enzima producida por una célula huésped recombinante por expresión de la secuencia de nucleótidos puede secretarse o puede estar contenida intracelularmente dependiendo de la secuencia y/o el vector usado. Las secuencias codificadoras pueden diseñarse con secuencias señal que dirigen la secreción de las secuencias codificadoras de la sustancia a través de una membrana celular procarionta o eucariota particular.

Expresión de ácidos nucleicos y polipéptidos PS4

Los polinucleótidos y ácidos nucleicos PS4 pueden incluir ADN y ARN tanto de origen sintético como natural, ADN o ARN que puede contener desoxi o didesoxi nucleótidos o ribonucleótidos modificados o no modificados o análogos de éstos. El ácido nucleico PS4 puede existir como ADN o ARN mono o bicatenario, un heterodúplex ARN/ADN o un copolímero ARN/ADN, en el que el término "copolímero" se refiere a una única cadena de ácido nucleico que comprende tanto ribonucleótidos como desoxirribonucleótidos. El ácido nucleico PS4 puede incluso estar optimizado por codones para incrementar adicionalmente la expresión.

El término "sintético", tal y como se usa en la presente memoria, se define como el que se produce por síntesis química o enzimática *in vitro*. Incluye, pero no está limitado a, ácidos nucleicos PS4 preparados con uso de codones óptimos para organismos huésped tal como las levaduras metilotróficas *Pichia* y *Hansenula*.

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

El término "célula transformada" incluye células que se han transformado por el uso de técnicas de ADN recombinante. La transformación ocurre típicamente por inserción de una o más secuencias de nucleótidos en una célula que se va a transformar. La secuencia de nucleótidos insertada puede ser una secuencia de nucleótidos heteróloga (es decir, es una secuencia que no es natural para la célula que se va a transformar. Además, o alternativamente, la secuencia de nucleótidos insertada puede ser una secuencia de nucleótidos homóloga (es decir, es una secuencia que es natural para la célula que se va a transformar) - de manera que la célula recibe una o más copias extra de una secuencia de nucleótidos ya presente en ella.

Así, en una realización adicional, proporcionamos un método para preparar polipéptidos y polinucleótidos variantes PS4 por la introducción de un polinucleótido en un vector replicable, introducción del vector en una célula huésped compatible, y crecimiento de la célula huésped en condiciones que llevan a cabo la replicación del vector. El vector puede recuperarse de la célula huésped.

Construcciones de expresión

El ácido nucleico PS4 puede unirse de forma operativa a elementos reguladores de la transcripción y la traducción activos en una célula huésped de interés. El ácido nucleico PS4 también puede codificar una proteína de fusión que

comprende secuencias señal tales como, por ejemplo, las obtenidas del gen de glucoamilasa de *Schwanniomyces occidentalis*, gen de tipo factor de apareamiento α de *Saccharomyces cerevisiae* y la TAKA-amilasa de *Aspergillus oryzae*. Alternativamente, el ácido nucleico PS4 puede codificar una proteína de fusión que comprende un dominio de unión a membrana.

5 *Vector de expresión*

El ácido nucleico PS4 puede expresarse a los niveles deseados en un organismo huésped usando un vector de expresión.

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

15 *Componentes del vector de expresión*

El vector de expresión típicamente incluye los componentes de un vector de clonación, tal como, por ejemplo, un elemento que permite la replicación autónoma del vector en el organismo huésped seleccionado y uno o más marcadores fenotípicamente detectables para propósitos de selección. El vector de expresión comprende normalmente secuencias de nucleótidos de control que codifican un promotor, operador, sitio de unión a ribosomas, señal de inicio de la traducción y opcionalmente, un gen represor o uno o más genes activadores. Adicionalmente, el vector de expresión puede comprender una secuencia que codifica una secuencia de aminoácidos capaz de dirigir el polipéptido variante PS4 a un orgánulo de una célula huésped tal como un peroxisoma o a un compartimento particular de una célula huésped. Dicha secuencia de direccionamiento incluye, pero no está limitada a, la secuencia SKL. En el presente contexto, el término "señal de expresión" incluye cualquiera de las secuencias de control anteriores, secuencias represoras o activadoras. Para la expresión bajo la dirección de secuencias de control, la secuencia de ácido nucleico del polipéptido variante PS4 se une de forma operativa a las secuencias de control de una manera apropiada respecto a la expresión.

Preferiblemente, un polinucleótido en un vector está unido de forma operativa a una secuencia de control que es capaz de proporcionar la expresión de la secuencia codificadora por la célula huésped, es decir, el vector es un vector de expresión. El término "unido de forma operativa" significa que los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Una secuencia reguladora "unida de forma operativa" a una secuencia codificadora se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Las secuencias de control pueden modificarse, por ejemplo, por la adición de elementos reguladores de la transcripción adicionales para hacer que el nivel de la transcripción dirigida por las secuencias de control tenga una mejor respuesta a los moduladores de la transcripción. Las secuencias de control pueden comprender en particular promotores.

Promotor

En el vector, la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido variante PS4 está combinada de forma operativa con una secuencia promotora adecuada. El promotor puede ser cualquier secuencia de ADN que tiene actividad de transcripción en el organismo huésped elegido y puede obtenerse de genes que son homólogos o heterólogos para el organismo huésped.

Promotores bacterianos

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

Promotores fúngicos

Para la transcripción en una especie fúngica, los ejemplos de promotores útiles son aquellos obtenidos de los genes que codifican la TAKA amilasa de *Aspergillus oryzae*, proteinasa aspártica de *Rhizomucor miehei*, α -amilasa neutra de *Aspergillus niger*, α -amilasa estable en ácido de *A. niger*, glucoamilasa de *A. niger*, lipasa de *Rhizomucor miehei*,

proteasa alcalina de *Aspergillus oryzae*, triosa fosfato isomerasa de *Aspergillus oryzae* o acetamidasa de *Aspergillus nidulans*.

Promotores de levaduras

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

Organismos huésped

(I) Organismos huésped bacterianos

10 Los ejemplos de organismos huésped bacterianos adecuados con especies de bacterias gram positivas tal como *Bacillaceae* incluyendo *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* tal como *Streptomyces murinus*, especies de bacterias de ácido láctico incluyendo *Lactococcus* spp. tal como *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus* spp. incluyendo *Lactobacillus reuteri*, *Leuconostoc* spp., *Pediococcus* spp. y *Streptococcus* spp. Alternativamente, pueden
15 seleccionarse cepas de una especie de bacterias gram-negativa que pertenece a *Enterobacteriaceae* incluyendo *E. coli*, o a *Pseudomonadaceae* como el organismo huésped.

(II) Organismos huésped de levaduras

20 Un organismo huésped de levadura adecuado puede seleccionarse de las levaduras biotecnológicamente relevantes tales como pero no limitadas a especies de levaduras tales como *Pichia* sp., *Hansenula* sp o *Kluyveromyces*, especies de *Yarrowinia* o una especie de *Saccharomyces* incluyendo *Saccharomyces cerevisiae* o una especie que pertenece a *Schizosaccharomyce* tal como, por ejemplo, especie *S. Pombe*.

Preferiblemente, una cepa de la especie de levadura metilotrófica *Pichia pastoris* se usa como el organismo huésped. Preferiblemente, el organismo huésped es una especie de *Hansenula*.

(III) Organismos huésped fúngicos

25 Los organismos huésped adecuados entre los hongos filamentosos incluyen especies de *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus tubigensis*, *Aspergillus awamori* o *Aspergillus nidulans*. Alternativamente, las cepas de una especie de *Fusarium*, por ejemplo, *Fusarium oxysporum* o de una especie de *Rhizomucor* tal como *Rhizomucor miehei* pueden usarse como el organismo huésped. Otras cepas adecuadas incluyen especies de *Thermomyces* y *Mucor*.

30 Expresión y purificación de proteínas

Las células huésped que comprenden polinucleótidos pueden usarse para expresar polipéptidos, tal como polipéptidos variantes PS4, fragmentos, homólogos, variantes o derivados de éstos. Las células huésped pueden cultivarse en condiciones adecuadas que permiten la expresión de las proteínas. La expresión de los polipéptidos puede ser constitutiva de manera que se producen continuamente, o inducible, que requiere un estímulo para iniciar
35 la expresión. En el caso de la expresión inducible, la producción de proteínas puede iniciarse cuando se requiera, por ejemplo, por la adición de una sustancia inductora al medio de cultivo, por ejemplo, dexametasona o IPTG.

Los polipéptidos pueden extraerse de las células huésped por una variedad de técnicas conocidas en la técnica, incluyendo lisis enzimática, química y/o osmótica y disrupción física. Los polipéptidos también pueden producirse recombinantemente en un sistema sin células *in vitro*, tal como el sistema de reticulocitos de conejo TnT™ (Promega).
40

Ejemplos

Ejemplo 1. Clonación de PS4

Se crece *Pseudomonas sacharophila* toda la noche en medio LB y se aísla el ADN cromosómico por métodos estándar (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* por PCR usando los cebadores P1 y P2 (véase la Tabla 3). El fragmento resultante se usa como un 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 que permite la expresión intracelular de PS4. El fragmento de 1605 pb se clona en pCRBLUNT TOPO (Invitrogen) y la integridad de la construcción se analiza por 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*.
50

Se prepara una segunda construcción de expresión en la que el dominio de unión a almidón de PS4 se elimina. 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 que resulta en el plásmido pCSmta-SBD.

Ejemplo 2. Mutagénesis dirigida a sitio de PS4

- 5 Se introducen mutaciones en el gen mta por 2 métodos. Bien por un método basado en PCR de 2 etapas, o por un método de Quick Exchange (QE). Por conveniencia, el gen mta se divide en 3 partes; un fragmento PvuI-FspI, un fragmento FspI-PstI y un fragmento PstI-AspI, referidos más adelante como fragmento 1, 2 y 3 respectivamente.

10 En el método basado en PCR de 2 etapas, se introducen mutaciones usando la ADN polimerasa Pfu (Stratagene). Se lleva a cabo una primera PCR con un cebador de mutagénesis (Tabla 4) para la cadena codificadora más un cebador en 3' de la cadena inferior (bien 2R ó 3R Tabla 3). El producto de la reacción se usa como un cebador en una segunda PCR junto con un cebador en 5' de la cadena codificadora. El producto de la última reacción se clona en pCRBLUNT topo (Invitrogen) y después de secuenciación, el fragmento se intercambia con el fragmento correspondiente en pCSmta.

15 Usando el método Quick Exchange (Stratagene), se introducen mutaciones usando dos cebadores complementarios en una PCR en un plásmido que contiene el gen mta, o parte del gen mta.

20 Para este propósito, se construye un conjunto conveniente de plásmidos, que comprende 3 plásmidos SDM y 3 plásmidos pCSΔ. Los plásmidos SDM portan cada uno 1 de los fragmentos del gen mta como se ha mencionado anteriormente, en el que se introduce la mutación deseada por QE. Después de la verificación por secuenciación, los fragmentos se clonan en el plásmido pCSΔ receptor correspondiente. Los plásmidos pCSΔ son derivados inactivos de pCSmta. La actividad se restaura por clonación del fragmento correspondiente del plásmido SDM, permitiendo un cribado fácil.

Tabla 3. Cebadores usados en la clonación del gen mta, y cebadores estándar usados en la construcción de mutantes con dirección a sitio con el método de PCR de 2 etapas.

| Cebador | Secuencia del 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 ATC CTC</u> AGA ACG AGC CGC TGG T | BamHI |
| 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 usados para introducir mutaciones dirigidas a sitio en mta

| Mutación | Secuencia del Oligo | Modificación | Cadena | Propósito |
|----------|-----------------------------------|--------------|--------|-----------|
| G134R | CTGCCGGCCGGCCAGcGCTTCTGGCG | | + | SDM |
| G134R- | cgccagaagcgctggccggccggcag | | - | SDM |
| I157L | GACGGTGACCGCTTCcTgGGCGGCGAGTCG | | + | SDM |
| I151L- | cgactcgccgcccaggaagcggtcaccgctc | | - | SDM |
| G223A | GGCGAGCTGTGGAAGccCCTTCTGAATATCCG | | + | SDM |
| G223A - | cggatattcagaaggggctttccacagctcgcc | | - | SDM |
| H307L | gaacGGCGGCCAGCACctgTGGGCGCTGCAG | | + | SDM |
| H307L - | ctgcagcgcccacaggtgctggccgcttc | | - | SDM |

| Mutación | Secuencia del Oligo | Modificación | Cadena | Propósito |
|-------------------|--------------------------------------------------------------|--------------|--------|-----------|
| S334P, D343E | GTACTGG ^{ccg} CACATGTACGACTGGGGCTACGGC gaaTTCATC | | + | SDM |
| S334P, D343E - | gatgaattcgcgtagccccagtcgtacatgtgcgccagtac | | - | SDM |

Tabla 5. Características de los plásmidos SDM y pCSΔ

| Plásmido | Características/construcción |
|----------|--------------------------------------------------------------------|
| SDM1 | pBlueSK+ fragmento de 480 bp Sall-Stul de mta |
| SDM2 | pBlueSK+ fragmento de 572 bp SacII-PstI de mta |
| SDM3 | pBlueSK+ fragmento de 471 bp Sall-Stul de mta |
| pCSΔ1 | Sitio FseI relleno con Klenow ----> desplazamiento de marco en mta |
| pCSΔ2 | Fragmento FspI-PstI de mta reemplazado con 'ADN sin valor' |
| pCSΔ3 | Fragmento PstI-AspI de mta reemplazado con 'ADN sin valor' |

Ejemplo 3. Multi SDM

Las variantes PS4 se generaron usando un kit de Mutagénesis Dirigida a Sitio Multi QuickChange® (Stratagene) según el protocolo del fabricante con algunas modificaciones como se describe.

5 Etapa 1: Reacción de Síntesis de la Cadena Mutante (PCR)

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

- Incubar toda la noche a 37°C, aproximadamente 200 rpm,
- Sedimentar las células por centrifugación (5.000 rpm/5 min)

10 - Eliminar el medio por vertido

- Preparar molde de ds-ADN usando el Protocolo de Purificación Mini de Plásmido de QIAGEN

1. La reacción de síntesis de la cadena mutante para ciclado termal se preparó como sigue:

Mezcla de PCR:

2,5 µl Tampón de reacción Multi 10X QuickChange®

0,75 µl QuickSolution

X µl Cebadores $\left(\begin{array}{l} \text{longitud del cebador 28-35 pb} \rightarrow 10 \text{ pmoles} \\ \text{longitud del cebador 24-27 pb} \rightarrow 7 \text{ pmoles} \\ \text{longitud del cebador 20-23 pb} \rightarrow 5 \text{ pmoles} \end{array} \right)$

1 µl Mezcla de dNTP

X µl Molde ds-ADN (200 ng)

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

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

Mezclar todos los componentes pipeteando y sedimentar brevemente las mezclas de reacción.

2. Ciclar las reacciones usando los parámetros siguientes:

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

hibridación de cebador (62,8°C/1min)

elongación (65°C/15min)

5 después mantener a 4°C

Precalentar la tapa de la máquina de PCR hasta 105°C y la placa hasta 95°C antes de poner los tubos de PCR en la máquina (ciclador termal eppendorf).

Etapa 2: Digestión con *Dpn I*

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

2. Incubar a 37°C durante ~3 hr.

Etapa 3: Transformación de células ultracompetentes XL10-Gold®

1. Descongelar células XL10-Gold en hielo. Alicuotar 45 µl de células por reacción de mutagénesis en tubos Falcon pre-enfriados.

15 2. Encender el baño de agua (42°C) y poner un tubo con caldo NZY⁺ en el baño para pre-calentarlo.

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

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

20 5. Aplicar pulsos de calor a los tubos en el baño de agua a 42°C durante 30 s y poner en hielo durante 2 min.

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

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

25 8. Incubar las placas de transformación a 37°C toda la noche.

Tabla 6. Tabla de cebadores para pPD77d14:

| Mutación | Secuencia del Oligo | Modificación | Cadena | Propósito |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|--------|-----------|
| N33Y, D34N | GCGAAGCGCCCTACAACCTGGTACAAC | 5' fosfato | + | MSDM |
| K71R | CCGACGGCGGCAGGTCCGGCG | 5' fosfato | + | MSDM |
| G87S | CAAGAACAGCCGCTACGGCAGCGAC | 5' fosfato | + | MSDM |
| G121D | CACATGAACCGCGACTACCCGGACAAG | 5' fosfato | + | MSDM |
| G134R | CTGCCGCGCCGAGcGCTTCTGGCG | 5' fosfato | + | MSDM |
| A141P | CGCAACGACTGCGCCGACCCGGG | 5' fosfato | + | MSDM |
| I157L | GACGGTGACCGCTTcTgGGCGGCGAGTCG | 5' fosfato | + | MSDM |
| L178F, A179T | CGCGACGAGTTTACCAACCTGCG | 5' fosfato | + | MSDM |
| G223A | GGCGAGCTGTGGAAAgccCCTTCTGAATATCCG | 5' fosfato | + | MSDM |
| H307L | gaacGGCGGCCAGCACctgTGGGCGCTGCAG | 5' fosfato | + | MSDM |
| S334P, D343E | GTA ^{Gccg} CTGGC ^g CACATGTACGACTGGGGCTACGGC gaa ^{TTCATC} | 5' fosfato | + | MSDM |

Tabla 7. Tabla de cebadores para pPD77d20:

| Mutación | Secuencia del Oligo | Modificación | Cadena | Propósito |
|--------------|-------------------------------------------------|--------------|--------|-----------|
| 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 | GACGGTGACCGCTTcTgGGCGGCGAGTCG | 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 del Oligo | Modificación | Cadena | Propósito |
|--------------|------------------------------------|--------------|--------|-----------|
| N33Y, D34N | GCGAAGCGCCCTACAACCTGGTACAAC | 5' fosfato | + | MSDM |
| G121D | CACATGAACCGCGACTACCCGGACAAG | 5' fosfato | + | MSDM |
| G134R | CTGCCGGCCGGCCAGcGCTTCTGGCG | 5' fosfato | + | MSDM |
| A141P | CGCAACGACTGCGCCGACCCGGG | 5' fosfato | + | MSDM |
| I157L | GACGGTGACCGCTTcTgGGCGGCGAGTCG | 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 usado para pPD77 se basa en pCRbluntTOPOII (invitrogen). El casete de resistencia a zeocina se ha eliminado por pmII, fragmento de 393 pb eliminado. El casete de expresión del vector pCC (P32-ssCGTase-PS4-tt) se ha insertado en el vector.

Ligación de variante PS4 en pCCMini

El plásmido que contiene las mutaciones relevantes (creado por MSDM) se corta con la enzima de restricción Nco 1 y Hind III (Biolabs):

- 10 3 µg de ADN plasmídico, X µl de tampón 10x 2, 10 unidades de Nco1, 20 unidades de HindIII,

Incubación 2h a 37°C

Correr la digestión en un gel de agarosa al 1%. Los fragmentos con tamaño de 1293 pb (gen PS4) se retiran cortando el gel y se purifican usando el kit de purificación en gel Qiagen.

- 15 El vector pCCMini se corta entonces con enzimas de restricción, Nco 1 y Hind III, y la digestión se corre entonces en un gel de agarosa al 1%. El fragmento con tamaño de 3569 pb se retira cortando el gel y se purifica usando el kit de purificación en gel Qiagen.

Ligación: Usar el kit de ligación de ADN rápido (Roche)

Usar una cantidad doble de inserto comparado con el vector

por ejemplo, 2 µl de inserto (gen de PS4)

1 µl de vector

5 5 µl de tampón de ligación T4 ADN 2xconc

1 µl de dH₂O

1 µl de ADN ligasa T4

Ligar 5 min/RT

10 Transformar la ligación en células competentes One Shot TOPO según el protocolo del fabricante (Invitrogen). Usar 5 µl de ligación por transformación.

Plaquear 50 µl de mezcla de transformación en placas LB (33,6 g/l Agar Lennox L, Sigma) que contiene 1% almidón y 0,05 µg/ml kanamicina. Los vectores que contienen el inserto (variantes PS4) pueden reconocerse por formación de halo en las placas de almidón.

Ejemplo 4. Transformación en *Bacillus subtilis* (Transformación de protoplastos)

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

A. Medios para formar 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. Distribuir en partes de 50 ml y autoclavar durante 10 min.

4 x YT (1/2 NaCl) 2 g de extracto de levadura + 3,2 g de Triptona + 0,5 g NaCl por 100 ml. mezclar volúmenes iguales de 2 x SMM y 4 x YT.

PEG 10 g de polietilenglicol 6000 (BDH) ó 8000 (Sigma) en 25 ml de 1 x SMM (autoclavar durante 10 min.).

B. Medios para plaqueo/regeneración

agar 4% agar mínimo Difco. Autoclavar durante 15 min.

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

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

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

casaminoácidos disolución al 5% (p/v). Autoclavar durante 15 min.

extracto de levadura 10 g por 100 ml, autoclavar durante 15 min.

glucosa disolución al 20% (p/v). Autoclavar durante 10 min.

Medio de regeneración 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

10 ml de MgCl₂

100 ml de agar fundido

Añadir antibióticos apropiados: cloranfenicol y tetraciclina, 5 ug/ml; eritromicina, 1 ug/ ml. La selección en kanamicina es problemática en medio DM3: pueden requerirse concentraciones de 250 ug/ml.

5 C. *Preparación de protoplastos*

1. Usar material de plástico o vidrio sin detergente en todo el proceso.

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

10 3. Diluir el cultivo de toda la noche 20 veces en 100 ml de medio 2 x YT fresco (matraz de 250 ml) y crecer hasta DO₆₀₀ = 0,4-0,5 (aprox. 2h) a 37C en un agitador (200-250 rev/min).

4. Recoger las células por centrifugación (9.000g, 20 min, 4 C).

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

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

15 Después de 30 min y posteriormente a intervalos de 15 min, examinar muestras de 25 ul por microscopía. Continuar la incubación hasta que el 99% de las células están como protoplastos (apariciencia globular). Recoger los protoplastos por centrifugación (4.000g, 20 min, RT) y retirar con pipeta el sobrenadante. Resuspender el sedimento suavemente en 1-2 ml de SMMP.

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

D. *Transformación*

1. Transferir 450 ul de PEG a un microtubo.

25 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 suavemente.

3. Dejar durante 2 min a RT, y entonces añadir 1,5 ml de SMMP y mezclar.

4. Recoger los protoplastos por microcentrifugación (10 min, 13.000 rev/min (10-12.000 g)) y retirar por vertido el sobrenadante. Retirar las gotitas remanentes con una toallita.

30 Añadir 300 ul de SMMP (no agitar con vórtex) e incubar durante 60-90 min a 37 C en un baño de agua con agitación (100 rev/min) para permitir la expresión de los marcadores de resistencia a antibiótico. (Los protoplastos se resuspenden suficientemente mediante la acción de agitación del baño de agua.). Hacer diluciones apropiadas en 1 x SSM y plaquear 0,1 ml en placas DM3

Ejemplo 5. Fermentación de variantes PS4 en matraces oscilantes

El sustrato del matraz oscilante se prepara como sigue:

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

35 El sustrato se ajusta a pH 6,8 con ácido sulfúrico 4N o hidróxido de sodio antes de autoclavar. Se ponen 100 ml de sustrato en un matraz de 500 ml con un deflector y se autoclava durante 30 minutos. Posteriormente, se añaden 6

ml de jarabe de dextrosa estéril. El jarabe de dextrosa se prepara mezclando un volumen de dextrosa al 50% p/v con un volumen de agua seguido de autoclave durante 20 minutos.

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

Ejemplo 6. Ensayos de amilasa

Ensayo Betamyl

- 10 Una unidad Betamyl se define como la actividad que degrada 0,0351 mmoles por 1 min. de maltopentaosa acoplada a PNP de manera que 0,0351 mmoles de PNP por 1 min. pueden liberarse por α-glucosidasa en exceso en la mezcla de ensayo. La mezcla de ensayo contiene 50 µl de 50 mM Na-citrato, 5 mM CaCl₂, pH 6,5 con 25 µl de muestra de enzima y 25 µl de sustrato Betamyl (Glc5-PNP y α-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 entonces se para por la adición de 150 µl de 4% Tris. La absorbancia a 420 nm se mide usando un lector ELISA y la actividad Betamyl se calcula sobre la base de Actividad = A420 * d en unidades de Betamyl/ml de muestra de enzima ensayado.
- 15

Ensayo endo-amilasa

El ensayo endo-amilasa es idéntico al ensayo Phadebas operado según el fabricante (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB).

Exo-especificidad

- 20 La relación de actividad exo-amilasa a actividad Phadebas se usó para evaluar la exo-especificidad.

Actividad específica

- 25 Para las variantes PSac-D14, PSac-D20 y PSac-D34 encontramos una actividad específica promedio de 10 unidades Betamyl por microgramo de proteína purificada medida según Bradford (1976; Anal. Biochem. 72, 248). Esta actividad específica se usa para sobre la base de la actividad calcular las dosificaciones usadas en los estudios de aplicación.

Ejemplo 7. Determinación de la vida media

- 30 t_{1/2} se define como el tiempo (en minutos) durante el que se inactiva la mitad de la actividad de la enzima en condiciones de calor definidas. Con el fin de determinar la vida media de la enzima, la muestra se calienta durante 1-10 minutos a temperaturas constantes de 60°C a 90°C. La vida media se calcula basándose en el ensayo Betamyl residual.

- 35 Procedimiento: En un vial Eppendorf, se pre-calientan 1.000 µl de tampón durante al menos 10 minutos a 60°C o más. El tratamiento con calor de la muestra se inicia por la adición de 100 µl de la muestra al tampón pre-calentado en mezclado continuo (800 rpm) del vial Eppendorf en un incubador con calor (Termomixer comfort de Eppendorf). Después de 0, 2, 4, 6, 8 y 9 minutos de incubación, el tratamiento se para mediante la transferencia de 45 µl de la muestra a 1.000 µl del tampón equilibrado a 20°C e incubación durante un minuto a 1.500 rpm y a 20°C. La actividad residual se mide con el ensayo Betamyl.

Cálculo: El cálculo de t_{1/2} se basa en la pendiente de log₁₀ (el logaritmo de base 10) de la actividad Betamyl residual frente al tiempo de incubación. t_{1/2} se calcula como Pendiente/0,301=t_{1/2}.

Ejemplo 8. Sistema modelo de ensayos de horneado

- 40 Las masas se preparan en el Harinógrafo a 30,0°C. Se pesan 10,00 g de harina reformada y se añaden en el Harinógrafo; después de 1 min de mezclado, se añade la referencia/muestra (referencia = tampón o agua, muestra = enzima+ tampón o agua) con una pipeta estéril a través de los agujeros del tanque de amasado. Después de 30 seg. la harina se raspa de los bordes - también a través de los agujeros del tanque de amasado. La muestra se amasa durante 7 min.

- 45 Se realiza un ensayo con tampón o agua en el Harinógrafo antes de operarse la referencia final. FU debería ser 400 en la referencia, si no es así, éste debería ajustarse con, por ejemplo, la cantidad de líquido. La referencia/muestra se retira con una espátula y se pone en la mano (con un guante desechable en ésta), antes de rellenar con ella tubos de vidrio pequeños (con una longitud de aprox. 4,5 cm) que se ponen en tubos de RMN y se tapan con un corcho. Se preparan 7 tubos por masa.

- 50 Cuando se han preparado todas las muestras, los tubos se ponen en un baño de agua (programable) a 33°C (sin corchos) durante 25 min. y posteriormente el baño de agua se ajusta para permanecer durante 5 min. a 33°C,

después para calentar hasta 98°C durante 56 min. (1,1°C por minuto) y finalmente para permanecer durante 5 min. a 96°C.

5 Los tubos se almacenan a 20,0°C en un armario termostatzado. El contenido sólido de la miga se mide por RMN de protón usando un analizador de RMN Bruker NMS 120 Minispec en el día 1, 3 y 7 como se muestra para las muestras de miga preparadas con 0,05, 1 y 2 ppm PSacD34 en la Fig. 2. El menor incremento en contenido sólido con el tiempo representa la reducción en la retrogradación de amilopeptina. Después de 7 días de almacenamiento a 20,0°C en un armario termostatzado, se pesan muestras de 10-20 mg de miga y se ponen en cápsulas DSC estándar de aluminio de 40 µl y se mantienen a 20°C.

10 Las cápsulas se usan para Calorimetría Diferencial de Barrido en un instrumento Mettler Toledo DSC 820. Como parámetros, se usan un ciclo de calentamiento de 20-95°C con 10°C por min. calentamiento y Gas/flujo: N₂/80 ml por min. Los resultados se analizan y la entalpía para la fusión de la amilopeptina retrogradada se calcula en J/g.

Ejemplo 9. Efectos antiendurecimiento

15 Las migas de pan modelo se preparan y miden según el Ejemplo 8. Como se muestra en la Tabla 2, las variantes PS4 muestran una fuerte reducción de la retrogradación de amilopeptina después del horneado como se mide por Calorimetría Diferencial de Barrido en comparación con el control. Las variantes PS4 muestran un claro efecto de la dosificación.

Ejemplo 10. Efectos de firmeza en estudios de horneado

20 Los estudios de horneado se llevaron a cabo con una receta de bizcocho y masa de pan blanco estándar para tostada americana. La masa del bizcocho se prepara a partir de 1.600 g de harina "Clásica de Uso General " de Sisco Mills, EEUU", 950 g de agua, 40 g de aceite de judía de soja y 32 g de levadura seca. El bizcocho se mezcla durante 1 min. a baja velocidad y posteriormente 3 min. a velocidad 2 en un mezclador de espiral Hobart. El bizcocho se fermenta posteriormente durante 2,5 horas a 35°C, 85% RH seguido de 0,5 horas a 5°C.

25 Posteriormente, se añaden al bizcocho 400 g de harina, 4 g de levadura seca, 40 g de sal, 2,4 g de propionato de calcio, 240 g de jarabe de maíz con alto contenido en fructosa (Isosweet), 5 g del emulsionante PANODAN 205, 5 g de harina de soja con enzima activa, 30 g de harina de soja no activa, 220 g de agua y 30 g de una disolución de ácido ascórbico (preparada a partir de 4 g de ácido ascórbico solubilizado en 500 g de agua). La masa resultante se mezcla durante 1 min. a baja velocidad y después 6 min. a velocidad 2 en un mezclador Diosna. Posteriormente, la masa se deja reposar durante 5 min. a temperatura ambiente, y después se escalan partes de masa de 550 g, se dejan reposar durante 5 min. y después se laminan en un laminador Glimex con los ajustes 1:4, 2:4, 3:15, 4:12 y 10
30 a cada lado y se transfiere a un molde de horneado. Después de 60 min. de fermentación a 43°C a 90% RH, las masas se hornean durante 29 min. a 218°C

La firmeza y resiliencia se midieron con un analizador de textura TA-XT 2. La suavidad, cohesividad y resiliencia se determina analizando rebanadas de pan por Análisis de Perfil de Textura usando un Analizador de Textura de Stable Micro Systems, Reino Unido. Se usaron los ajustes siguientes:

35 Velocidad Pre ensayo: 2 mm/s

Velocidad en el ensayo: 2 mm/s

Velocidad Post ensayo: 10 mm/s

Distancia del Ensayo de Ruptura: 1%

Distancia: 40%

40 Fuerza: 0,098 N

Tiempo: 5,00 seg

Cuenta: 5

Célula de Carga: 5 kg

Tipo de Disparador: Auto - 0,01 N

45 Las medidas de firmeza muestran que los polipéptidos variantes PS4 reducen significativamente el desarrollo de la firmeza desde el día 1 al día 7 y muestran un mayor efecto con dosificación de enzima creciente.

Ejemplo 11. Control del volumen de los bollos daneses

Se preparan bollos daneses a partir de una masa basada en 2.000 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 la optimización de agua previa.

- 5 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 escalan 1.350 g de masa y se dejan reposar durante 10 min. en una cabina de calentamiento a 30°C. Los bollos se moldean en un moldeador Fortuna y se fermentan durante 45 min. a 34°C y a 85% de humedad relativa. Posteriormente, 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 pesarlos y medir el volumen.

Los bollos se evalúan respecto a la apariencia de la corteza, homogeneidad de la miga, recubrimiento de la corteza, volumen modelo y específico (medir el volumen con el método de desplazamiento de semilla dee colza).

- 15 Sobre la base de estos criterios, se encuentra que las variantes PS4 incrementan el volumen específico y mejoran los parámetros de calidad de los bollos daneses. Así, las variantes PS4 son capaces de controlar el volumen de los productos horneados.

Ejemplo 12. Resultados

Tabla 9. Propiedades bioquímicas de variantes PSac comparado con PSac-cc1 de tipo salvaje

| Variante | t _{1/2} -75 | t _{1/2} -80 | Betamyl/ Phadebas | Mutaciones |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| PSac-cc1 | <0,5 | | 40 | |
| PSac-D3 | 9,3 | 3 | 43 | N33Y, D34N, K71 R, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, D343E, S334P |
| PSac-D14 (SEQ ID NO: 4) | 9,3 | 2,7 | 65 | N33Y, D34N, K71R, G87S, G121D, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, D343E, S334P |
| PSac-D20 (SEQ ID NO: 3) | 7,1 | 2,7 | 86 | N33Y, D34N, K71R, G121D, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, D343E, S334P |
| PSac-D34 (SEQ ID NO: 2) | 8,4 | 2,9 | 67 | N33Y, D34N, G121D, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, S334P |
| PSac-pPD77d33 (SEQ ID NO: 13) | 7,1 | 3 | 51 | N33Y, D34N, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, G223A, H307L, S334P |
| pMD55 | | 6,0 | 54 | N33Y D34N G121F G134R, A141P I157L G223A H307L S334P L178F A179T |
| pMD85 | | 5,1 | 115 | N33Y D34N G121F G134R, A141P I157L G223E H307L S334P L178F A179T |
| PMD96 | | 4,0 | 231 | N33Y D34N G121F G134R, A141P I157L G223E H307L S334P L178F A179T S161A |
| pMD86 | | 3,6 | 170 | N33Y D34N G121A G134R, A141P I157L G223E H307L S334P L178F A179T |
| pMD109 | | 3,6 | 170 | N33Y D34N G121A G134R, A141P I157L G223E H307L S334P L178F A179T S161A |

- 20 Las secuencias pPD77d40, pMD55, pMD85, pMD96, pMD86 y pMD109 tienen los residuos en la columna 5 mutados y el dominio de unión a almidón deleciónado en un fondo de *P. saccharophila* de tipo salvaje (SEQ ID NO: 1). Sus secuencias pueden construirse de una manera directa con esta información.

Los efectos detallados de mutaciones individuales en varias posiciones se describen en las subsecciones siguientes.

Termoestabilidad aumentada del polipéptido variante PS4 con la mutación 121F

- 25 Un polipéptido variante PS4 designado pMD55 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y, D34N, **G121F**, G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, L178F, A179T se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente. Véase también el Ejemplo 12 y la Tabla 9 anterior.

| Variante | t _{1/2} -75 | t _{1/2} -80 | Betamyl/Phadebas | Mutaciones |
|----------------------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| PSac-pPD77d33 (SEQ ID NO: 13) | 7,1 | 3 | 51 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |
| pMD55 | | 6,0 | 54 | N33Y D34N G121F G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |

Exo-especificidad aumentada del polipéptido variante PS4 con la mutación 161A

Un polipéptido variante PS4 designado pMD96 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, I157L, **S161A**, L178F, A179T, G223E, H307L, S334P se ensaya para exo-especificidad. Este polipéptido presenta exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente. Véase también el Ejemplo 12 y la Tabla 9 anterior.

5

| Variante | t _{1/2} -75 | t _{1/2} -80 | Betamyl/Phadebas | Mutaciones |
|----------|----------------------|----------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pMD85 | | 5,1 | 115 | N33Y D34N G121F G134R A141P I157L L178F A179T G223E H307L S334P |
| PMD96 | | 4,0 | 231 | N33Y D34N G121F G134R A141P I157L S161A L178F A179T G223E H307L S334P |

Exo-especificidad aumentada del polipéptido variante PS4 con la mutación 223E

Un polipéptido variante PS4 designado pMD85 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, I157L, L178F, A179T, **G223E**, H307L, S334P se ensaya para exo-especificidad. Este polipéptido presenta exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente. Véase también el Ejemplo 12 y la Tabla 9 anterior.

10

| Variante | t _{1/2} -75 | t _{1/2} -80 | Betamyl/Phadebas | Mutaciones |
|----------|----------------------|----------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| pMD55 | | 6,0 | 54 | N33Y D34N G121F G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |
| pMD85 | | 5,1 | 115 | N33Y D34N G121F G134R, A141P I157L L178F A179T G223E H307L S334P |

Ejemplo 13. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación 121D

Un polipéptido variante PS4 designado pMD3 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121D** H307L S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -80 | Betamyl/Phadebas | Mutaciones |
|----------|----------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------|
| pMD28 | 2,3 | 41 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |
| pMD3 | 2,8 | 99 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G121D H307L S334P |

Ejemplo 14. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación 121W

Un polipéptido variante PS4 designado pMD44 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121W** H307L S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -80 | Betamyl/Phadebas | Mutaciones |
|----------|----------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------|
| pMD28 | 2,3 | 41 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |
| pMD44 | 4,8 | 172 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G121W H307L S334P |

Ejemplo 15. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación 121H

Un polipéptido variante PS4 designado pMD43 a que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121H** H307L S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -80 | BetamyI/Phadebas | Mutaciones |
|----------|----------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------|
| pMD28 | 2,3 | 41 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |
| pMD43 a | 3,7 | 110 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G121H H307L S334P |

5 Ejemplo 16. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación 121M

Un polipéptido variante PS4 designado pMD41 a que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121M** H307L S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -80 | BetamyI/Phadebas | Mutaciones |
|----------|----------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------|
| pMD28 | 2,3 | 41 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |
| pMD41 a | 3,3 | 145 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G121M H307L S334P |

Ejemplo 17. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación 121A

10 Un polipéptido variante PS4 designado pMD74 a que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121A** H307L S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -80 | BetamyI/Phadebas | Mutaciones |
|----------|----------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------|
| pMD28 | 2,3 | 41 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |
| pMD74 a | 3,3 | 87 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G121A H307L S334P |

Ejemplo 18. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación 121Y

15 Un polipéptido variante PS4 designado pMD73a que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T **G121Y** H307L S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -80 | BetamyI/Phadebas | Mutaciones |
|----------|----------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------|
| pMD28 | 2,3 | 41 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |
| pMD73 | 4,8 | 101 | N33Y D34N G134R A141P I157L L178F A179T G121Y H307L S334P |

Ejemplo 19. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación 223A

20 Un polipéptido variante PS4 designado pMD3 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -80 | BetamyI/Phadebas | Mutaciones |
|----------|----------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| pMD25 | 1,3 | 58 | N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T H307L S334P |
| pMD3 | 2,8 | 99 | N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |

Ejemplo 20. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación 223K

Un polipéptido variante PS4 designado SSM173 F6 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T G223K H307L S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -80 | BetamyI/Phadebas | Mutaciones |
|-----------|----------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| pMD25 | 1,3 | 58 | N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T H307L S334P |
| SSM173 F6 | 1,6 | 118 | N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T G223K H307L S334P |

5 Ejemplo 21. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación 223V

Un polipéptido variante PS4 designado pMD49 a que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T G223V H307L S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -80 | BetamyI/Phadebas | Mutaciones |
|----------|----------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| pMD25 | 1,3 | 58 | N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T H307L S334P |
| pMD49 a | 0,6 | 115 | N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T G223V H307L S334P |

Ejemplo 22. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación 223E

10 Un polipéptido variante PS4 designado SSM171 G11 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T G223E H307L S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -80 | BetamyI/Phadebas | Mutaciones |
|------------|----------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| pMD25 | 1,3 | 58 | N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T H307L S334P |
| SSM171 G11 | 3,0 | 113 | N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T G223E H307L S334P |

Ejemplo 23. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación G223R

15 Un polipéptido variante PS4 designado SSM173 B6 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T G223R H307L S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -80 | BetamyI/Phadebas | Mutaciones |
|-----------|----------------------|------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| pMD25 | 1,3 | 58 | N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T H307L S334P |
| SSM173 B6 | 1,5 | 76 | N33Y D34N G121D G134R A141P I157L L178F A179T G223R H307L S334P |

Ejemplo 24. Termoestabilidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación Y146G

20 Un polipéptido variante PS4 designado SSM 381 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| SEQ ID NO: | Identificador | Mutación | Núcleo | t _{1/2} -80 | t _{1/2} -85 |
|------------|---------------|----------|--------|----------------------|----------------------|
| 15 | SSM381 | Y146G | pMD96 | 20 | 2.6 |
| 14 | PMD96 | | | 6,0 | 1,4 |

Ejemplo 25. Termoestabilidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación 157M

Un polipéptido variante PS4 designado SSM279 B1 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157M, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| SEQ ID NO: | Identificador | Mutación | Núcleo | t _{1/2} -80 |
|------------|---------------|----------|--------|----------------------|
| 16 | PMD140 | L157M | PMD96 | 7,6 |
| 13 | PMD96 | | | 6,0 |

5 Ejemplo 26. Termoestabilidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación 158T

Un polipéptido variante PS4 designado SSM237 P2 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 158T, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| SEQ ID NO: | Identificador | Mutación | Núcleo | t _{1/2} -80 |
|------------|---------------|----------|--------|----------------------|
| 17 | PMD130 | G158T | PMD96 | 8,0 |
| 13 | PMD96 | | | 6,0 |

Ejemplo 27. Termoestabilidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación 198W y/o 229P

10 Un polipéptido variante PS4 designado SSM325 F3 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307L y 334P se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

Un polipéptido variante PS4 designado pMD129 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 198W, 223E, 229P, 307L y 334P se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido

15 presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| SEQ ID NO: | Identificador | Mutación | Núcleo | t _{1/2} -80 | t _{1/2} -85 |
|------------|---------------|--------------|--------|----------------------|----------------------|
| 20 | pMD129 | Y198W, S229P | pMD96 | | 2,4 |
| 19 | SSM325 F3 | S229P | pMD96 | 7,9 | 1,8 |
| 14 | pMD96 | | | 6,0 | 1,4 |

Ejemplo 28. Exo-especificidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación G303E o G303D

Un polipéptido variante PS4 designado SSM341 A9 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 303E, 307L y 334P se ensaya para exo-especificidad. Este polipéptido presenta exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

20 Un polipéptido variante PS4 designado SSM341 G11 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 303D, 307L y 334P se ensaya para exo-especificidad. Este polipéptido presenta exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| SEQ ID NO: | Identificador | Mutación | Núcleo | BetamyI/Phadebas |
|------------|---------------|----------|--------|------------------|
| 21 | SSM341 A9 | G303E | pMD96 | 256 |
| 22 | SSM341 G11 | G303D | pMD96 | 230 |
| 14 | pMD96 | | | 179 |

Ejemplo 29. Exo-especificidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación H306T o H306G

25 Un polipéptido variante PS4 designado SSM350 B11 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 306T, 307L y 334P se ensaya para exo-especificidad. Este polipéptido presenta exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

Un polipéptido variante PS4 designado SSM350 C12 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 306G, 307L y 334P se ensaya para exo-especificidad. Este polipéptido presenta exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

30

| SEQ ID NO: | Identificador | Mutaciones | Núcleo | Betamy/Phadebas |
|------------|---------------|------------|--------|-----------------|
| 23 | SSM350 B11 | H306T | pMD96 | 271 |
| 24 | SSM350 C12 | H306G | pMD96 | 195 |
| 14 | pMD96 | | | 179 |

Ejemplo 30. Exo-especificidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación A309P

Un polipéptido variante PS4 designado SSM332 Q4 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 309P, 307L y 334P se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| SEQ ID NO: | Identificador | Mutación | Núcleo | t _{1/2} -80 | t _{1/2} -85 |
|------------|---------------|----------|--------|----------------------|----------------------|
| 25 | SSM332 Q4 | A309P | pMD96 | 7,5 | 2,5 |
| 14 | PMD96 | | | 6,0 | 1,4 |

5 Ejemplo 31. Termoestabilidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación R316S o R316P

Un polipéptido variante PS4 designado SSM365 B4 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 316S, y 334P se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

10 Un polipéptido variante PS4 designado SSM365 F4 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 316P y 334P se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| SEQ ID NO: | Identificador | Mutación | Núcleo | t _{1/2} -80 | t _{1/2} -t _{1/2} -85 |
|------------|---------------|----------|--------|----------------------|----------------------------------------|
| 26 | SSM365 B4 | R316S | pMD96 | 7,5 | 2,5 |
| 27 | SSM365 F4 | R316P | pMD96 | 7,1 | 2,0 |
| 14 | PMD96 | | | 6,0 | 1,4 |

Ejemplo 32. Termoestabilidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación R353T

15 Un polipéptido variante PS4 designado SSM360 C7 que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 334P y 353T se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| SEQ ID NO: | Identificador | Mutación | Núcleo | t _{1/2} -80 | t _{1/2} -85 |
|------------|---------------|----------|--------|----------------------|----------------------|
| 28 | SSM360 C7 | R353T | pMD96 | 5,6 | 2,6 |
| 14 | PMD96 | | | 6,0 | 1,4 |

Ejemplo 33. Exo-especificidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación 26E

Un polipéptido variante PS4 designado SSM219 B3 que tiene mutaciones de aminoácidos en **N26E** N33Y D34N G121F G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P se ensaya para exo-especificidad. Este polipéptido presenta exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -85 | Betamy/Phadebas | Mutaciones |
|----------|----------------------|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| pMD55 | | 54 | N33Y D34N G121F G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |
| SSM29 B3 | | 94 | N26E N33Y D34N G121F G134R A141P I157L L178F A179T G223A H307L S334P |

20 La vida media t_{1/2}-85 se determina según el Ejemplo 8, después de filtración en gel de las muestras con columnas PD-10 (de Amersham Biosciences) usando un tampón de 50 mM citrato de sodio, 5 mM CaCl₂, pH 6,5.

Ejemplo 34. Exo-especificidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación 70D

Un polipéptido variante PS4 designado SAS1401 L10 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N **G70D** G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P se ensaya para exo-especificidad. Este polipéptido presenta exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -85 | Betamyl/Phadebas | Mutaciones |
|-------------|----------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pMD153 | | 206 | N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P |
| SAS1401 L10 | | 245 | N33Y D34N G70D G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P |

- 5 La vida media t_{1/2}-85 se determina según el Ejemplo 8, después de filtración en gel de las muestras con columnas PD-10 (de Amersham Biosciences) usando un tampón de 50 mM citrato de sodio, 5 mM CaCl₂, pH 6,5.

Ejemplo 35. Termoestabilidad y exo-especificidad aumentadas de polipéptido variante PS4 con la mutación 145D

- 10 Un polipéptido variante PS4 designado SAS1387 D16 bf que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P se ensaya para termoestabilidad y exo-especificidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada y exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -85 | Betamyl/Phadebas | Mutaciones |
|----------------|----------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pMD153 | 12,3 | 206 | N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P |
| SAS1387 D16 bf | 22,3 | 336 | N33Y D34N G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P |

La vida media t_{1/2}-85 se determina según el Ejemplo 8, después de filtración en gel de las muestras con columnas PD-10 (de Amersham Biosciences) usando un tampón de 50 mM citrato de sodio, 5 mM CaCl₂, pH 6,5.

Ejemplo 36. Termoestabilidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación 188H

- 15 Un polipéptido variante PS4 designado pMD236 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G70D G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T S161A L178F A179T **G188H** G223E S229P H307L A309P S334P W339E se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

| Variante | t _{1/2} -85 | Betamyl/Phadebas | Mutaciones |
|-----------|----------------------|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pMD212 bf | 12,2 | | N33Y D34N G70D G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P W339E |
| pMD236 | 16,1 | | N33Y D34N G70D G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T |
| | | | S161A L178F A179T G188H G223E S229P H307L A309P S334P W339E |

- 20 La vida media t_{1/2}-85 se determina según el Ejemplo 8, después de filtración en gel de las muestras con columnas PD-10 (de Amersham Biosciences) usando un tampón de 50 mM citrato de sodio, 5 mM CaCl₂, pH 6,5.

Ejemplo 37. Termoestabilidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación 188S

Un polipéptido variante PS4 designado pMD237 bf que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G70D G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T S161A L178F A179T **G188S** G223E S229P H307L A309P S334P W339E se ensaya para termoestabilidad. Este polipéptido presenta termoestabilidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

5

| Variante | t _{1/2} -85 | Betamyl/Phadebas | Mutaciones |
|-----------|----------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pMD212 bf | 12,2 | | N33Y D34N G70D G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P W339E |
| pMD237 bf | 12,6 | | N33Y D34N G70D G121F G134R A141P N145D Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G188S G223E S229P H307L A309P S334P W339E |

La vida media t_{1/2}-85 se determina según el Ejemplo 8, después de filtración en gel de las muestras con columnas PD-10 (de Amersham Biosciences) usando un tampón de 50 mM citrato de sodio, 5 mM CaCl₂, pH 6,5.

Ejemplo 38. Exo-especificidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación 339A

Un polipéptido variante PS4 designado SAS1379 O13 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P **W339A** se ensaya para exo-especificidad. Este polipéptido presenta exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

10

| Variante | t _{1/2} -85 | Betamyl/Phadebas | Mutaciones |
|-------------|----------------------|------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pMD153 | | 206 | N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P |
| SAS1379 O13 | | 301 | N33Y D34N G121F G134R A141P |
| | | | Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P W339A |

La vida media t_{1/2}-85 se determina según el Ejemplo 8, después de filtración en gel de las muestras con columnas PD-10 (de Amersham Biosciences) usando un tampón de 50 mM citrato de sodio, 5 mM CaCl₂, pH 6,5.

Ejemplo 39. Exo-especificidad aumentada de polipéptido variante PS4 con la mutación 339E

Un polipéptido variante PS4 designado SAS 1379 O9 que tiene mutaciones de aminoácidos en N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P **W339E** se ensaya para exo-especificidad. Este polipéptido presenta exo-especificidad mejorada como se muestra en la tabla siguiente.

15

| Variante | t _{1/2} -85 | Betamyl/Phadebas | Mutaciones |
|------------|----------------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| pMD153 | | 206 | N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P |
| SAS1379 O9 | | 347 | N33Y D34N G121F G134R A141P Y146G I157L G158T S161A L178F A179T G223E S229P H307L A309P S334P W339E |

La vida media t_{1/2}-85 se determina según el Ejemplo 8, después de filtración en gel de las muestras con columnas PD-10 (de Amersham Biosciences) usando un tampón de 50 mM citrato de sodio, 5 mM CaCl₂, pH 6,5.

20

Aspectos adicionales de la descripción

En la presente memoria también se describen los párrafos numerados siguientes:

- 5 Párrafo A1. Un polipéptido variante PS4 que se puede obtener a partir de un polipéptido parental que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, en el que el polipéptido variante PS4 comprende una mutación de aminoácidos en la posición 121 con referencia a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophilla* mostrada como SEQ ID NO: 1.
- Párrafo A2. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo A1, en el que la mutación en la posición 121 comprende una sustitución 121F, 121Y y/o 121W, preferiblemente G121F, G121Y y/o G121W.
- 10 Párrafo A3. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo A1 o A2, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además una o más mutaciones adicionales en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 161 y 223.
- Párrafo A4. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo A3, en el que la una o más mutaciones adicionales se selecciona del grupo que consiste en: 161A, 223E y 223K, más preferiblemente S161A, G223E y/o G223K.
- Párrafo A5. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo A precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 121, 161; 121, 223.
- 15 Párrafo A6. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo A5, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 121F/Y/W, 161A; 121F/Y/W, 223E/K.
- Párrafo A7. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo A precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 121, 161 y 223.
- 20 Párrafo A8. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo A precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones 121F/Y/W, 161A, 223E/K.
- Párrafo A9. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo A precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además una o más mutaciones, preferiblemente todas, seleccionadas del grupo que consiste en posiciones: 134, 141, 157, 223, 307, 334.
- 25 Párrafo A10. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo A precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además mutaciones en cualquiera o ambas de las posiciones 33 y 34.
- Párrafo A11. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo A10, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además una o más sustituciones, preferiblemente todas, seleccionadas del grupo que consiste en: G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, y opcionalmente una o ambas de N33Y y D34N.
- 30 Párrafo A12. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo A precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además:
- (a) una mutación en la posición 121, preferiblemente 121D, más preferiblemente G121D;
- (b) una mutación en la posición 178, preferiblemente 178F, más preferiblemente L178F;
- (c) una mutación en la posición 179, preferiblemente 179T, más preferiblemente A179T; y/o
- (d) una mutación en la posición 87, preferiblemente 87S, más preferiblemente G87S.
- 35 Párrafo B1. Un polipéptido variante PS4 que se puede obtener a partir de un polipéptido parental que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, en el que el polipéptido variante PS4 comprende una mutación de aminoácidos en la posición 161 con referencia a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophilla* mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 40 Párrafo B2. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo B1, en el que la mutación en la posición 161 comprende una sustitución 161A, preferiblemente S161A.
- Párrafo B3. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo B1 o B2, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además una o más mutaciones adicionales en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 121 y 223.
- Párrafo B4. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo B3, en el que la una o más mutaciones adicionales se selecciona del grupo que consiste en: 121F, 121Y, 121W, 223E y 223K, más preferiblemente G121F, G121Y, G121W, G223E y/o G223K.
- 45 Párrafo B5. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo B precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 121, 161; 161, 223.

Párrafo B6. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo B5, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 121F/Y/W, 161A; 161A, 223E/K.

Párrafo B7. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo B precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 121, 161 y 223.

- 5 Párrafo B8. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo B precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones 121F/Y/W, 161A, 223E/K.

Párrafo B9. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo B precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además una o más mutaciones, preferiblemente todas, seleccionadas del grupo que consiste en posiciones: 134, 141, 157, 223, 307, 334.

- 10 Párrafo B10. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo B precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además mutaciones en cualquiera o ambas de las posiciones 33 y 34.

Párrafo B11. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo B10, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además una o más sustituciones, preferiblemente todas, seleccionadas del grupo que consiste en: G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, y opcionalmente una o ambas de N33Y y D34N.

- 15 Párrafo B12. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo B precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además:

(a) una mutación en la posición 121, preferiblemente 121D, más preferiblemente G121D;

(b) una mutación en la posición 178, preferiblemente 178F, más preferiblemente L178F;

(c) una mutación en la posición 179, preferiblemente 179T, más preferiblemente A179T; y/o

- 20 (d) una mutación en la posición 87, preferiblemente 87S, más preferiblemente G87S.

Párrafo C1. Un polipéptido variante PS4 que se puede obtener a partir de un polipéptido parental que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, en el que el polipéptido variante PS4 comprende una mutación de aminoácidos en la posición 223 con referencia a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO: 1.

- 25 Párrafo C2. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo C1, en el que la mutación en la posición 223 comprende una sustitución 223E y/o 223K, preferiblemente G223E y/o G223K.

Párrafo C3. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo C1 o C2, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además una o más mutaciones adicionales en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 121 y 161.

- 30 Párrafo C4. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo C3, en el que la una o más mutaciones adicionales se selecciona del grupo que consiste en: 121F, 121Y, 121W y 161A, más preferiblemente G121F, G121Y, G121W y/o S161A.

Párrafo C5. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo C precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 121, 223; 161, 223.

- 35 Párrafo C6. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo C5, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 121F/Y/W, 223E/K; 161A, 223E/K.

Párrafo C7. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo C precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones en las posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 121, 161 y 223.

Párrafo C8. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo C precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende mutaciones 121F/Y/W, 161A, 223E/K.

- 40 Párrafo C9. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo C precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además una o más mutaciones, preferiblemente todas, seleccionadas del grupo que consiste en posiciones: 134, 141, 157, 223, 307, 334.

Párrafo C10. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo C precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además mutaciones en cualquiera o ambas de las posiciones 33 y 34.

- 45 Párrafo C11. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo C10, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además una o más sustituciones, preferiblemente todas, seleccionadas del grupo que consiste en: G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, y opcionalmente una o ambas de N33Y y D34N.

Párrafo C12. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo C precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además:

- (a) una mutación en la posición 121, preferiblemente 121D, más preferiblemente G121D;
- (b) una mutación en la posición 178, preferiblemente 178F, más preferiblemente L178F;
- 5 (c) una mutación en la posición 179, preferiblemente 179T, más preferiblemente A179T; y/o
- (d) una mutación en la posición 87, preferiblemente 87S, más preferiblemente G87S.

Párrafo D1. Un polipéptido variante PS4 que se puede obtener a partir de un polipéptido parental que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, en el que el polipéptido variante PS4 comprende una mutación de aminoácidos en una o más posiciones seleccionadas del grupo que consiste en: 146, 157, 158, 198, 229, 303, 306, 309, 316 y 353, con referencia a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophilla* mostrada como SEQ ID NO: 1.

Párrafo D2. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo D1, en el que el polipéptido variante PS4 comprende una mutación de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: 146G, 146M, 157M, 158T, 158A, 158S, 198W, 198F, 229P, 303E, 303D, 306T, 306G, 309P, 316S, 316P, 316K, 316Q y 353T.

15 Párrafo D3. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo D1, en el que el polipéptido variante PS4 comprende una mutación de aminoácidos 146G, 157M, 158T, 198W, 229P, 303E, 303D, 306T, 306G, 309P, 316S, 316P ó 353T.

Párrafo D 4. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo D1, en el que el polipéptido variante PS4 comprende además una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en posiciones: 33, 34, 121, 134, 141, 157, 161, 178, 179, 223, 307 y 334, preferiblemente seleccionada del grupo que consiste en: 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P.

Párrafo D5. Un polipéptido variante PS4 según el Párrafo D1, en el que el polipéptido variante PS4 comprende cada una de las mutaciones siguientes:

(a) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 15;

25 (b) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157M, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 16;

(c) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 158T, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 17;

30 (d) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 198W, 223E, 307L y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 18;

(e) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307L y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 19;

(f) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 198W, 223E, 229P, 307L y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 20;

35 (g) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 303E, 307L y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 21;

(h) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 303D, 307L y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 22;

40 (i) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 306T, 307L y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 23;

(j) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 306G, 307L y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 24;

(k) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 309P, 307L y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 25;

45 (l) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 316S, y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 26;

(m) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 316P y 334P, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 27; y,

(n) 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 334P y 353T, preferiblemente que tiene una secuencia SEQ ID NO: 28.

Párrafo 13. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo precedente, en el que el polipéptido parental comprende una exoamilasa no maltogénica, preferiblemente una glucan 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60).

- 5 Párrafo 14. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo precedente, en el que el polipéptido parental se obtiene o se puede obtener de especies de *Pseudomonas*, preferiblemente *Pseudomonas saccharophila* o *Pseudomonas stutzeri*.

- 10 Párrafo 15. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo precedente, en el que el polipéptido parental es una exoamilasa no maltogénica de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 5.

Párrafo 16. Un polipéptido variante PS4 según cualquiera de los Párrafos A1 a A12, B1 a B12, C1 a C12, D1 a D5, 13 y 14, en el que el polipéptido parental es una exoamilasa no maltogénica de *Pseudomonas stutzeri* que tiene una secuencia mostrada como SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO: 11.

- 15 Párrafo 17. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo precedente, que comprende una secuencia como se muestra en la descripción, Párrafos o figuras.

Párrafo 18. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo precedente, en el que el polipéptido variante PS4 tiene una mayor termoestabilidad comparado con el polipéptido parental o un polipéptido de tipo salvaje cuando se ensaya en las mismas condiciones.

- 20 Párrafo 19. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo precedente, en el que la vida media ($t_{1/2}$), preferiblemente a 60 grados C, se incrementa un 15% o más, preferiblemente 50% o más, lo más preferiblemente 100% o más, respecto al polipéptido parental o el polipéptido de tipo salvaje.

Párrafo 20. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo precedente, en el que el polipéptido variante PS4 tiene una mayor exo-especificidad comparado con el polipéptido parental o un polipéptido de tipo salvaje cuando se ensaya en las mismas condiciones.

- 25 Párrafo 21. Un polipéptido variante PS4 según cualquier Párrafo precedente, en el que el polipéptido variante PS4 tiene 10% o más, preferiblemente 20% o más, preferiblemente 50% o más, exo-especificidad comparado con el polipéptido parental o el polipéptido de tipo salvaje.

Párrafo 22. Uso de un polipéptido variante PS4 como se muestra en cualquier Párrafo precedente como un aditivo alimenticio.

- 30 Párrafo 23. Un proceso para tratar un almidón que comprende poner en contacto el almidón con un polipéptido variante PS4 como se muestra en cualquiera de los Párrafos A1 a A12, B1 a B12, C1 a C12, D1 a D5 y 13 a 21 y permitir que el polipéptido genere a partir del almidón uno o más productos lineales.

Párrafo 24. Uso de un polipéptido variante PS4 como se muestra en cualquiera de los Párrafos A1 a A12, B1 a B12, C1 a C12, D1 a D5 y 13 a 21 en la preparación de un producto alimenticio.

- 35 Párrafo 25. Un proceso para preparar un producto alimenticio que comprende mezclar un polipéptido como se muestra en cualquiera de los Párrafos A1 a A12, B1 a B12, C1 a C12, D1 a D5 y 13 a 21 con un ingrediente alimenticio.

Párrafo 26. Uso según el Párrafo 24, o un proceso según el Párrafo 25, en el que el producto alimenticio comprende una masa o un producto de masa, preferiblemente un producto de masa procesado.

- 40 Párrafo 27. Un uso o proceso según cualquiera de los Párrafos 24 a 26, en el que el producto alimenticio es un producto de panadería.

- 45 Párrafo 28. Un proceso para preparar un producto de panadería que comprende: (a) proporcionar un medio de almidón; (b) añadir al medio de almidón un polipéptido variante PS4 como se muestra en cualquiera de los Párrafos A1 a A12, B1 a B12, C1 a C12, D1 a D5 y 13 a 21; y (c) aplicar calor al medio de almidón durante o después de la etapa (b) para producir un producto de panadería.

Párrafo 29. Un producto alimenticio, producto de masa o un producto de panadería obtenido por un proceso según cualquiera de los Párrafos 24 a 28.

- 50 Párrafo 30. Una composición mejoradora para una masa, en la que la composición mejoradora comprende un polipéptido variante PS4 como se muestra en cualquiera de los Párrafos A1 a A12, B1 a B12, C1 a C12, D1 a D5 y 13 a 21, y al menos un ingrediente de la masa o aditivo de la masa adicional.

Párrafo 31. Una composición que comprende una harina y un polipéptido variante PS4 como se muestra en cualquiera de los Párrafos 1 a 21.

Párrafo 32. Uso de un polipéptido variante PS4 como se muestra en cualquiera de los Párrafos A1 a A12, B1 a B12, C1 a C12, D1 a D5 y 13 a 21, en un producto de masa para retardar o reducir el endurecimiento, preferiblemente retrogradación perjudicial, del producto de masa.

Párrafo 33. Una combinación de un polipéptido variante PS4 como se muestra en cualquier Párrafo precedente, junto con Novamyl, o una variante, homólogo, o mutantes de éste que tiene actividad alfa-amilasa maltogénica.

Párrafo 34. Uso de una combinación según el Párrafo 33 para una aplicación según cualquier Párrafo precedente.

Párrafo 35. Un producto alimenticio producido por tratamiento con una combinación según el Párrafo 34.

Párrafo 36. Un aditivo alimenticio que comprende un polipéptido variante PS4 según cualquiera de los Párrafos A1 a A12, B1 a B12, C1 a C12, D1 a D5 y 13 a 21.

Referencias

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 Edn. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor NY.

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

Varias modificaciones y variaciones de los métodos y sistema de la invención descritos serán evidentes para los expertos en la técnica. Aunque la invención se ha descrito en conexión con realizaciones específicas preferidas, debe entenderse que la invención según se reivindica no debe estar limitada excesivamente a dichas realizaciones específicas. De hecho, se pretende que varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención, que son obvias para los expertos en biología molecular o campos relacionados, estén en el alcance de las reivindicaciones.

Listado de Secuencias

SEQ ID NO: 1

Secuencia de referencia de PS4, derivada de la secuencia de aminoácidos de maltotetrahydrolasa de *Pseudomonas saccharophila*.

```

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APNDWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWTDGG KSGGEGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPHMNR
121 GYPDKKEINLP AGQGFWRNDC ADPGNYPNDC DDGDRFTGGE SDLNTGHPQI YGMFRDELAN
181 LRSYGAGGF RFDFVRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKGPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRK CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHAWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWSHMYDWG YGDFIRQLIQ VVRTAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVAG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
421 GDGGGNDGGE GGLVNVNFR C DNGVTQM GDS VYAVGNVSQL GNWSPASAVR LTDTSYPTW
481 KGSIALPDGQ NVEWKCLIRN EADATLVRQW QSGGNNQVQA AAGASTSGSF
    
```

SEQ ID NO: 2

Secuencia de PSac-D34; secuencia de aminoácidos de maltotetrahydrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 11 sustituciones y delección del dominio de unión a almidón.

```

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYMWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWTDGP KSGGEGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPHMNR
121 DYPDKKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGE SDLNTGHPQI YGMFRDEFTN
181 LRSYGAGGF RFDFVRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRK CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHAWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWFHMYDWG YGDFIRQLIQ VVRTAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVAG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
421 GDGGGNDGG
    
```

SEQ ID NO: 3

Secuencia de PSac-D20; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 13 sustituciones y deleción del dominio de unión a almidón.

```

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYMWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWTDPG RSGGEGEYFW HDFNKNSRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 DYDPKEINLP AGQRFWRNDC FDPGNYPNDC DDGDRFLGGE SDLNTGHPQI YGMFRDEFIN
181 LRSGYGAGGF RFDVFRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSRAK CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPHMYDWG YGEFIRQLIQ VRRTAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
421 GDGGGNDGG
    
```

5 SEQ ID NO: 4

Secuencia de PSac-D14; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 14 sustituciones y deleción del dominio de unión a almidón.

```

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYMWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWTDPG RSGGEGEYFW HDFNKNSRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
121 DYDPKEINLP AGQRFWRNDC FDPGNYPNDC DDGDRFLGGE SDLNTGHPQI YGMFRDEFIN
181 LRSGYGAGGF RFDVFRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPSW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSRAK CPVDFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDW RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSFGTPV VYWPHMYDWG YGEFIRQLIQ VRRTAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSGS
421 GDGGGNDGG
    
```

10 SEQ ID NO: 5

Precursor de Glucan 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* (EC 3.2.1.60) (amilasa G4) (amilasa formadora de maltotetraosa) (Exo-maltotetrahidrolasa) (exo-amilasa formadora de maltotetraosa). Número de acceso SWISS-PROT P22963.

```

MSHILRAAVL AAVLLPFPAL ADQAGKSPAG VRYHGGDEII LQGFHWNVVR EAPNDWYNIL
RQQASTIAAD GFSAIWMPVP WRDFSSWTDG GKSQGGEGYF WHDFNKNGRY GSDAQLRQAA
GALGGAGVKV LYDVVPNHMN RGYDPKEINL PAGQGFWRND CADPGNYPND CDDGDRFIGG
ESDLNTGHPQ IYGMFRDELA NLRSGYGAGG FRFDVFRGYA PERVDSWMSD SADSSFCVGE
LWKGPSEYPS WDWRNTASWQ QIIKDWSRA KCPVDFDFALK ERMQNGSVAD WKHGLNGNPD
PRWREVAVTF VDNHDTGYSP GQNGGQHHWA LQDGLIRQAY AYILTSFGTP VVYWSHMYDW
GYGDFIRQLI QVRRTAGVRA DSAISFHSGY SGLVATVSGS QQTLVVALNS DLANPGQVAS
GSFSEAVNAS NGQVRVWRSG SGDGGGNDGG EGGLVNVNFR CDNGVTQMGD SVYAVGNVVSQ
LGNWSPASAV RLTDTSYPT WKGSIALPDG QNVEWKCLIR NEADATLVRO WQSGGNNQVQ
AAAGASTSGS F
    
```

ES 2 658 856 T3

SEQ ID NO: 6

Gen mta de *P. saccharophila* que codifica maltotetraohidrolasa (número EC = 3.2.1.60). Número de acceso GenBank X16732.

```

gatcggcgta ggtttcgc atcggtgcca ggcgatattt cgcgggtgcg ccagcagcct
ggaagcaggc ctggtcgccc ccgcccggcc tggcggccgac gcccaagcgc agatagccgt
ggaaatcgac cgcacaggcc gggccgcccga ccagcagggc ggcaagcagg caggcggggtt
ttaggacgaa caggggggtgc gcgggtgtgct tcatgacgag gtccttgttt ttcttgtaa
tgccgaatcg atcaagcctt cgctgogtgt cgcaggggcgc agctcgggtg cgaagcctc
cggatggcct ccgctggcgg catcctcccg accagagatt tcgctggcgc agctcagggg
cgtaatcagg atgagtgccg cgtaatccct ggggtggggc tacgcccggc agggcgaga
tgattgccag gggccttcgg cctggccact acgcccctg caactggggc ggggaggtt
gtggtcgggg cgtgcagggg cagcctgcgg gtgcccgtcg aagaccggc cggcgttcat
cctcgtccgg cygccttgcc gtaggatacc cgaacaagca caagaaccgg agtattgca
tgagccacat cctgcgtgcc gccgtattgg cggcggctct gctgccgttt ccgcactgg
ccgatcaggc cggcaagagc ccggcccggg tgcgctacca cggcggcgac gaaatcatcc
tccagggcct cactgggaaac gtgcgcccgc aagcggccaa cgactgggtac aacatcctcc
gccaaacagg ctcgacgac cggccgacg gcttctcggc aatctggatg aggggtgctt
ggcgtgactt ctccagctgg accgacggcg gcaagtccgg cggcggcgaa ggctacttct
ggcacgactt caacaagaac ggcgctacg gcagcgacgc ccagctgcgc caggccggcc
gcgcaactcg tggcgcgggg gtaaggtgc tctacgatgt ggtgcccaat cacatgaacc
gcgccactcc ggacaaggag atcaacctgc cggcccggca gggcttctgg cgcaacgact
agcgcgaccc gggcaactac cccaacgact gcgacgacgg tgaccgcttc atcggcggcg
agtcggaacg gaacaccggc catccgcaga ttacggcat gttcgcgac gacttgcca
acctgcgcag cggctacggc gcggcggtc tccgcttcca cttcgctcgc ggtatgctc
ccgagcgggt cgacagctgg atgagcgaca gcgcccagc cagcttctgc gttggcgagc
tgtgaaagg cccttctgaa tatccgagct gggactggcg caacacggcg agctggcagc
agatcatcaa ggactgggtc gaccggggcca agtgcccggg gttcgcacttc gctctcaagg
agcgcgatga gaacggctcg gtcgcccact ggaagcatgg cctcaatggc aaccocgacc
cgcgctggcg cgaggtggcg gtgaccttcg tcgacaacca cgacaccggc tattcggccc
gacagaacgg cggccagcac cactggggcgc tcgaggacgg gctgatccgc caggctcag
ctggcaactg gagcccggcc tccgcggtac ggctgaccga caccagcagc tatccgacct
gctacggcga ctctatccgc cagctgatcc aggtgcccgc caccgcccgc gtcgcccgc
attcggcgat cagcttccat agcggctaca gcggtctggt cgctaccgtc agcggcagcc
agcagaccct ggtggtggcg ctcaactccg atctggccaa ccccggccag gttgccagcg
gcagcttcag cgagggcggtc aacgccagca acggccaggt gcgctctgg ccgagcggta
gcccgcgatg cggcgggaaat gacggcggcg aggggtggctt ggtcaatgtg aactttcgt
tcgacaacgg cgtgacgcag atggcgaca gcgtctacgc ggtgggcaac gtcagccagc
cggcaactg gagcccggcc tccgcggtac ggctgaccga caccagcagc tatccgacct
ggaagggcag catcgccctg cctgacggtc agaactgga atggaagtgc ctgatccgca
acgagggcga cgcgacgctg gtgcgtcagt ggcaatcggg cggcaacaac caggtccagg
ccgcccggcg cgcgagcacc agcggctcgt tctgacgaca tgcccggccg gctcgggta
cgctacgcc gggcggctcc tcccgaacca ggggtggcgag ggaggaggcc ggcgacgggc
ggggccggcg atgctggcac gacaaccata aaagccttcg cgtgcgctg tcgatatcagg
agctgttcat gttggcccag accogctcga ccccttccg gcttggcttc ctggcccggc
tgtacctgct gatcgccgca ctgggtggct tgctgatgct ggtagccggc accagcctgg
ttgccatcgg ccgctgcaa ggcaatgccc agcaaatctc gtcgaccggc tcgctctgc
tggtcagcga gagcttcttc ggtacgttgc agagcctgac gcagaacctg tccgacgccc
tgcccgagga ccggcctgac cagctcgacg gctatgtcgg ccggcatcgc acgctgcagg
accagggcct cgagctgttc gccagctgg agcgggtgac gccggacat gccgagacca
agcaagcctg gcggcgctgt tgccggagct cgaccgcccg agcctggcgc tgatcgatgc
gcacgcgacc tgctcgcgcg tggggcgcaa cgcgctcgc tcgocgatct gcagctgcag
ttctcgcggc tcaagcagga cctgctgcag gcgcagttcg tgacggggca cgagctggct
gcctattcca tcaagcagtt catcatcccg ctcgagcagg tcgagcggct ctgctcgatg
ccatcggcgt gtcttcgac aaggcactcg atgaagcggg tgccagatc

```

SEQ ID NO:7

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

```

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APNDWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDGS KSGGEGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPMHMNR
121 GYPDKKEINLP AGQGFWRNDC ADPGNYPNDC DDGDRFLGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFNTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVIRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVGEL WKGPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVDFDFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHHWAL QDGLIRQAYA YILTSPTGTPV VYWSHMYDWG YGDFIRQLIQ VVRAAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSQT
421 GSGGGEFGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL

```

5 SEQ ID NO: 8

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

```

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYMWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDPS KSGGEGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPMHMNR
121 DYPDKKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFNTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVIRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVGEL WKAPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVDFDFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPTGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ VVRAAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSQT
421 GSGGGEFGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL

```

SEQ ID NO: 9

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

```

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYMWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDPS RSGGEGEYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPMHMNR
121 DYPDKKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFNTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVIRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVGEL WKAPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVDFDFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPTGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ VVRAAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSQT
421 GSGGGEFGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL

```

SEQ ID NO: 10

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

```

1 DQAGKSPNAV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYMWYNILR QQAATIAADG FSAIWMPVPW
61 RDFSSWSDPS RSGGEGEYFW HDFNKNSRYG SDAQLRQAAS ALGGAGVKVL YDVVPMHMNR
121 DYPDKKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNYPNDC DDGDRFLGGD ADLNTGHPQV YGMFRDEFNTN
181 LRSQYGAGGF RFDFVIRGYAP ERVNSWMTDS ADNSFCVGEL WKAPSEYPNW DWRNTASWQQ
241 IIKDWSDRAK CPVDFDFALKE RMQNGSIADW KHGLNGNPD P RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPTGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ VVRAAGVRAD
361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LGNPGQVASG SFSEAVNASN GQVRVWRSQT
421 GSGGGEFGAL VSVSFRCDNG ATQMGDSVYA VGNVSQLGNW SPAAALRLTD TSGYPTWKGS
481 IALPAGQNEE WKCLIRNEAN ATQVRQWQGG ANNSLTPSEG ATTVGRL

```

SEQ ID NO: 11

Precursor de Glucan 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas stutzeri* (*Pseudomonas perfectomarina*). (EC 3.2.1.60) (amilasa G4) (amilasa formadora de maltotetraosa) (Exo-maltotetrahidrolasa) (exo-amilasa formadora de maltotetraosa). Número de acceso SWISS-PROT P13507.

```
MSHILRAAVL AAMLLPLPSM ADQAGKSPNA VRYHGGDEII LQGFHWNVVR EAPNDWYNIL
RQQAATIAAD GFSAIWMPVF WRDFSWSWDG SKSGGGEGYF WHDFNKNGRY GSDAQLRQAA
SALGCAGVKV LYDVVPNHMN RGYPDKEINL PAGQGFWRND CADPGNYPND CDDGDRFIGG
DADLNTGHPQ VYGMFRDEFT NLRSQYGAGG FRFDFVRYA PERVNSWMTD SADNSFCVGE
LWKGPSEYPN WDRNNTASWQ QIIKDWSRA KCPVFDFAK ERMQNGSIAD WKHGLNGNPD
PKWREVAVTF VDNHDTGYSP GQNGGQHHWA LQDGLIRQAY AYILTPSPGTP VVYWSHMYDW
GYGDFIRQLI QVRAAGVRA DSAISFHSY SGLVATVSGS QQTLVVALNS DLGNPGQVAS
GSFSEAVNAS NGQVRVWRSR TSGGGGEPGA LVSVSFRCDN GATQMGSVY AVGNVSQLGN
WSPAAALRLT DTSGYPTWKG SIALPAGQNE EWKCLIRNEA NATQVRQWQG GANNSLTPSE
GATTVGRLL
```

5

SEQ ID NO: 12

Gen de amilasa formadora de maltotetraosa de *P.stutzeri* (amyP), cds completa. Número de acceso GenBank M24516.

```
1 gatcgccctt tacgaaagt gatagagctt ctctccggc aaactttggt cccagtgac
61 agagggtag tatcggatcg ctctctctt gggtttgta gatcaggagc gccgagagca
121 ggatgaaatc ctgcccagc aaggtccgca cgaagatgtg gaactgctgc tggccgagat
181 ccggccggcg ttcacccctg tccggccggc ttgcccagc ctaccggaac aagcacaaga
241 accggagtat tgcgatgagc cacatcctgc gagccggcgt attggcggcg atgctgttgc
301 ogttgcgctc catggccgat caggccggca agagcccaa cgctgtgocg taccacggcg
361 gcgacgaaat cattctccag ggctttcact ggaacgtcgt ccgcaagcgc cccaacgact
421 ggtacaacat cctgcccagc caggccggca ccacgcccgc cgaaggcttc tccgggatct
481 ggatgcccgt gccctggcgc gacttctcca gctggagcga cggcagcaag tccggccggc
541 gtgaaggcta ctctggcac gacttcaaca agaacggcgc ctatggcagt gacgcccagc
601 tgcgtcagge cgcagcgcg ctccggtggcg ccggcgtgaa agtgctttac gacgtggtgc
661 ccaaccacat gaaccgtggc tatccggaca aggagatcaa cctcccggcc gggcagggct
721 tctggcgaac cgactgccc gaccgggca actacccaa tgattgcaac gacggcgacc
781 gcttcatcgg cggcgatgcg gacctcaaca ccggccacc gcaggcttac ggcatttcc
841 gcgatgaatt caccaacctg cgcagtcagt acgggtcccg cggcttccg ttcgactttg
901 ttcggggcta tgcgcccggg cgggtcaaca gctggatgac cgatagcgc gacaacagct
961 tctgctcggc cgaactgtgg aaaggccct ctgagtacc gaactgggac tggcgaaca
1021 ccgccagctg gcagcagatc atcaaggact ggtccgacc ggccaagtgc ccggtgttcg
1081 acttcgccc caaggaacgc atgcagaacg ctccgatccc gactggaagc acgctgaac
1141 ggcaatccc acccgcgtgg cgcgaggtgg cgggtgacct cgtcgacaac cacgacaccg
1201 gctactcgcc cgggcagaac ggtgggcagc accactgggc tctgcaggac gggctgatcc
1261 gccaggccta cgcctacatc ctaccagccc ccggtacgccc ggtgggtgac tggtcgaca
1321 tgtacgactg gggttacggc gacttcatcc gtcagctgat ccagggtcgt cgcgcccgcg
1381 gcgtgcgccc cgattcggcg atcagcttcc acagcggcta cagcggctc gtcgcccgcg
1441 tcagcggcag ccagcagacc ctgggtgggtg cgtcgaactc cgacctgggc aatcccggcc
1501 aggtggccag cggcagcttc agcagggcgg tcaacgccag caacggccag gtcgcccgtg
1561 ggcgtagcgg cacgggcagc ggtggcgggtg aaccggcgcg tctggctcagt gtgagttcc
1621 gctgcgacaa cggcgcgacg cagatgggcg acagcgtcta cgcggctcgc aacgtcagcc
1681 agctcggtaa ctggagcccg gccgcccgtg tgcgctgac cgacaccag gctaccga
1741 cctggaaggg cagcattgcc ttgcctgccc gccagaacga ggaatgaaa tgcctgatcc
1801 gcaacgaggg caacgccacc caggtcgggc aatggcaggg cggggcaaac aacagcctga
1861 cgcagagcga gggcgcacc accgtcggcc ggctctagcc cgggcccga ctcggccgctc
1921 tcgcccaggt gaggcggctg gtctcggcgg cggtatcgtt gcgctggggg cgggcccgcg
1981 gttcacgccc cctgctatcg ctagtcttcg gcgctccgcg catcggccag ttgccagcga
2041 atcgccctgc ctccggcctg gtcaggtcgc tcgagcagcg ct
```

10

SEQ ID NO: 13

Secuencia de pMD55; secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* con 11 sustituciones (G134R, A141P, I157L, G223A, H307L, S334P, N33Y, D34N, L178F, A179T y G121F) y delección del dominio de unión a almidón.

1 DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVRE APYVWYNILR QQASTIAADG FSAIWMPVVPW
 61 RDFSSWTDPG KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR
 121 FYPDKEINLP AGQRFWRNDC FDPGNYPNDC DDGDRFLGGE SDLNTGHPQI YGMFRDEF~~FTN~~
 181 LRSGYGAGGF RFDVFRGYAP ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPSW DWRNTASWQQ
 241 IIKDWSRAK CPVDFDFAKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDPRWREVAVTFV DNHDTGYSPG
 301 QNGGQHLWAL QDGLIRQAYA YILTSPGTFV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ VRRTAGVRAD
 361 SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVAG SFSEAVNASN GQVRVWRSQS
 5 421 GDGGGNDGG

SEQ ID NO: 14

Secuencia de PMD96: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, H307L y S334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVVPWRDFSSW
 TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFPYDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEF~~FTN~~NLRSGYGAGGFRFDFVFRGY
 APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSRAKCPVDFDFAKERMQN
 GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTFV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
 10 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSQSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 15

Secuencia de SSM 381: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVVPWRDFSSW
 TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFPYDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEF~~FTN~~NLRSGYGAGGFRFDFVFRGY
 APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSRAKCPVDFDFAKERMQN
 GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTFV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
 15 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSQSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 16

Secuencia de SSM279 B1: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157M, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVVPWRDFSSW
 TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFPYDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEF~~FTN~~NLRSGYGAGGFRFDFVFRGY
 APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSRAKCPVDFDFAKERMQN
 GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTFV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
 20 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSQSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 17

Secuencia de SSM237 P2: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 158T, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVVPWRDFSSW
 TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFPYDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEF~~FTN~~NLRSGYGAGGFRFDFVFRGY
 APERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSRAKCPVDFDFAKERMQN
 GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTFV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
 20 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSQSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 18

Secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 198W, 223E, 307L y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNI LRQQASTIAADGFS AIWMPVPWRDFSSW
 TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNRGYGS DAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFY PDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRG
 APERVDSWMSDSADSSFCV GELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFDFALKERMQN
 GSVADWKHGLNNGNPDPRWREVA VTFVDNHD TGYS PGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAI SFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVVALNSDLANPGQ
 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

5 SEQ ID NO: 19

Secuencia de SSM325 F3: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 229P, 307L y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNI LRQQASTIAADGFS AIWMPVPWRDFSSW
 TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNRGYGS DAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFY PDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRG
 APERVDSWMSDSADSSFCV GELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFDFALKERMQN
 GSVADWKHGLNNGNPDPRWREVA VTFVDNHD TGYS PGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAI SFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVVALNSDLANPGQ
 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 20

10 Secuencia de pMD129: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 198W, 223E, 229P, 307L y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNI LRQQASTIAADGFS AIWMPVPWRDFSSW
 TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNRGYGS DAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFY PDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRG
 APERVDSWMSDSADSSFCV GELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFDFALKERMQN
 GSVADWKHGLNNGNPDPRWREVA VTFVDNHD TGYS PGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAI SFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVVALNSDLANPGQ
 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 21

15 Secuencia de SSM341 A9: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 303E, 307L y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNI LRQQASTIAADGFS AIWMPVPWRDFSSW
 TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNRGYGS DAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFY PDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRG
 APERVDSWMSDSADSSFCV GELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFDFALKERMQN
 GSVADWKHGLNNGNPDPRWREVA VTFVDNHD TGYS PGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAI SFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVVALNSDLANPGQ
 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 22

20 Secuencia de SSM341 G11: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 303D, 307L y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNI LRQQASTIAADGFS AIWMPVPWRDFSSW
 TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNRGYGS DAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFY PDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRG
 APERVDSWMSDSADSSFCV GELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFDFALKERMQN
 GSVADWKHGLNNGNPDPRWREVA VTFVDNHD TGYS PGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAI SFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVVALNSDLANPGQ
 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 23

Secuencia de SSM350 B11: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 306T, 307L y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNI LRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
 TDGGKSGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVV PNHMNRFPDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRDFVIRGY
 APERVDSWMSDSADSSFCV GELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFALKERMQN
 GSVADWKHGLNNGNPDPRWREVAVTFVDNHD TGYS PGQNGGQTLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

5 SEQ ID NO: 24

Secuencia de SSM350 C12: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 306G, 307L y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNI LRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
 TDGGKSGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVV PNHMNRFPDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRDFVIRGY
 APERVDSWMSDSADSSFCV GELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFALKERMQN
 GSVADWKHGLNNGNPDPRWREVAVTFVDNHD TGYS PGQNGGQGLWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 25

10 Secuencia de SSM332 Q4: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 309P, 307L y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNI LRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
 TDGGKSGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVV PNHMNRFPDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRDFVIRGY
 APERVDSWMSDSADSSFCV GELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFALKERMQN
 GSVADWKHGLNNGNPDPRWREVAVTFVDNHD TGYS PGQNGGQHLWELQDGLIRQAYAYILTSPGTPV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 26

15 Secuencia de SSM365 B4: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones de aminoácidos en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 316S, y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNI LRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
 TDGGKSGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVV PNHMNRFPDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRDFVIRGY
 APERVDSWMSDSADSSFCV GELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFALKERMQN
 GSVADWKHGLNNGNPDPRWREVAVTFVDNHD TGYS PGQNGGQHLWALQDGLI SQAYAYILTSPGTPV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 27

20 SSM365 F4: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 316P y 334P.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNI LRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
 TDGGKSGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVV PNHMNRFPDKEINLPAG
 QRFWRNDCPDPGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRDFVIRGY
 APERVDSWMSDSADSSFCV GELWKEPSEYPSWDWRNTASWQQI IKDWSDRAKCPVDFALKERMQN
 GSVADWKHGLNNGNPDPRWREVAVTFVDNHD TGYS PGQNGGQHLWALQDGLI PQAYAYILTSPGTPV
 VYWPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
 VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 28

SSM360 C7: secuencia de aminoácidos de maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila* que tiene mutaciones en 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L, 334P y 353T.

DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSW
TDGGKSGGGEGYFWHDFNKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPHMNRFYPDKEINLPAG
QRFWRNDCPDGNYPNDCDDGDRFLGGEADLNTGHPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGY
APERVDSWMSADSADSSFCVGELEWKEPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRAKCPVDFALKERMQN
GSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHD'GYSPGQNGGQHLWALQDGLIRQAYAYILTSPGFPV
VYWPHMYDWGYCDFIRQLIQVRTTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQ
VASGSFSEAVNASNGQVRVWRSGSGDGGGNDGG

5

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido variante PS4 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95% idéntica con la SEQ ID N°: 15 que tiene actividad de exoamilasa no maltogénica, donde dicho polipéptido variante PS4 tiene una mutación de aminoácido Y146G con referencia a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophila* mostrada como SEQ ID NO: 1, y en la que dicho polipéptido tiene una termoestabilidad más alta comparada con el polipéptido de la SEQ ID NO: 1 cuando se ensaya en las mismas condiciones.
- 10 2. Un polipéptido variante PS4 según la reivindicación 1, en el que el polipéptido variante PS4 comprende una o más mutaciones seleccionadas del grupo que consiste en las posiciones: 33, 34, 121, 134, 141, 157, 161, 178, 179, 223, 307 y 334, preferiblemente seleccionadas del grupo que consiste en: 33Y, 34N, 121F, 134R, 141P, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E, 307L y 334P.
3. Un polipéptido variante PS4 según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el polipéptido variante PS4 comprende cada una de las siguientes mutaciones:
33Y, 34N, 121F 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E 307L y 334P.
- 15 4. Un polipéptido variante PS4 de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que el polipéptido variante PS4 comprende cada una de las siguientes mutaciones:
N33Y, D34N, G121F, G134R, A141P, I157L, S161A, L178F, A179T, G223E, H307L, S334P.
5. Uso de un polipéptido variante PS4 como se establece en cualquier reivindicación precedente como un aditivo de alimentario o de pienso o para preparar un producto alimenticio o de pienso.
- 20 6. Un proceso para tratar un almidón que comprende poner en contacto el almidón con un polipéptido como se muestra en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y permitir que el polipéptido genere a partir del almidón uno o más productos lineales.
7. Un proceso para preparar un producto alimenticio o de pienso que comprende mezclar un polipéptido como se muestra en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 con un ingrediente alimenticio o de pienso.
- 25 8. Uso según la reivindicación 5, o un proceso según la reivindicación 7, en el que el producto alimenticio comprende una masa o un producto de masa, preferiblemente un producto de masa procesado.
9. Un uso o proceso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en el que el producto alimenticio es un producto de panadería.
- 30 10. Un proceso para preparar un producto de panadería que comprende: (a) proporcionar un medio de almidón; (b) añadir al medio de almidón un polipéptido como se muestra en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; y (c) aplicar calor al medio de almidón durante o después de la etapa (b) para producir un producto de panadería.
11. Un producto de masa o un producto de panadería obtenido por un proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el producto de masa o producto de panadería comprende un polipéptido variante PS4 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 35 12. Una composición mejoradora para una masa, en la que la composición mejoradora comprende un polipéptido variante PS4 como se muestra en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, y al menos un ingrediente de masa o aditivo de masa adicional.
13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende una harina y un polipéptido como se muestra en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 40 14. Uso de un polipéptido variante PS4 como se muestra en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en un producto de masa para retardar o reducir el endurecimiento, preferiblemente retrogradación perjudicial, del producto de masa.
15. Una combinación de un polipéptido variante PS4 como se muestra cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, junto con Novamil, o una variante, homólogo, o mutantes de éste que tiene actividad alfa-amilasa maltogénica.
- 45 16. Uso de una combinación de acuerdo con la reivindicación 15 para una aplicación, uso o proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5 a 14.
17. Un producto alimenticio o de pienso obtenido por un proceso de acuerdo con la reivindicación 7 o producido por tratamiento con una combinación de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el producto alimenticio o de pienso comprende un polipéptido variante PS4 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
18. Un ácido nucleico que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

19. Un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 18 que tiene una secuencia de ácido nucleico que es al menos un 75% idéntica a la SEQ ID NO: 6 o la SEQ ID NO: 12.
20. Una secuencia de ácido nucleico según la reivindicación 18 o reivindicación 19, que se obtiene de una secuencia parental que codifica una exoamilasa no maltogénica por sustitución de uno o más residuos de nucleótidos.
- 5 21. Un plásmido que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20.
22. Un vector de expresión que comprende un ácido nucleico según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, o capaz de expresar un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
23. Una célula huésped que comprende, preferiblemente transformada con, un plásmido según la reivindicación 21 o un vector de expresión según la reivindicación 22.
- 10 24. Una célula huésped según la reivindicación 23 que expresa un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
25. Una célula huésped según la reivindicación 23, o una célula según la reivindicación 24, que es una célula bacteriana, fúngica o de levadura.
- 15 26. Un método para expresar un polipéptido variante PS4, comprendiendo el método obtener una célula huésped o una célula según la reivindicación 23, 24 o 25 y expresar el polipéptido a partir de la célula o célula huésped, y opcionalmente purificar el polipéptido.
- 20 27. Un método para producir una variante de polipéptido PS4 según la reivindicación 1, comprendiendo el método introducir una sustitución de aminoácidos en un polipéptido parental que tiene actividad exoamilasa no maltogénica, estando la sustitución de aminoácido en la posición 146 con referencia a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophyllia* mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 25 28. Un método para producir una variante de polipéptido PS4 según la reivindicación 27, comprendiendo el método introducir sustituciones de aminoácidos adicionales en un polipéptido parental que tiene actividad de exoamilasa no maltogénica, seleccionándose las sustituciones de aminoácidos del grupo que consiste en: 33Y, 34N, 121F 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 223E 307L y 334P con referencia a la numeración de posiciones de una secuencia de exoamilasa de *Pseudomonas saccharophyllia* mostrada como SEQ ID NO: 1.
- 30 29. Un método según la reivindicación 27 o 28, en el que la secuencia de un ácido nucleico que codifica el polipéptido parental se altera para introducir la sustitución de aminoácidos.
- 30 30. Un método para aumentar la termoestabilidad de un polipéptido, comprendiendo el método las etapas descritas en cualquiera de las reivindicaciones 27 a 29.
- 30 31. Un método según cualquiera de las reivindicaciones 27 a 30, en el que el polipéptido está aislado o purificado, o ambos.