(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 770 793**

(51) Int. CI.:

C12N 9/28 (2006.01)
C12P 19/14 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.05.2010 E 18153826 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3346004**

(54) Título: **Polipéptidos de amilasa**

(30) Prioridad:

19.05.2009 EP 09160655
19.05.2009 US 179525 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.07.2020

(73) Titular/es:

DUPONT NUTRITION BIOSCIENCES APS (100.0%)
Langebrogade 1
1411 Copenhagen K, DK

(72) Inventor/es:

KRAGH, KARSTEN MATTHIAS;
KELLET-SMITH, ANJA HEMMINGSEN;
MIKKELSEN, RENÉ;
MEJLDAL, RIE y
JENNER, RIKKE L. BUNDGAARD

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

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

DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de amilasa

Campo de la invención

Esta invención se refiere a polipéptidos, específicamente polipéptidos de amilasa y ácidos nucleicos que codifican estos, y sus usos, por ejemplo, como exoamilasas no maltogénicas en producción de alimentos o productos alimenticios para animales.

Antecedentes de la invención

Las amilasas mejoradas pueden mejorar los problemas inherentes en ciertos procesos, tales como en la conversión de almidones vegetales, o para hornear.

La cristalización de la amilopectina tiene lugar en los gránulos de almidón días después del horneado, lo que lleva a un aumento de la firmeza del pan y causa el envejecimiento del pan. Cuando el pan envejece, el pan pierde la suavidad de la miga y la humedad de la miga. Como resultado, las migas se vuelven menos elásticas, y el pan se desarrolla una corteza de cuero.

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

El horneado de artículos de panificación farináceas tales como pan blanco, pan hecho de harina de centeno y harina de trigo tamizados y rodillos se logra mediante el horneado de la masa de pan en las temperaturas del horno en el rango de 180 a 250ºC durante aproximadamente 15 a 60 minutos. Durante el proceso de horneado un gradiente de temperatura pronunciado (200 a 120ºC) prevalece sobre las capas de masa exteriores donde se desarrolla la corteza del producto horneado. Sin embargo, debido al vapor, la temperatura en la miga es solo de aproximadamente 100ºC al final del proceso de horneado. A temperaturas superiores de aproximadamente 85ºC, se puede producir la inactivación de la enzima y la enzima no tendrá propiedades antienvejecimiento. Por los tanto, solo las amilasas termoestables son capaces de modificar el almidón de manera eficiente durante el horneado.

La actividad de endoamilasa actividad 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 de exoamilasa, debido a que lleva a cabo la modificación deseada de almidón que lleva al retraso del envejecimiento, con menos de los efectos negativos asociados con la actividad de endo-amilasa. La reducción de la actividad endoamilasa puede llevar a mayor exoespecificidad, lo que puede reducir las dextrinas ramificadas y producir un pan de mejor calidad.

La conversión de los almidones vegetales, especialmente almidón de maíz, a etanol es una industria en rápida expansión. El jarabe de maltotetraosa (G4 o DP4) es uno de muchos productos comercialmente importantes derivados del tratamiento enzimático del almidón. La conversión de almidones vegetales, especialmente almidón de maíz, a maltotetraosa y azúcares inferiores, tales como glucosa o maltosa, es una industria en rápida expansión.

El proceso actual consiste en dos etapas catalizadas por enzimas secuenciales que dan como resultado la producción de glucosa o maltosa. La levadura se puede utilizar para fermentar la glucosa a etanol.

La primera etapa es catalizada por la enzima es la licuefacción del almidón. Típicamente, una suspensión de almidón se gelatiniza mediante calentamiento rápido a 85ºC o más. •-las amilasas (EC 3.2.1.1) se utilizan para degradar el licuefacto viscoso a maltodextrinas. •-amilasas son endohidrolasas que catalizan la escisión aleatoria de enlaces •-1,4-D-glucosídicos internos. A medida que las •-amilasas descomponen el almidón, la viscosidad disminuye. Debido a que la licuefacción se realiza típicamente a temperaturas elevadas, las •-amilasas termoestables, tales como un •-amilasa de Bacillus sp., son las preferidas para esta etapa.

Las maltodextrinas producidas de esta manera generalmente no pueden ser fermentadas por la levadura para formar alcohol. En consecuencia, se requiere una segunda etapa de sacarificación catalizada enzimáticamente, para descomponer las maltodextrinas. Las glucoamilasas y/o •-amilasas maltogénicas comúnmente se utilizan para catalizar la hidrólisis de extremos no reductores de las maltodextrinas formadas después de licuefacción, la liberación de D-glucosa, maltosa e isomaltosa. Las enzimas desramificantes tales como pululanasas, se pueden usar para ayudar a la sacarificación. La sacarificación generalmente se realiza en condiciones ácidas a temperaturas elevadas, por ejemplo, 60ºC, pH 4,3.

El jarabe G4 (también denominado como DP4) tiene numerosas propiedades ventajosas en comparación con los jarabes de sacarosa. Por ejemplo, el reemplazo parcial de la sacarosa con jarabe G4 en un alimento reduce la dulzura de la comida sin afectar a su sabor o aroma. El jarabe de G4 tiene una alta retención de la humedad en los alimentos y exhibe productos de reacción de Maillard menos perjudiciales debido a contenido menor de glucosa y maltosa. El jarabe G4 también tiene mayor viscosidad que la sacarosa, lo que mejora la textura de los alimentos. El jarabe de G4 disminuye el punto de congelación del agua menos que el jarabe de sacarosa o alta fructosa, por lo que el jarabe G4 puede controlar mejor los puntos de congelación de los alimentos congelados. Después de la ingestión, el jarabe G4 también afecta la presión osmótica menos que la sacarosa. En conjunto, estas cualidades hacen que el jarabe G4 sea ideal como un ingrediente en alimentos y productos médicos. El jarabe de G4 es útil en otras industrias, también. Por ejemplo, el jarabe de G4 imparte brillo y se puede utilizar ventajosamente como un medidor de papel. Ver, por ejemplo, Kimura et al, "Maltotetraose, a new saccharide of tertiary property", Starch 42: 151-57 (1990).

Una de las levaduras usadas para producir el etanol es Saccharomyces cerevisiae. S. cerevisiae contiene •-glucosidasa que se ha demostrado para utilizar mono-, di-, y tri-sacáridos como sustratos. Yoon et al., Carbohydrate Res. 338: 1127-32 (2003). La capacidad de S. cerevisiae para utilizar tri-sacáridos se puede mejorar mediante la administración de suplementos $Mg2^{+}$ y la sobreexpresión de AGT1 permeasa (Stambuck et al, Lett Appl Microbiol 43:370-76 (2006)), sobreexpresión de MTT1 y MTT1alt para aumentar la captación de maltotriosa (Dietvorst et al., Yeast 22: 775-88 (2005)), o la expresión de la MAL32 maltasa en la superficie celular (Dietvorst et al., Yeast 24: 27-38 (2007)). La etapa de sacarificación se puede omitir por completo, si la etapa de licuefacción produjo niveles suficientes de mono-, di-, o tri-sacáridos y se usaron S. cerevisiae o sus variantes modificadas genéticamente para la etapa de fermentación.

Pseudomonas saccharophila expresa una maltotetraohidrolasa formadora de maltotetraosa (CE 3.2.1.60; amilasa formadora de G4; G4-amilasa). Se ha determinado la secuencia de nucleótidos del gen P. saccharophila que codifica PS4. Zhou et al., "Nucleotide sequence of the maltotetraohydrolase gene from Pseudomonas saccharophila", FEBS Lett. 255: 37-41 (1989); GenBank Acc. No. X16732. PS4 se expresa como una proteína precursora con un péptido señal N-terminal de 21 residuos. La forma madura de PS4, como se expone en SEQ ID NO: 10, contiene 530 residuos de aminoácidos con un dominio catalítico en el extremo N-terminal y un dominio de unión a almidón en el extremo C-terminal. PS4 muestra tanto actividad endo y exo-•-amilasa. La actividad de endo-•-amilasa es útil para disminuir la viscosidad del almidón gelatinizado, y la actividad de exo-•-amilasa es útil para descomponer las maltodextrinas en sacáridos más pequeños.

Síntesis de la invención

Esta invención se refiere a polipéptidos, específicamente polipéptidos de amilasa y ácidos nucleicos que los codifican, y sus usos por ejemplo como exoamilasas no maltogénicas en la producción de productos alimenticios. Las amilasas de la presente invención se han manipulado genéticamente para tener cualidades más beneficiosas. En forma específica, las amilasas de la invención actual muestran una exoespecificidad alterada y/o termoestabilidad alterada. En particular, los polipéptidos derivan de los polipéptidos que tienen actividad de exoamilasa no maltogénica, en particular, actividad de glucan 1,4-alfa maltotetrahidrolasa (EC 3.2.1.60). En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente tienen un mejor efecto antienvejecimiento, en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, los polipéptidos definidos en la presente tienen una mejor termoestabilidad en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1.

Se proporciona una variante de polipéptido que se exponen en las reivindicaciones. En particular, la presente invención proporciona un polipéptido que tiene actividad amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 65% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1, y en la que el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 205, con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEC ID NO: 1; en donde el polipéptido tiene una termoestabilidad mejorada en comparación con la amilasa de la SEC ID NO: 1. En un aspecto adicional, se proporciona el uso de tal variante de polipéptido, que se incluye en y como aditivos alimentarios, productos alimenticios, productos de productos de panadería, composiciones mejoradoras, productos alimenticios, que incluyendo alimentos para animales, etc. tal como se establece en las reivindicaciones. En un aspecto adicional, se proporcionan ácidos nucleicos que codifican y que se refieren a variantes de polipéptidos, como se establece en las reivindicaciones. Los métodos para producir tales variantes de polipéptidos, así como otros aspectos, también se estableces en las reivindicaciones.

Leyendas de las figuras

Las figuras acompañantes se incorporan y constituyen una parte de esta memoria descriptiva e ilustran varias formas de realización.

La Fig. 1 muestra el desarrollo de firmeza del pan horneado con pMS1776 (SEQ ID NO: 12), pMS2020 (SEQ ID NO: 14), pMS2022 (SEQ ID NO: 15) y pMS2062 (SEQ ID NO: 16) en comparación con el pan horneado con una composición que comprende la SEQ ID NO: 1.

La Fig. 2 muestra el desarrollo de firmeza del pan horneado con pMS1776 (SEQ ID NO: 12), pMS1934 (SEQ ID NO: 13), pMS2022 (SEQ ID NO: 15) y pMS2062 (SEQ ID NO: 16) en comparación con el pan horneado con una composición que comprende la SEQ ID NO: 1 y Novamil 1500.

Descripción detallada de la invención

De acuerdo con esta descripción detallada, se aplican las siguientes abreviaturas y definiciones. Cabe señalar que, como se usa en la presente, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "una enzima" incluye una pluralidad de tales enzimas, y la referencia a "la formulación" incluye la referencia a una o más formulaciones y equivalentes de estas conocidos por los expertos en la técnica, y similares,

Se describen en el presente documento polipéptidos que tienen actividad de amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene

a) al menos 65% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88 o 205, y/o

b) al menos 78% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 16, 48, 97, 105, 235, 240, 248, 266, 311, 347, 350, 362, 364, 369, 393, 395, 396, 400, 401, 403, 412 o 409, y/o

c) al menos 78% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/A/V/N/I/H/F, 34Q, 100Q/K/N/R, 272D, 392 K/D/E/Y/N/Q/R/T/G o 399C/H, y/o

d) al menos 95% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 44, 96, 204, 354 o 377, y/o

e) al menos 95% identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende la siguiente sustitución de aminoácido: 392S

con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como la SEQ ID NO: 1.

También se describe en el presente documento un polipéptido que tiene actividad amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88 o 205 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 235H/K/R, 240E, 392 K/D/E/Y o 409E con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

También se describe en el presente documento el uso de polipéptidos que tienen un grado de identidad de secuencia u homología de secuencia con la secuencia de aminoácidos definida en la presente o con un polipéptido que tiene las propiedades específicas definidas en la presente. En particular, se describen péptidos que tienen un grado de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, que se define a continuación u homólogos de estos. En la presente, el término "homólogo" significa una identidad de secuencia de entidad que tiene la presente secuencia de aminoácidos o la presente secuencias de nucleótidos, donde la secuencia de aminoácidos presente es con preferencia la SEQ ID NO: 1 y la presente secuencia de nucleótidos es con preferencia la SEQ ID NO: 52. En un aspecto, la secuencia de aminoácidos y/o secuencia de nucleótidos homóloga puede proporcionar y/o codificar un polipéptido que retiene la actividad funcional y/o mejora la actividad del polipéptido de la SEQ ID NO: 1.

En el presente contexto, se toma una secuencia homóloga para incluir una secuencia de aminoácidos que puede ser al menos 65%, 70%, 75%, 78%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99%, idéntica a la secuencia presente. Normalmente, los homólogos comprenderán los mismos sitios activos etc. que la presente secuencia de aminoácidos. Aunque la homología también se puede considerar en términos de semejanza (es decir, residuos de aminoácidos que tienen propiedades/funciones químicas similares), en el presente contexto se prefiere expresar la homología en términos de identidad de secuencia.

Las comparaciones de identidad de secuencia se pueden realizar a simple vista, o más normalmente, con la ayuda de programas de comparación de secuencias fácilmente disponibles. Estos programas informáticos disponibles en el comercio utilizan algoritmos de comparación complejos para alinear dos o más secuencias que reflejan mejor los eventos evolutivos que podría haber llevado a la diferencia) entre las dos o más secuencias. Por lo tanto, estos algoritmos funcionan con un sistema de puntuación de recompensa del alineamiento de aminoácidos idénticos o similares y la penalización de la inserción de las brechas, extensiones de brecha y alineamientos de los aminoácidos no similares. El sistema de puntuación de los algoritmos de comparación incluye:

i) la asignación de una puntuación de penalización cada vez que se inserta una brecha (puntuación de penalización de la brecha),

ii) la asignación de una puntuación de penalización cada vez que se extiende una brecha existente con una posición extra (puntuación de la penalización de extensión),

iii) la asignación de puntuaciones altas después del alineamiento de aminoácidos idénticos, y

iv) la asignación de puntuaciones variables después del alineamiento de aminoácidos no idénticos.

La mayoría de los programas de alineamiento permiten modificar las penalizaciones. Sin embargo, se prefiere utilizar los valores predeterminados cuando se utiliza tal software para las comparaciones de secuencias.

Las puntuaciones dadas para el alineamiento de los aminoácidos no idénticos se asignan de acuerdo con una matriz de puntuación también llamada una matriz de sustitución. Las puntuaciones provistas en tales matrices de sustitución están reflejando el hecho de que la probabilidad de que un aminoácido sea sustituido con otro durante la evolución varía y depende la naturaleza física/química del aminoácido para sustituir. Por ejemplo, la probabilidad de que un aminoácido polar sea sustituido con otro aminoácido polar es mayor en comparación con que sea sustituido con un aminoácido hidrofóbico. Por lo tanto, la matriz de puntuación asignará la puntuación más alta de aminoácidos idéntica, menor puntuación de aminoácidos no idénticos, pero similares e incluso más baja puntuación para los aminoácidos no similares no idénticos. Las matrices de puntuación más frecuentemente usadas son las matrices PAM (Dayhoff et al. (1978), Jones et al. (1992)), las matrices BLOSUM (Henikoff y Henikoff (1992)) y la matriz de Gonnet (Gonnet et al. (1992)).

Los programas de computadora adecuados para llevar a cabo tal alineamiento incluyen, pero sin limitación, Vector NTI (Invitrogen Corp.) y los programas ClustalV, ClustalW y ClustalW2 (Higgins DG y Sharp PM (1988), Higgins et al. (1992), Thompson et al. (1994), Larkin et al. (2007). Una selección de diferentes herramientas de alineamiento están disponibles desde el servidor ExPASy Proteomics en www.expasy.org. Otro ejemplo de software que puede realizar el alineamiento de secuencia es BLAST (herramienta de búsqueda de alineamiento local básico), que está disponible en la página web del National Center for Biotechnology Information que en la actualidad se pueden encontrar en http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ y que fue descrito en primer lugar en Altschul et al. (1990). J. Mol Biol 215; 403-410.

Una vez que el software ha producido un alineamiento, es posible calcular el % de semejanza y el % de identidad de secuencia. El software normalmente realiza esto como parte de la comparación de secuencias y genera un resultado numérico.

En una forma de realización, se prefiere utilizar el software ClustalW para realizar alineamientos de secuencias. Con preferencia, el alineamiento con ClustalW se lleva a cabo con los siguientes parámetros para el alineamiento por pares:

Matriz de sustitución:	Gonnet 250
Penalización de apertura de brecha:	20
Penalización de extensión de la brecha:	0.2
Penalización de fin de la brecha:	Ninguno

ClustalW2 está, por ejemplo, disponible en Internet por el Instituto Europeo de Bioinformática en la página web www.ebi.ac.uk EMBL-EBIen bajo herramientas – análisis de secuencia - ClustalW2. En la actualidad, la dirección exacta de la herramienta ClustalW2 es www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2.

En otra forma de realización, se prefiere utilizar el programa Align X de Vector NTI (Invitrogen) para realizar alineamientos de secuencias. En una forma de realización, se ha usado Exp10 con la configuración predeterminada:

Penalidad de apretura de brecha: 10

Penalización de extensión de la brecha: 0.05

Rango de penalización de la separación de brecha: 8

Matriz de puntuación: blosum62mt2

Por lo tanto, también se describe el uso de variantes, homólogos y derivados de cualquier secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido como se define en la presente, en particular los de la SEQ ID NO: 1 o las de SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8 o 10 se define a continuación.

Las secuencias, en particular las de las variantes, homólogos y derivados de la SEQ ID NO: 1, también pueden tener supresiones, inserciones o sustituciones de residuos de aminoácidos que producen un cambio silencioso y producen una sustancia funcionalmente equivalente. Las sustituciones de aminoácidos deliberadas se pueden realizar sobre la base de la semejanza de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofilicidad, y/o la naturaleza anfipática de los residuos siempre que se retenga la actividad de unión secundaria de la sustancia. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polares no cargados que tienen valores de hidrofilicidad similares incluyen leucina, isoleucina, valina, glicina, alanina, asparagina, glutamina, serina, treonina, fenilalanina y tirosina.

La presente invención también abarca una sustitución conservadora (sustitución y reemplazo se usan en la presente para significar el intercambio de un residuo de aminoácido existente, con un residuo alternativo) que se puede producir es decir sustitución de igual a igual, tal como básico por básico, ácido por ácido, polar por polar, etc. La sustitución no conservadora también se puede producir, es decir, de una clase de residuo a otro, o que alternativamente involucra la inclusión de aminoácidos no naturales tales como ornitina (de aquí en adelante en la presente denominada como Z), ornitina del ácido diaminobutírico (de aquí en adelante en la presente denominada como B), ornitina norleucina (de aquí en adelante en la presente denominada como O), pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina y fenilglicina.

Las sustituciones conservadoras que se pueden realizar están, por ejemplo dentro de los grupos de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos alifáticos (alanina, valina, leucina, isoleucina), aminoácidos polares (glutamina, asparagina, serina, treonina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), hidroxilaminoácidos (serina, treonina), aminoácidos grandes (fenilalanina y triptófano) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina).

Los reemplazos también se pueden realizar mediante aminoácidos no naturales e incluyen; aminoácidos alfa * y alfa-disustituidos*, N-alquil aminoácidos *, ácido láctico *, derivados de haluro de aminoácidos naturales tales como trifluorotirosina *, p-Cl-fenilalanina *, p-Br-fenilalanina *, p-I-fenilalanina *, L-alil-glicina *, ß-alanina*, ácido L-α-amino butírico*, ácido L-γ-amino butírico*, ácido L-α-amino isobutírico*, ácido L-ε-amino caproico#, ácido 7-amino heptanoico*, L-metionina sulfona#*, L-norleucina*, L-norvalina*, p-nitro-L-fenilalanina*, L-hidroxiprolina#, L-tioprolina*, metil derivados de fenilalanina (Phe) tales como 4-metil-Phe*, pentametil-Phe*, L-Phe (4-amino)#, L-Tyr (metil)*, L-Phe (4-isopropil)*, L-Tic (ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxilo)*, ácido L-diaminopropiónico# y L-Phe (4-benci)*. Se ha usado la notación * para el fin de la discusión anterior (con relación a la sustitución homóloga o no conservadora), para indicar la naturaleza hidrofóbica del derivado mientras que # se ha usado para indicar la naturaleza hidrofílica del derivado #* indica características anfipáticas.

Las variantes de secuencias de aminoácidos pueden incluir grupos espaciadores adecuados que se pueden insertar entre cualquiera de dos residuos de aminoácidos de la secuencia que incluyen grupos alquilo tales como grupos metilo, etilo o propilo, además de espaciadores de aminoácidos tales como residuos de glicina o p-alanina. Una forma adicional de variación, que implica la presencia de uno o más residuos de aminoácidos en forma peptoide, será bien entendida por los expertos en la técnica. Para evitar dudas, "la forma peptoide" se utiliza para referirse a variantes de los residuos de aminoácidos en los que el grupo sustituyente α-carbono está en átomo de nitrógeno del residuo en lugar del α-carbono. Los procesos para preparar péptidos en forma peptoide son conocidos en la técnica, por ejemplo Simon RJ et al. (1992), Horwell DC. (1995).

Se describen en el presente documento variantes de polipéptidos, que son amilasa de Pseudomonas saccharophila (PS4), variantes que tienen la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 y que tiene al menos al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 78%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98% o al menos 99% de identidad de la secuencia de aminoácidos con esta.

En un aspecto, con preferencia la secuencia utilizada en la presente invención está en una forma purificada. El término "purificado" significa que un componente dado está presente en un nivel alto. El componente es de forma deseable, el componente activo predominante presente en una composición.

Definiciones

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica. Los siguientes términos se proporcionan a continuación.

"Amilasa" significa una enzima que es, entre otras cosas, capaz de catalizar la degradación del almidón. Una actividad de la amilasa de acción endo escinde enlaces •-D-(1 • 4) O-glicosídicos dentro de la molécula de almidón de una manera aleatoria. Por el contrario, una actividad amilolítica de acción exo escinde una molécula de almidón del extremo no reductor del sustrato. "Actividad de amilasa de acción endo", "endo-actividad", "actividad endo-específica" y "endo-especificidad" son sinónimos, cuando los términos se refieren a las variantes de polipéptidos tal como se definen en las reivindicaciones. Lo mismo es válido para los términos correspondientes para actividad exo.

"Maltotetrahidrolasa formadora de maltotetraosa; EC 3.2.1.60; amilasa formadora de G4; G4-amilasa y glucano 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa" se pueden usar de manera intercambiable".

En el presente contexto "PS4" se utiliza para designar el maltotetrahidrolasa de *Pseudomonas saccharophila.*

Una "variante" o "variantes" se refiere a polipéptidos o ácidos nucleicos. El término "variante" se puede usar indistintamente con el término "mutante". Las variantes incluyen inserciones, sustituciones, transversiones, truncamientos, y/o inversiones en una o más localizaciones en la secuencia de aminoácidos o de nucleótidos, respectivamente. Las frases "variante de polipéptido", "polipéptido", "variante" y "variante de la enzima" significa un polipéptido/proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que se ha modificado de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. Las variantes de polipéptidos incluyen un polipéptido que tiene un cierto porcentaje, por ejemplo, 65%, 66%, 68%, 70%, 72%, 74%, 76%, 78%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99%, de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1. Como se usa en la presente, "enzimas originales", "secuencia original", "polipéptido original" significan enzimas y polipéptidos a partir de los cuales se basan las variantes de polipéptidos, por ejemplo, SEQ ID NO: 1. Un "ácido nucleico original" significa una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido original. La secuencia de señal de una "variante" puede ser la misma (por ejemplo, SEQ ID NO: 11) o puede diferir de la secuencia señal de la PS4 de tipo salvaje. Una variante se puede expresar como una proteína de fusión que contiene un polipéptido heterólogo. Por ejemplo, la variante puede comprender un péptido señal de otra proteína o una secuencia diseñada para ayudar a la identificación o purificación de la proteína de fusión expresada, tal como una secuencia de His-Tag.

Para describir las diferentes variantes que se consideran abarcadas por la presente descripción, se adoptará la siguiente nomenclatura para facilitar la referencia. Cuando la sustitución incluye un número y una letra, por ejemplo, 141P, entonces se refiere a {posición de acuerdo con el sistema de numeración /aminoácido sustituido}. De acuerdo con ello, por ejemplo, la sustitución de un aminoácido a prolina en la posición 141 se designa como 141P. Cuando la sustitución incluye una letra, un número, y una letra, por ejemplo, A141P, entonces se refiere a {aminoácido original/ posición de acuerdo do con el sistema de numeración /aminoácido sustituido}. De acuerdo con ello, por ejemplo, la sustitución de alanina con prolina en la posición 141 se designa como A141P.

Cuando son posibles dos o más sustituciones en una posición particular, esta se denominará con letras contiguas, que puede estar opcionalmente separados por marcas de barra "/", por ejemplo, G303ED o G303E/D.

Las posiciones y sustituciones de aminoácidos mencionadas en la presente documento se listan con referencia a la posición correspondiente y el aminoácido correspondiente de la SEQ ID NO: 1. Las posiciones equivalentes en otra secuencia se pueden encontrar mediante el alineamiento de esta secuencia con la SEQ ID NO: 1 para encontrar un alineamiento con el porcentaje de identidad más alto y determinar a partir de entonces cuál aminoácido se alinea para corresponder con un aminoácido de una posición específica de la SEQ ID NO: 1. Tal alineamiento y uso de una secuencia como una primera referencia es simplemente una cuestión de rutina para un experto en la técnica.

Las "variantes de ácidos nucleicos" pueden incluir secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridarse con las secuencias de nucleótidos presentadas en este documento, en particular, con la SEQ ID NO: 52. Por ejemplo, una variante de secuencia es complementaria a secuencias capaces de hibridarse en condiciones rigurosas, por ejemplo, (50°C y 0,2X SSC (1X SSC = NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M, pH 7,0), a las secuencias de nucleótidos presentadas en este documento, en particular, a la SEQ ID NO: 52 (ADN pMS 382) Más particularmente, el término variante abarca secuencias que son complementarias a las secuencias que son capaces de hibridar en condiciones muy rigurosas, por ejemplo, 65ºC y 0,1 x SSC, a las secuencias de nucleótidos presentadas en este documento, en particular, a la SEQ ID NO: 52 (ADN pMS 382). El punto de fusión (Tm) de una variante de ácido nucleico puede ser de aproximadamente 1, 2, o 3ºC inferior a la Tm del ácido nucleico de tipo salvaje. Las variantes de ácidos nucleicos incluyen un polinucleótido que tiene un cierto porcentaje, por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99%, de identidad de secuencia con el ácido nucleico que codifica SEQ ID NO: 1.

Como se usa en la presente, el término "expresión" se refiere al proceso por el cual se produce un polipéptido sobre la base de la secuencia de ácidos nucleicos de un gen. El proceso incluye tanto la transcripción como la traducción.

"Aislado" significa que la secuencia está al menos sustancialmente libre de al menos otro componente que la secuencia asociada naturalmente y hallada en la naturaleza, por ejemplo, secuencias genómicas.

"Purificado" significa que el material está en un estado relativamente puro, por ejemplo, al menos aproximadamente 90% puro, al menos aproximadamente 95% de pureza, o al menos aproximadamente 98% puro.

"Termoestable" significa que la enzima mantiene su actividad después de la exposición a temperaturas elevadas. La termoestabilidad de una enzima se puede medir por su vida media ($t_{1/2}$), donde la mitad de la actividad enzimática se pierde por la vida media. El valor de la vida media se calcula en unas condiciones determinadas mediante la medición de la actividad de la amilasa residual. Para determinar la vida media de la enzima, la muestra se calienta a la temperatura de ensayo durante 1-10 min, y la actividad se mide usando un ensayo estándar para la actividad de la amilasa, tal como el ensayo Betamyl® (Megazyme, Irlanda).

Como se usa en la presente, "pH óptimo" significa el pH en el que las variantes de polipéptidos descriptas en la presente muestran la actividad en un ensayo estándar para la actividad de la amilasa, medida en un rango de pH.

Como se usa en la presente, "polipéptido" se usa de forma intercambiable con las expresiones "secuencia de aminoácidos", "enzima", "péptido" y/o "proteína". Como se usa en la presente, "secuencia de nucleótidos" o "secuencia de ácido nucleico" se refiere a una secuencia de oligonucleótido o secuencia de polinucleótidos y variantes, homólogos, fragmentos y derivados de estos. La secuencia de nucleótidos puede ser de origen genómico, sintético o recombinante y puede ser de cadena doble o cadena simple, sea que represente la cadena de sentido o anti-sentido. Como se usa en la presente, la expresión "secuencia de nucleótidos" incluye ADN genómico, ADNc, ADN sintético y ARN.

"Homólogo" significa una entidad que tiene un cierto grado de identidad u "homología" con las secuencias de aminoácidos presentes y las secuencias de nucleótidos presentes. Una "secuencia homóloga" incluye un polinucleótido o un polipéptido que tiene un cierto porcentaje, por ejemplo, 80%, 85%, 90%, 95%, o 99%, de identidad de secuencia con otra secuencia. El porcentaje de identidad significa que, cuando se alinean, ese porcentaje de bases o residuos de aminoácidos son los mismos que cuando se comparan las dos secuencias. Las secuencias de aminoácidos no son idénticas, donde se sustituye, elimina o añade un aminoácido en comparación con la secuencia presente. El porcentaje de identidad de secuencia típicamente se mide con respecto a la secuencia madura de la proteína presente, es decir, por ejemplo después de la eliminación de una secuencia señal. Típicamente, los homólogos comprenderán los mismos residuos del sitio activo que la presente secuencia de aminoácidos. Los homólogos también retienen actividad de la amilasa, aunque el homólogo puede tener diferentes propiedades enzimáticas que la PS4 de tipo salvaje.

Como se usa en la presente, "hibridación" incluye el proceso por el cual una cadena de ácido nucleico se une con una cadena complementaria a través de apareamiento de basas, así como el proceso de amplificación que se lleva a cabo en las tecnologías de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La variante de ácido nucleico puede existir como ADN o ARN de cadena simple o doble, un heterodúplex de ADN/ARN o un copolímero ARN/ADN. Como se usa en la presente, "copolímero" se refiere a una cadena de ácido nucleico simple que comprende tanto ribonucleótidos y desoxirribonucleótidos. La variante de ácido nucleico se puede optimizar por codones para aumentar adicionalmente la expresión.

Como se usa en la presente, un compuesto "sintético" se produce por síntesis química o enzimática in vitro. Incluye, pero sin limitación, variantes de ácidos nucleicos hechos con el uso óptimo de codones para los organismos huésped, tales como una célula huésped de levadura u otros huéspedes de expresión de elección.

Como se usa en la presente, la "célula transformada" incluye células, que incluyen células bacterianas y fúngicas, que se han transformado mediante el uso de técnicas de ADN recombinante. La transformación se produce normalmente mediante la inserción de una o más secuencias de nucleótidos en una célula. 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 debe transformar, tal como una proteína de fusión.

Como se usa en la presente, "unido operativamente" significa que los componentes descriptos están en una relación que les permite funcionar de la manera prevista. Por ejemplo, una secuencia reguladora unida operativamente a una secuencia codificadora se liga de tal manera que la expresión de la secuencia codificadora se obtiene en condiciones compatibles con las secuencias de control.

Como se usa en la presente, el término "almidón" se refiere a cualquier material compuesto de los hidratos de carbono de polisacáridos complejos de plantas, tales como maíz, compuesto de amilosa y amilopectina con la fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$, donde X puede ser cualquier número. El término "almidón granular" se refiere a almidón crudo, es decir, almidón sin cocer, por ejemplo, que no se ha sometido a gelatinización.

El término "licuefacción" se refiere a la etapa en la conversión del almidón en el que gelatiniza el almidón se hidroliza para dar dextrinas solubles de bajo peso molecular. Como se usa en la presente, el término "sacarificación" se refiere a la conversión enzimática de almidón a glucosa. El término "grado de polimerización" (DP) se refiere al número (n) de unidades glucopiranosa anhidra en un sacárido determinado. Los ejemplos de DP1 son los monosacáridos glucosa y fructosa. Los ejemplos de DP2 son los disacáridos maltosa y sacarosa.

Como se usa en la presente, la expresión "contenido de sólidos secos" (ds) se refiere a los sólidos totales de una suspensión en una base de porcentaje en peso seco. El término "suspensión" se refiere a una mezcla acuosa que contiene sólidos insolubles.

La frase "sacarificación y fermentación simultáneas (SSF)" se refiere a un proceso en la microorganismo productor de etanol y al menos una enzima, tal como PS4 o una variante de esta, están presentes durante la misma etapa del proceso. SSF se refiere a la hidrólisis simultánea de sustratos de almidón granular a sacáridos y la fermentación de los sacáridos en alcohol, por ejemplo, en el mismo recipiente del reactor.

Como se usa en la presente, "microorganismo etanologénico" se refiere a un microorganismo con la capacidad de convertir un azúcar u oligosacárido a etanol.

1.2. Abreviaturas

Las siguientes abreviaturas se aplican a menos que se indique lo contrario:

ADA	azodicarbonamida
cDNA	ADN complementario
CGTase	ciclodextrina glucanotransferasa
DEAE	dietilaminoetanol
dH_2O	agua desionizada
DNA	ácido desoxirribonucleico
ds-ADN	ADN de cadena doble
EC	comisión de enzimas para la clasificación de enzimas
FGSC	Fungal Genetics Stock Center
G121F	residuo de glicina (G) en la posición 121 de la SEQ ID NO: 2 se reemplaza con un residuo de fenilalanina (F), donde los aminoácidos se designan con las abreviaturas de una sola letra comúnmente conocida en la técnica
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento
mARN	ácido ribonucleico mensajero
PCR	reacción en cadena de polimerasa
PDB	base de datos de proteína
PEG	polietilenglicol
ppm	partes por millón
PS4	amilasa formadora de G4 *P. saccharophila*
RT-PCR	reacción en cadena de polimerasa- transcriptasa inversa
SAS	amilasa formadora de G4 *P. saccharophila*
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
1X SSC	NaCl 0,15 M, citrato de sodio 0,015 M, pH 7,0
SSF	sacarificación y fermentación simultánea
$t_{½}$	vida media
Tm	temperatura de fusión (°C) a la que funde el 50% de la proteína presente
ΔTm	°C de aumento en la Tm
w/v	peso/volumen
w/w	peso/peso

2. Variantes de polipéptidos de la SEQ ID NO: 1

En un aspecto, se proporciona un polipéptido que tiene una sustitución en una o más posiciones que produce una propiedad alterada, que puede ser cualquier combinación de exospecificidad, endoespecificidad o termoestabilidad alterada, o una alteración de propiedades de manipulación, en relación con la SEQ ID NO: 1. Tales variantes de polipéptidos se denominan también en la presente por conveniencia como "variante del polipéptidoe", "variante de polipéptido" o "variante". En un aspecto, los polipéptidos tal como se definen en la presente tienen un efecto antienvejecimiento mejorado en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, los polipéptidos tal como se definen en la presente tienen una termoestabilidad mejorada en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1. En formas de realización muy preferidas, tienen la ventaja añadida de una mayor termoestabilidad, o actividad exoamilasa mayor o una mayor estabilidad de pH, o cualquier combinación.

En un aspecto, las variantes definidas en la presente exhiben actividad enzimática. En un aspecto, las variantes de polipéptidos comprenden actividad de amilasa. En un aspecto adicional, las variantes de polipéptidos comprenden actividad de exoamilasa. En un aspecto adicional, las variantes de polipéptidos exhiben actividad de exoamilasa no maltogénica. En un aspecto, las variantes definidas en la presente se pueden derivar de la •-amilasa de Pseudomonas saccharophila (PS4). En un aspecto, las variantes definidas en la presente son una maltotetrahidrolasa fomadora de maltotetraosa, también denominada EC 3.2.1.60; amilasa formadora de G4; G4-amilasa o glucan 1,4-alfa-maltotetrahidrolasa.

Las composiciones, que incluyen aditivos alimentarios, productos alimenticios, productos de panadería, composiciones mejoradoras, productos alimenticios, que incluyendo alimentos para animales, etc. que comprenden tales variantes de polipéptidos definidas en la presente, tales como los que tienen actividad exoamilasa no maltogénica, así como métodos de fabricación y uso de tales polipéptidos y las composiciones, se proporcionan en la presente.

Como se señaló anteriormente, las variantes de polipéptidos pueden comprender una o más propiedades de manipulación mejoradas, con preferencia propiedades de horneado mejoradas. Por lo tanto, las variantes de polipéptidos son tales que los productos alimenticios así tratados tienen una o más de (con preferencia todas de) una firmeza inferior, una elasticidad superior, una cohesión superior, una friabilidad inferior o mayor capacidad de plegado. Tales propiedades de manipulación u horneado mejoradas exhibidas por los polipéptidos variantes se describen con más detalle a continuación.

Además, se proporciona un tratamiento de los productos alimenticios, en particular masas y productos de panadería con tales polipéptidos, y de modo que tales productos alimenticios presentan las cualidades deseadas anteriormente expuestas.

Además se proporcionan otros usos de las variantes descriptas en la presente y composiciones que comprenden estas variantes, tales como en la preparación de detergentes, como edulcorantes, jarabes, etc. Las composiciones incluyen el polipéptido junto con al menos otro componente. En particular, se proporcionan aditivos para alimentos o alimentos para animales que comprenden los polipéptidos.

Se proporciona un polipéptido aislado y/o purificado que comprende una variante de polipéptido definida en la presente. En una forma de realización, la variante de polipéptido es una forma madura del polipéptido (SEQ ID NO: 1), donde se escinde la secuencia líder de 21 aminoácidos, de modo que el extremo N-terminal del polipéptido comienza en el residuo de ácido aspártico (D). En un aspecto, las variantes incluyen un dominio de unión de almidón C-terminal. Una secuencia de aminoácidos representativa de un dominio de unión al almidón comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 36. Otras variantes incluyen las variantes donde se han añadido o suprimido entre uno y aproximadamente 25 residuos de aminoácidos con respecto a la SEQ ID NO: 1. En un aspecto, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, donde se ha sustituido cualquier número entre uno y aproximadamente 25 aminoácidos. En un aspecto adicional, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, donde se ha sustituido cualquier número entre tres y doce aminoácidos. En un aspecto adicional, la variante tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, donde se ha sustituido cualquier número entre cinco y nueve aminoácidos.

En un aspecto, se han sustituido al menos dos, en otro aspecto al menos tres, y aún en otro aspecto al menos cinco aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto adicional, la longitud de la variante del polipéptido es 390 a 540 aminoácidos. En un aspecto adicional, la longitud de la variante del polipéptido es 410 a 440 aminoácidos. En un aspecto adicional, la longitud de la variante del polipéptido es 420 a 435 aminoácidos. En un aspecto adicional, la longitud de la variante del polipéptido es 429 a 430 aminoácidos.

En un aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que tiene actividad amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 65% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ. ID NO: 1 y en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 205, con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1; en donde el polipéptido tiene una termoestabilidad mejorada comprada con la amilasa de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88, 205, 235, 240, 248, 266, 311, 377 o 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/A/V/N/I/H/F, 34Q, 100Q/K/N/R, 272D o 392K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente además comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88, 205, 235, 240, 311 o 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/N/I/H/F, 272D, o 392 K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende sustituciones de aminoácidos al menos en cuatro, cinco o en todas las siguientes posiciones: 88, 205, 235, 240, 311 o 409 y/o tiene al menos una, o dos de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/N/I/H/F, 272D o 392 K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente además comprende uno o más de los siguientes aminoácidos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F,

179T, 223E/S/K/A, 229P, 307K, 309P y 334P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene además los siguientes aminoácidos 33Y, 34N, 70D, 121F, 134R, 141P, 146G, 157L, 161A, 178F, 179T, 229P, 307K, 309P y 334P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene al menos una de las sustituciones de aminoácidos en a) de la reivindicación 1 y además comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 44, 96, 204, 354 o 377. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, o 99% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 34Q. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 42K/F/H/I/N/A/V. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 42K/F/H/I/N. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 42K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 88. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 88L/Y/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 88L. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 88Y. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 205. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 205L/K/M/N/Q/R/V/Y. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 205L/K/M/N/Q/R/V. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 205L. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 235. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235H/K/R/Q/S. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235H/K/R/Q. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235H/K/R. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235R. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235H. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 235K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 240. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 240E/H/M/D/S. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 240E/H/M/D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 240E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 272D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 311. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 311P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 409. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 409H/Q/T/E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 100Q/K/N/R. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 100Q. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392D/E/K/Y/N/Q/R/S/T/G. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392D/E/K/Y/N/Q/R/S/T. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392D/E/K/Y. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392E.

En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 392Y. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene ambos de los siguientes aminoácidos 235R y 311P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 16. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 16/A/E/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 48. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 48/C/L. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 97. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 105. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 105/N/R. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 248. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 266. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 347. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 347/C/D/H/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 350. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 350E/H/N. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 354. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 354D/E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 362. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 362E/H/P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 364. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 364E/K/NQ. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 369. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 369I/N. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 377. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 393. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 393D/E/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos

en la posición 395. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 395C/E/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 396. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 396D/E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 399. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 399C/H. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 400. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 400S/W. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 401. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 401D/K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 403. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 403E/T/V. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 412. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 412D/N. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente además comprende uno o más de los siguientes aminoácidos 121F, 134R, 141P, 229P, o 307K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene uno o más de los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 235R, 240E, 272D, 311P, 392D, o 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 235R, 311P, 392D yr 223S, 223K o 223A. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente además comprende uno o más seleccionados del grupo que consiste en 272D, 409E, 205L y 240E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene al menos cuatro, cinco, seis, siete u ocho de los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 235R, 240E, 272D, 311P, 392D, o 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido 223A/K/S. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 223S, 235R, 311P y 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 223K, 235R, 272D, 311P y 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 223S, 235R, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 223S, 235R, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 223K, 240E, 235R, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene los siguientes aminoácidos 42K, 88L, 205L, 223A, T235R, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente tiene uno o más aminoácidos en el extremo N-terminal. En un aspecto, el polipéptido definido en la presente tiene el aminoácido M en el extremo N-terminal. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88, 205, 235 o 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 34Q, 100Q, 223A/S, 240E, 311P, 392D, o 409E con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 34Q, 88K/L/Y, 100Q, 205L, 223A/S/K, 235K/H/Q/R, 240E/D, 248H, 266T, 311P, 377D/E/P, 392K/D/Y o 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 34Q, 42K, 88L, 100Q, 205L, 223A/S/K, 235K/R, 240E, 311P, 392D o 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 235R y 311P. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende la sustitución de aminoácidos 42K. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K y 223S. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 223S y 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 223A, 235R, 311P y 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 205L, 223S, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 205L, 223K, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 205L, 223S, 235R, 311P y 392D. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 34Q, 42K, 88L, 205L, 223K, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E. En un aspecto adicional, el polipéptido definido en la presente comprende las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K, 88L, 100Q, 205L, 223K, 235R, 240E, 311P, 392D y 409E.

Las formas de realización representativas de los polipéptidos definidos en la presente comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34. Otras formas de realización representativas de los polipéptidos definidos en la presente comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17. Otras formas de realización representativas de los polipéptidos definidos en la presente tiene una secuencia de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33 y SEQ ID NO: 34. Otras formas de realización representativas de los polipéptidos definidos en la presente tiene una secuencia

de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, y SEQ ID NO: 17, y opcionalmente uno o más aminoácidos en el extremo N-terminal.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia HGGDEIILQFHWN (SEQ ID NO: 37) en las posiciones correspondientes a las posiciones 13-26 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia DGF-X1-AIW-X2-P-X3-PWRD-X4-SSW (SEQ ID NO: 38), donde X1 es S o T, X2 es M o L, X3 es V o P y X4 es cualquier residuo de aminoácido natural, con preferencia un L-aminoácido, en las posiciones correspondientes a las posiciones 49-66 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia GGEGYFW (SEQ ID NO: 39) en las posiciones correspondientes a las posiciones 79-85 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia VPNH (SEQ ID NO: 40) en las posiciones correspondientes a las posiciones 114-117 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia CDDGD (SEQ ID NO: 41) en las posiciones correspondientes a las posiciones 150-154 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia AGGFRFDFVRG (SEQ ID NO: 42) en las posiciones correspondientes a las posiciones 187-197 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia FALK (SEQ ID NO: 43) en las posiciones correspondientes a las posiciones 256-259 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia WREVAVTFVDNHD (SEQ ID NO: 44) en las posiciones correspondientes a las posiciones 282-294 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia GYSPG (SEQ ID NO: 45) en las posiciones correspondientes a las posiciones 296-300 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia GQH (SEQ ID NO: 46) en las posiciones correspondientes a las posiciones 304-306 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia AYAYI (SEQ ID NO: 47) en las posiciones correspondientes a las posiciones 318-322 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia SPGTP (SEQ ID NO: 48) en las posiciones correspondientes a las posiciones 325-329 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia VYW (SEQ ID NO: 49) en las posiciones correspondientes a las posiciones 331-333 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente comprenden la secuencia HMYDWG (SEQ ID NO: 50) en las posiciones correspondientes a las posiciones 335-340 con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1.

En otro aspecto, la variante del polipéptido definida en la presente tiene la secuencia de la SEQ ID NO:1, donde se ha sustituido cualquier número entre uno y aproximadamente 25 aminoácidos. Los ejemplos representativos de las variantes de polipéptidos tienen sustituciones de aminoácidos únicas o diversas se muestran en la siguiente TABLA A:

pMS	Mutaciones en comparación con pMS382 que tienen la SEQ ID NO:1
pms1104 (SEQ ID NO: 20)	Q42K
pms1105 (SEQ ID NO: 27)	Q42K, E223S
pms1723 (SEQ ID NO: 28)	Q42K, E223S, A392D
pms2104 (SEQ ID NO: 29)	Q42K, R88L, E223A, T235R, Q311P, A392D
pms2118 (SEQ ID NO: 34)	Q42K, R88L, S205L, E223S, T235R, Q240E, Q311P, A392D, S409E
pms2124 (SEQ ID NO: 31)	Q42K, R88L, S205L, E223K, T235R, Q240E, Q311P, A392D, S409E
pms1284 (SEQ ID NO: 23)	T235R, Q311P
pms1286 (SEQ ID NO: 22)	T235R
pms1290 (SEQ ID NO: 24)	T235K
pms465 (SEQ ID NO: 18)	E223S
pms1042 (SEQ ID NO: 19)	Q311P
pms1153 (SEQ ID NO: 21)	R88L
pms1484 (SEQ ID NO: 25)	S205L
pms1579 (SEQ ID NO: 26)	S409E
pms2138 (SEQ ID NO: 30)	Q42K, R88L, S205L, E223S, T235R, Q311P, A392D
pms2177 (SEQ ID NO: 32)	N34Q, Q42K, R88L, S205L, E223K, T235R, Q240E, Q311P, A392D,S409E
pms2178 (SEQ ID NO: 33)	Q42K, R88L, G100Q, S205L, E223K, T235R, Q240E, Q311P, A392D,S409E
pms1776 (SEQ ID NO: 12)	Q42K, R88L, E223S, T235R, Q311P, A392D
pms1934 (SEQ ID NO: 13)	Q42K, R88L, E223K, T235R, H272D, Q311P, A392D
pms2020 (SEQ ID NO: 14)	Q42K, R88L, E223S, T235R, Q311P, A392D, S409E
pms2022 (SEQ ID NO: 15)	Q42K, R88L, S205L, E223S, T235R, Q311P, A392D, S409E
pms2062 (SEQ ID NO: 16)	Q42K, R88L, S205L, E223K, Q240E, T235R, Q311P, A392D, S409E
pms2171 (SEQ ID NO: 17)	Q42K, R88L, S205L, E223A, T235R, Q311P, A392D, S409E

Las variantes de polipéptidos definidas en la presente pueden tener una termoestabilidad alterada, una actividad de endo-amilasa alterada, una actividad de exo-amilasa alterada, y/o una relación alterada de actividad de exo- a endo-amilasa en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 10. En un aspecto, los polipéptidos definidos en la presente tiene un mejor efecto antienvejecimiento en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1. En otro aspecto, los polipéptidos definidos en la presente tienen una mejor termoestabilidad en comparación con la amilasa de la SEQ ID NO: 1.

Las variantes de polipéptidos definidas en la presente pueden tener hasta 25, 23, 21, 19, 17, 15, 13, 11, 9, 8, 7, 6, 5 supresiones, adiciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

La presente descripción también se refiere a cada uno y todo el esqueleto de G4-amilasa que tiene la SEQ ID NO: 2, 4, 6 u 8 que comprende las sustituciones definidas adicionalmente en la presente.

También se proporcionan ácidos nucleicos que codifican las variantes de polipéptidos anteriores. En una forma de realización, un ácido nucleico que codifica una variante del polipéptido definida en la presente es una secuencia de nucleótidos que codifica la proteínas que comprende una secuencia de aminoácidos de residuos 1-429 de la SEQ ID NO: 1 expuesta en la SEQ ID NO: 52. Por ejemplo, la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO: 3 codifica el esqueleto de la G4 amilasa con SEQ ID NO: 2. Como es bien entendido por los expertos en la técnica, el código genético está degenerado, lo que significa que múltiples codones en algunos casos pueden codificar el mismo aminoácido ácido. Los ácidos nucleicos pueden incluir el ADN genómico, ARNm, y ADNc que codifica una variante de polipéptido

2.1. Caracterización de la variante del polipéptido

Las variantes de la enzima se pueden caracterizar por sus secuencias de ácidos nucleicos y polipéptidos primaria, mediante el modelado estructural tridimensional, y/o por su actividad específica. Las características adicionales de las variantes de polipéptidos tal como se definen en la presente incluyen por ejemplo, estabilidad, rango de pH, estabilidad a la oxidación, y termoestabilidad. Los niveles de expresión y actividad de la enzima se pueden evaluar usando ensayos estándares conocidos por los expertos en este campo. En otro aspecto, las variantes demuestran características de rendimiento mejorado en relación con el polipéptido con la SEQ ID NO: 1, tales como una mejor estabilidad a altas temperaturas, por ejemplo, 65-85ºC. En un aspecto, las variantes de polipéptidos definidas en la presente son ventajosas para usar en la licuefacción u otros procesos que requieren temperaturas elevadas, tales como el horneado. Por ejemplo, una variante de polipéptido termoestable definida en la presente puede degradar el almidón a temperaturas de aproximadamente 55ºC a aproximadamente 85ºC o más.

Una característica de expresión significa un nivel alterado de expresión de la variante, cuando la variante se produce en una célula huésped particular. La expresión se refiere en general a la cantidad de variante activa que es recuperable a partir de un caldo de fermentación utilizando técnicas estándares en la materia, durante un período de tiempo dado. La expresión también se puede referir a la cantidad o tasa de variante producida dentro de la célula huésped o secretada por la célula huésped. La expresión también se puede referir a la tasa de traducción del ARNm que codifica la variante de la enzima.

Se proporciona un ácido nucleico complementario a un ácido nucleico que codifica cualquiera de las variantes de polipéptido definidas en la presente expuestas en la presente. Adicionalmente, se proporciona un ácido nucleico capaz de hibridar con el complemento. En otra forma de realización, la secuencia para su uso en los métodos y composiciones descriptos en la presente es una secuencia sintética. Incluye, pero sin limitación, las secuencias obtenidas con el uso óptimo de codones para la expresión en organismos huésped, tales como levaduras.

3. Producción de las variantes de polipéptidos definidas en la presente

Las variantes de polipéptidos provistas en la presente se pueden producir sintéticamente o mediante expresión recombinante en una célula huésped, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica. La variante de polipéptido expresada definida en la presente opcionalmente se aísla antes de su uso. En otra forma de realización, variante del polipéptido definida en la presente se purifica después de la expresión. Se describen los métodos de modificación genética y la producción recombinante de variantes de polipéptido, por ejemplo, en las patentes U.S. Nros 7.371.552, 7.166.453; 6.890.572; y 6.667.065; y Solicitudes publicadas U.S. Nros 2007/0141693; 2007/0072270; 2007/0020731; 2007/0020727; 2006/0073583; 2006/0019347; 2006/0018997; 2006/0008890; 2006/0008888; y 2005/0137111. Las enseñanzas pertinentes de estas descripciones, que incluyen las secuencias de polinucleótidos que codifican el polipéptido, cebadores, vectores, métodos de selección, células huésped, purificación y reconstitución de variantes de polipéptidos expresadas y la caracterización de variantes de polipéptidos definidas en la presente, que incluyen tampones útiles, rangos de pH, concentraciones de Ca^{2+}, concentraciones de sustrato y concentraciones de enzima para ensayos enzimáticos, se incorporan en la presente.

En otra forma de realización, las células huésped adecuadas incluyen una bacteria Gram positiva seleccionada del grupo que consiste en Bacillus subtilis, B. licheniformis, B. lentus, B. brevis, B. stearothermophilus, B. alkalophilus, B. amiloliquefaciens, B. coagulans, B. circulans, B. lautus, B. thuringiensis, Streptomyces lividans, o S. murinus; o una bacteria Gram negativa, donde dicha bacteria Gram negativa es una especie Escherichia coli o Pseudomonas. En un aspecto, la célula huésped es una B. subtilus o B. licheniformis. En una forma de realización, la célula huésped es B. subtilis, y la proteína expresada se manipula genéticamente para comprender una secuencia señal de B. subtilis, que se exponen con mayor detalle a continuación. En un aspecto, la célula huésped expresa el polinucleótido expuesto en las reivindicaciones.

En algunas formas de realización, una célula huésped se manipula genéticamente para expresar una variante del polipéptido definida en la presente con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 78%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con el polipéptido de la SEQ ID NO:1. En algunas formas de realización, el polinucleótido que codifica una variante del polipéptido definida en la presente tendrá una secuencia de ácidos nucleicos que codifica la proteína de la SEQ ID NO: 1 o una secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos aproximadamente 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con un ácido nucleico que codifica la proteína de la SEQ ID NO: 1. En una forma de realización, la secuencia de ácidos nucleicos tiene al menos aproximadamente 78%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia con el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 52.

3.1. Vectores

En un aspecto, la invención se refiere a un vector que comprende un polinucleótido. En un aspecto, una célula bacteriana comprende el vector. En algunas formas de realización, un constructo de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica una variante se transfiere a una célula huésped en un vector de expresión que comprende secuencias reguladoras unidas operativamente a una secuencia codificadora. El vector puede ser cualquier vector que puede ser integrado en un genoma de la célula huésped fúngica y se replica cuando se introduce en la célula

huésped. El catálogo de FGSC de cepas de la Universidad de Missouri, enumera vectores adecuados. Los ejemplos adicionales de vectores de expresión y/o vectores de integración adecuados se proporcionan en Sambrook et al, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2001); Bennett et al., MORE GENE MANIPULATIONS IN FUNGI, Academic Press, San Diego (1991), pp. 396-428 y la patente U.S, Nº. 5.874.276. Los ejemplos de vectores incluyen pFB6, pBR322, PUC18, pUC100 y pENTR/D, pDON™201, pDONR™221, pENTR™, pGEM®3Z y pGEM®4Z. Los ejemplos para usar en las células bacterianas incluyen pBR322 y pUC19, que permiten la replicación en E. coli, y pE194, por ejemplo, que permite la replicación en Bacillus.

En algunas formas de realización, un ácido nucleico que codifica una variante está unido operativamente a un promotor adecuado, que permite la transcripción en la célula huésped. El promotor puede derivar de genes que codifican proteínas homólogas o heterólogas a la célula huésped. Los ejemplos adecuados no limitantes de promotores incluyen promotores cbh1, cbh2, egl1, y egl2. En una forma de realización, el promotor es uno que es nativa de la célula huésped. Por ejemplo, cuando P. saccharophila es el huésped, el promotor es un promotor de P, saccharophila P nativo. Un "promotor inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. En otra forma de realización, el promotor es uno que es heterólogo para la célula huésped.

En algunas formas de realización, la secuencia codificadora está unida operativamente a una secuencia de ADN que codifica una secuencia señal. Un péptido señal representativo es la SEQ ID NO: 11, que es la secuencia señal nativa del precursor de PS4. En otras realizaciones, el ADN que codifica la secuencia señal se reemplaza con una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia señal de una especie distinta de P. saccharophila. En esta forma de realización, el polinucleótido que codifica la secuencia señal está inmediatamente corriente arriba y en marco del polinucleótido que codifica el polipéptido. La secuencia de señal se puede seleccionar de la misma especie que la célula huésped. En un ejemplo no limitante, la secuencia señal es una secuencia señal de ciclodextrina glucanotransferasa. (CGTasa; EC 2.4.1.19) de Bacillus sp, y las variantes de polipéptidos descriptas en la presente se expresan en una célula huésped de B. subtilis. Un residuo de metionina se puede añadir al extremo N-terminal de la secuencia señal.

En algunas formas de realización, una secuencia de señal y una secuencia de promotor que comprende un constructo de ADN o vector para introducir en una célula huésped fúngica derivan de la misma fuente. En algunas realizaciones, el vector de expresión también incluye una secuencia de terminación. En una forma de realización, la secuencia de terminación y la secuencia promotora se derivan de la misma fuente. En otra forma de realización, la secuencia de terminación es homóloga a la célula huésped.

En algunas realizaciones, un vector de expresión incluye un marcador seleccionable. Los ejemplos de marcadores seleccionables adecuados incluyen los que confieren resistencia a los agentes antimicrobianos, por ejemplo, higromicina o fleomicina. Los marcadores selectivos nutricionales también son adecuados e incluyen amdS, argB, y pyr4. En una forma de realización, el marcador selectivo es el gen amdS, que codifica la enzima acetamidasa que permite a las células transformadas crecer en acetamida como fuente de nitrógeno. El uso de un gen amdS de A. nidulans como marcador selectivo se describe en Kelley et al, EMBO J. 4:. 475-479 (1985) y Penttila et al, Gene 61: 155-164 (1987).

Un vector de expresión adecuado que comprende un constructo de ADN con un polinucleótido que codifica una variante puede ser cualquier vector que es capaz de replicarse de forma autónoma en un organismo huésped dado o integrarse en el ADN del huésped. En algunas realizaciones, el vector de expresión es un plásmido. En algunas formas de realización, se contemplan dos tipos de vectores de expresión para obtener la expresión de genes. El primer vector de expresión comprende secuencias de ADN en el que el promotor, la región codificadora y el terminador se originan a partir del gen para expresar. En algunas realizaciones, el truncamiento de genes se obtiene mediante la supresión de las secuencias de ADN no deseadas, por ejemplo, ADN que codifica el dominio de unión a almidón-C-terminal, para dejar que el dominio se exprese bajo el control de sus propias secuencias reguladoras de transcripción y traducción. El segundo tipo de vector de expresión se preensambla y contiene secuencias necesarias para la transcripción de alto nivel y un marcador seleccionable. En algunas realizaciones, la región codificadora para un gen o parte de este se inserta en este vector de expresión de uso general, de modo que está bajo el control transcripcional de las secuencias promotoras y de terminación del constructo de expresión. En algunas realizaciones, los genes o parte de estos se insertan corriente abajo del promotor cbh1 fuerte.

3.2. Transformación, expresión y cultivo de las células huésped

La introducción de un constructo de ADN o vector en una célula huésped incluye técnicas tales como la transformación; electroporación; microinyección nuclear; transducción; transfección, por ejemplo, transfección mediada por lipoinfección y mediada por DEAE-Dextrina; incubación con precipitado de ADN con fosfato de calcio; bombardeo de alta velocidad con microproyectiles recubiertos de ADN; y fusión de protoplastos. Las técnicas de transformación general son conocidas en la materia. Ver, por ejemplo, Ausubel et al. (1987), supra, capítulo 9; Sambrook et al. (2001), supra; y Campbell et al., Curr. Gineta. 16: 53-56 (1989). La expresión de la proteína heteróloga en Trichoderma se describe, por ejemplo, en la Patente U.S. N.º 6.022.725; Patente U.S. N.º 6.268.328; Harkki et al., Enzyme Microb. Technol. 13: 227-233 (1991); Harkki et al., Biotechnol. 7: 596-603 (1989); EP 244.234; y EP 215,594. En una forma de realización, los transformantes genéticamente estables se construyen con sistemas

de vectores mediante el cual el ácido nucleico que codifica una variante está integrado de manera estable en un cromosoma de la célula huésped. Los transformantes se purifican luego mediante técnicas conocidas.

En un ejemplo no limitante, los transformantes estables, que incluyen un marcador de amdS se distinguen de los transformantes inestables por su velocidad de crecimiento más rápida y la formación de colonias circulares con un contorno regular más que irregular en medio de cultivo sólido que contiene acetamida. Además, en algunos casos, se lleva a cabo una prueba adicional de la estabilidad mediante el cultivo de los transformantes en un medio no selectivo sólido, por ejemplo, un medio que carece de acetamida, recolección de las esporas de este medio de cultivo y la determinación del porcentaje de estas esporas que posteriormente germinarán y crecerán en medio selectivo que contiene acetamida. Se pueden usar otros métodos conocidos en la técnica para seleccionar transformantes.

3.3. Identificación de la actividad

Para evaluar la expresión de una variante en una célula huésped, los ensayos pueden medir la proteína expresada, ARNm correspondiente, o la actividad •-amilasa. Por ejemplo, los ensayos apropiados incluyen transferencia Northern y Southern, RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa), y la hibridación in situ, utilizando una sonda de hibridación marcada apropiadamente. Los ensayos adecuados también incluyen actividad de medición en una muestra. Los ensayos adecuados de la exo-actividad de la variante incluyen, pero sin limitación, el ensayo Betamyl® (Megazyme, Irlanda). Los ensayos adecuados de la endo-actividad de la variante incluyen, pero sin limitación, el ensayo de azul Phadebas (Pharmacia y Upjohn Diagnostics AB). Los ensayos también incluyen el análisis de HPLC de licuefactos preparado en presencia de la variante. Se puede usar HPLC para medir la actividad de la amilasa mediante la separación de los sacáridos DP-3 y DP-4 de otros componentes del ensayo.

Propiedades de manipulación mejoradas

Las variantes de polipéptidos descriptas en la presente con preferencia, con preferencia propiedades de horneado mejoradas. Por lo tanto, las variantes de polipéptidos tienen propiedades mejoradas cuando se compara con la SEQ ID NO:1, tales como una o más de termoestabilidad mejorada, estabilidad al pH mejorada, o exo-especificidad mejorada. Las variantes de polipéptidos descriptas en la presente con preferencia también tienen mejores propiedades de manipulación, de modo que un producto alimenticio tratado con una variante de polipéptido tiene una o todas de firmeza inferior, elasticidad mayor, cohesión mayor, friabilidad inferior o mayor capacidad de plegado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con la SEQ ID NO: 1.

Sin desear estar ligado a ninguna teoría en particular, se considera que las mutaciones en las posiciones particulares tienen efectos individuales y acumulados sobre las propiedades de un polipéptido que comprende dichas mutaciones.

Termoestabilidad y estabilidad al pH

Con preferencia, la variante de polipéptido es termoestable; con preferencia, tiene mayor termoestabilidad que la SEQ ID NO: 1.

En el trigo y otros cereales las cadenas laterales externas de amilopectina están en el rango de 12-19 DP. Por lo tanto, la hidrólisis enzimática de las cadenas laterales de amilopectina, por ejemplo, mediante variantes de polipéptidos descriptos que tienes actividad de exoamilasa no maltogénica, puede reducir marcadamente sus tendencias de cristalización.

El almidón en el trigo y otros cereales que se utilizan para fines de horneado está presente en la forma de gránulos de almidón que generalmente son resistentes al ataque enzimático por las amilasas. Por lo tanto la modificación del almidón se limita principalmente al almidón dañado y progresa muy lentamente durante la elaboración de la masa y horneado inicial hasta que la gelatinización comienza a aproximadamente 60ºC. Como consecuencia de esto solamente las amilasas con un alto grado de termoestabilidad son capaces de modificar el almidón de manera eficiente durante el horneado. Y, en general la eficiencia de amilasas se incrementa con el aumento de la termoestabilidad. Esto es así porque cuanto más termoestable es la enzima puede estar activa más tiempo durante el horneado y por lo tanto proporcionará más efecto antienvejecimiento.

Por consiguiente, el uso de polipéptidos variantes como se describe en la presente cuando se añade al almidón en cualquier etapa de su procesamiento en un producto alimenticio, por ejemplo, antes, durante o después del horneado en pan puede retardar o impedir o lentificar la retrogradación. Tal uso se describe con más detalle a continuación.

Como se usa en la presente, el término "termoestable" se refiere a la capacidad de la enzima para conservar la actividad después de la exposición a temperaturas elevadas. Con preferencia, la variante de polipéptido es capaz de degradar almidón a temperaturas de aproximadamente 55ºC a aproximadamente 80ºC o más. Convenientemente, la enzima conserva su actividad después de la exposición a temperaturas de hasta aproximadamente 95ºC.

La termoestabilidad de una enzima tal como una exoamilasa no maltogénica se mide por su vida media. En consecuencia, las variantes de polipéptidos descriptas en la presente tienen vidas medias extendidas con respecto a la enzima original con preferencia en 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más, con preferencia a temperaturas elevadas de 55ºC a aproximadamente 95ºC o más, con preferencia a aproximadamente 80ºC.

Como se usa en la presente, la vida media (t1/2) es el tiempo (en minutos) durante el cual se inactiva la mitad de la actividad de la enzima en condiciones de calor definidas. En formas de realización preferidas, la vida media se ensaya a 80 grados C, con preferencia; la muestra se calienta durante 1-10 minutos a 80ºC o superior. El valor de la vida media luego se calcula mediante la medición de la actividad de la amilasa residual, por cualquiera de los métodos descriptos en la presente. Con preferencia, se lleva a cabo un ensayo de la vida media como se describe en más detalle en los Ejemplos.

Con preferencia, las variantes de polipéptidos descriptas en la presente son activas durante el horneado e hidrolizan el almidón durante y después de la gelatinización de los gránulos de almidón que empieza a temperaturas de aproximadamente 55 grados C. Cuanto más termoestable es la exoamilasa no maltogénica más tiempo puede ser activa y por lo tanto proporcionará más efecto antienvejecimiento. Sin embargo, durante el horneado a temperaturas por encima de aproximadamente 85 grados C, se puede producir la inactivación de la enzima. Si esto sucede, la exoamilasa no maltogénica se puede inactivar gradualmente de modo que no hay sustancialmente actividad después del proceso de horneado en el pan final. Por lo tanto, con preferencia, las exoamilasas no malogénicas adecuadas para su uso como se ha descrito tienen una temperatura óptima por encima de 50 grados C y por debajo de 98 grados C.

La termoestabilidad de las variantes de polipéptidos descriptas en la presente se pueden mejorar mediante el uso de manipulación genética de proteínas para ser más termoestable y por lo tanto más adecuadas para los usos descritos en la presente; por lo tanto está abarcado el uso de variantes de polipéptidos modificadas para ser más termoestables mediante la manipulación genética de proteínas.

Con preferencia, la variante de polipéptido es estable al pH; con más preferencia, tiene una mayor estabilidad al pH que la SEQ ID NO: 1. Como se usa en la presente el término "estable al pH" se refiere a la capacidad de la enzima para conservar la actividad en un amplio rango de pH. Con preferencia, la variante de polipéptido es capaz de degradar el almidón a un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 10,5. En una forma de realización, el grado de estabilidad del pH se puede ensayar midiendo la vida media de la enzima en condiciones de pH específicas. En otra forma de realización, el grado de estabilidad al pH se puede ensayar midiendo la actividad o la actividad específica de la enzima en condiciones de pH específicas. Las condiciones de pH específicos pueden ser cualquier pH desde pH 5 a pH 10,5.

En consecuencia, la variante de polipéptido puede tener una vida media más larga o una actividad más alta (de acuerdo con el ensayo) cuando se compara con la SEQ ID NO: 1 en condiciones idénticas. Las variantes de polipéptidos pueden tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o vida media más larga en comparación con la SEQ ID NO: 1 en condiciones de pH idénticas. De forma alternativa o adicional pueden tener mayor actividad cuando se compara con la SEQ ID NO:1 en condiciones de pH idénticas.

Exoespecificidad

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 posiblemente puede afectar negativamente a la calidad del producto de pan final mediante la producción de una miga pegajosa o gomosa debido a la acumulación de dextrinas ramificadas.

La exoespecificidad se puede medir útilmente mediante la determinación de la relación de actividad de amilasa total a actividad de endo-amilasa total. Esta relación se denomina en este documento como un "Índice de exoespecificidad". En formas de realización preferidas, una enzima se considera una exoamilasa si tiene un índice de exoespecificidad de 20 o más. Es decir, su actividad de amilasa total (que incluye la actividad de exo-amilasa) es 20 veces o más grande que su actividad de endoamilasa. En formas de realización muy preferidas, el índice de exoespecificidad de las exoamilasas es 30 o más, 40 o más, 50 o más, 60 o más, 70 o más, 80 o más, 90 o más, o 100 o más. En formas de realización muy preferidas, el índice de exoespecificidad es 150 o más, 200 o más, 300 o más, 400 o más, 500 o más o 600 o más.

La actividad de la amilasa total y la actividad de endoamilasa se pueden medir por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la actividad total de amilasa se puede medir mediante el ensayo el número total de extremos reductores liberados de un sustrato de almidón. Alternativamente, el uso de un ensayo de Betamyl se describe con más detalle en los ejemplos, y por conveniencia, la actividad amilasa analizada en los Ejemplos se describe en términos de "unidades de Betamyl" en las Tablas.

La actividad de endoamilasa se puede analizar mediante el uso de un kit de Phadebas (Pharmacia y Upjohn). Este emplea un almidón reticulado marcado con azul (marcado con un colorante azoico); sólo cortes internos de la molécula de almidón liberan la marca, mientras que los cortes externos no lo hacen. La liberación de colorante se

puede medir por espectrofotometría. En consecuencia, el kit Phadebas mide la actividad de endoamilasa, y por conveniencia, los resultados de tal ensayo se denominan en este documento como "unidades Phadebas".

En una forma de realización muy preferida, en consecuencia el índice de exoespecificidad se expresa en términos de unidades Betamil /unidades Phadebas, también denominadas como "B/Phad".

La exoespecificidad también se puede analizar de acuerdo con los métodos descriptos en la técnica anterior, por ejemplo, en nuestra Publicación de patente Internacional número WO99/50399. Esto mide exoespecificidad por medio de una relación entre la actividad endoamilasa a la actividad exoamilasa. Por lo tanto, en un aspecto preferido, la variante de polipéptido descripta en la presente tendrá menos de 0,5 unidades de endoamilasa (EAU) por unidad de actividad exoamilasa. Con preferencia, las exoamilasas no maltogénicas que son adecuadas para uso de acuerdo con la presente invención tienen menos de 0,05 EAU por unidad de actividad exoamilasa y con más preferencia menos de 0,01 EAU por unidad de actividad exoamilasa.

La variante de polipéptido descripta en la presente con preferencia tendrá exoespecificidad, por ejemplo, medida por los índices de exoespecificidad, descriptos anteriormente, en forma compatible con las exoamilasas. Además, con preferencia tiene o mayor o aumento de exoespecificidad cuando se compara con la SEQ ID NO:1. En consecuencia, por ejemplo, la variante de polipéptido puede tener 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o mayor índice de exoespecificidad cuando se compara con la SEQ ID NO:1, con preferencia en condiciones idénticas. Pueden tener 1,5x o superior, 2x o superior, 5 x o superior, 10 x o superior, 50 x o superior, 100 x o superior, cuando se compara con la SEQ ID NO:1, con preferencia en condiciones idénticas.

3.4. Métodos para purificar variantes

En general, una variante producida en cultivo celular es secretada en el medio y puede ser purificado o aislado, por ejemplo, mediante la eliminación de componentes no deseados del medio de cultivo celular. En algunos casos, una variante se puede recuperar a partir de un lisado celular. En tales casos, la enzima se purifica a partir de las células en las que se produjo usando técnicas de rutina empleados por los expertos en la técnica. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cromatografía de afinidad, métodos cromatográficos de intercambio de iones, que incluyen intercambio iónico de alta resolución, cromatografía de interacción hidrofóbica, partición de dos fases, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o una resina de intercambio catiónica tal como DEAE, cromatoenfoque, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

4. Composiciones y usos de variantes

Una variante de polipéptido producido y purificado por los métodos descritos anteriormente es útil para una variedad de aplicaciones industriales. En una forma de realización, la variante de polipéptido definida en la presente es útil en un proceso de conversión de almidón, particularmente en un proceso de licuefacción de un almidón, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo o almidón de cebada. El producto final deseado puede ser cualquier producto que puede ser producido por la conversión enzimática del sustrato de almidón. Por ejemplo, el producto deseado puede ser un jarabe rico en sacáridos útiles para la fermentación, en particular maltotriosa, glucosa y/o maltosa. El producto final luego se puede utilizar directamente en un proceso de fermentación para producir alcohol para combustible o potable (es decir, alcohol potable). El experto en la materia es consciente de las diversas condiciones de fermentación que se pueden usar en la producción de etanol u otros productos finales de fermentación. Un organismo microbiano capaz de fermentar maltotriosas y/o azúcares menos complejos, tales como S. cerevisiae o una variante modificada genéticamente de esta es particularmente útil. Las variantes alteradas genéticamente adecuadas de S. cerevisiae particularmente útiles para la fermentación maltotriosas incluyen variantes que expresan AGT1 permeasa (Stambuck et al., Lett. Appl. Microbiol. 43: 370-76 (2006)), MTT1 y MTT1alt (Dietvorst et al., Yeast 22: 775-88 (2005)), o MAL32 (Dietvorst et al., Yeast 24: 27-38 (2007)). Las presentes variantes de polipéptidos también son útiles en composiciones y métodos de preparación de los alimentos, cuando se desean, enzimas que expresan actividad de la amilasa a altas temperaturas.

La conveniencia de utilizar una variante de polipéptido particular dependerá de las propiedades generales mostradas por la variante de polipéptido con respecto a los requerimientos de una aplicación particular. Como cuestión general, las variantes de polipéptido útiles para un proceso de conversión de almidón tienen actividad de endo-amilasa sustancial en comparación con PS4 de tipo salvaje o SEQ ID NO: 1, y/o tienen una actividad exo a endo-amilasa inferior en comparación con PS4 tipo salvaje o SEQ ID NO: 1. Tales variantes de polipéptidos pueden ser particularmente útiles en un proceso de licuefacción, cuando se usa solo o en combinación con otras variantes de amilasa, en donde la escisión interna de los sacáridos de ramificación complejos reduce la viscosidad del sustrato. Se espera que algunas variantes de polipéptidos útiles para la licuefacción, sin embargo, tengan una actividad de endo-amilasa comparable o incluso menores que PS4 tipo salvaje. Las variantes de polipéptidos útiles incluyen los que tienen más o menos la actividad exo-amilasa del polipéptido de PS4 de tipo salvaje o la SEQ ID NO: 1, de acuerdo con la aplicación. Las composiciones pueden incluir uno o una combinación de variantes de amilasa, cada una de los cuales puede mostrar un conjunto diferente de propiedades.

4.1. Preparación de los sustratos de almidón

Los expertos en la técnica son muy conscientes de los métodos disponibles que se pueden usar para preparar sustratos de almidón para su uso en los procesos descriptos en la presente. Por ejemplo, un sustrato de almidón útil se puede obtener de tubérculos, raíces, tallos, leguminosas, cereales o grano entero. Más específicamente, el almidón granular viene de las plantas que producen altas cantidades de almidón. Por ejemplo, el almidón granular se puede obtener a partir de maíces, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, arvejas, porotos, bananas o papas. El maíz contiene aproximadamente 60 a 68% de almidón; la cebada contiene aproximadamente 55-65% de almidón; el mijo contiene aproximadamente de 75 a 80% de almidón; el trigo contiene aproximadamente 60 a 65% de almidón; y el arroz pulido contiene almidón de 70-72%. Los sustratos de almidón específicamente contemplados son almidón de maíz, almidón de trigo y almidón de cebada. El almidón de un grano puede estar molido o entero e incluye sólidos de maíz, tales como granos, salvado y/o mazorcas. El almidón puede ser almidón altamente refinado en bruto o materia prima a partir de procesos de la refinería de almidón. Diversos almidones también están disponibles en el comercio. Por ejemplo, el almidón de maíz está disponible en Cerestar, Sigma, y Katayama Chemical Industry Co. (Japón); almidón de trigo está disponible de Sigma; almidón de batata está disponible en Wako Pure Chemical Industry Co. (Japón); y almidón de papa está disponible en Nakaari Química Pharmaceutical Co. (Japón).

Las maltodextrinas son útiles como sustratos de almidón en las formas de realización de la presente invención. Las maltodextrinas comprenden productos de hidrólisis del almidón que tienen aproximadamente 20 o menos unidades de dextrosa (glucosa). Las maltodextrinas comerciales típicas contienen mezclas de polisacáridos que incluyen de aproximadamente tres a aproximadamente diecinueve unidades de dextrosa ligadas. Las maltodextrinas son definidas por la FDA como productos que tienen una equivalencia de dextrosa (DE) de menos de 20. Por lo general, se reconocen como ingredientes de alimentos (GRAS) seguros para el consumo humano. La equivalencia de dextrosa (DE) es una medición de energía reductora en comparación con un estándar de dextrosa (glucosa) de 100. Cuanto mayor es la DE, mayor es el grado de despolimerización del almidón, lo que produce un tamaño de polímero promedio menor (polisacárido), y mayor la dulzura. Una maltodextrina particularmente útil se MALTRIN® M040 obtenida a partir de almidón de maíz, disponible de Grain Processing Corp. (Muscatine, Iowa): DE 4.0-7.0; densidad aparente de 0,51 g/cc; contenido de agua medido al 6,38% en peso.

El sustrato de almidón puede ser un almidón crudo de grano entero molido, que contiene fracciones no de almidón, por ejemplo, residuos de germen y fibras. La molienda puede comprender molienda húmeda o molienda en seco. En la molienda en húmedo, el grano entero se sumerge en agua o ácido diluido para separar el grano en sus partes componentes, fibras, por ejemplo, almidón, proteínas, germen, aceite, fibras de grano. La molienda en húmedo separa de manera eficiente el germen y la harina (es decir, gránulos de almidón y proteína) y es especialmente adecuado para la producción de jarabes. En la molienda en seco, los granos enteros se muelen en un polvo fino y se procesan sin fraccionar el grano en sus partes componentes. El grano molido en seco de este modo comprenderá cantidades significativas de compuestos de carbohidratos no amiláceos, además de almidón. La mayor parte de etanol proviene de la molienda en seco. Alternativamente, el almidón para procesar puede ser una calidad de almidón altamente refinado, por ejemplo, al menos aproximadamente 90%, al menos 95%, al menos 97%, o al menos 99,5% de pureza.

4.2. Sacarificación, gelatinización y licuefacción del almidón

Como se usa en la presente, el término "licuefacción" o "licuar" significa un proceso mediante el cual el almidón se convierte en dextrinas de cadena más cortas y menos viscosas. Este proceso implica la gelatinización del almidón de manera simultánea con o seguida de la adición de una variante de polipéptido descripto en la presente. Una variante de polipéptido termoestable descripta en la presente con preferencia se usa para esta aplicación. Se puede añadir opcionalmente enzimas inductoras de licuefacción adicionales.

En algunas formas de realización, el sustrato de almidón o maltodextrina preparada como se describió anteriormente se suspende con agua. La suspensión almidón o maltodextrina puede contener almidón como un por ciento en peso de sólidos secos de aproximadamente 10-55%, aproximadamente 20-45%, aproximadamente 30-45%, aproximadamente 30-40%, o, de modo opcional, aproximadamente 30-35%. Las •-amilasas, por ejemplo, alfa-amilasas bacterianas que incluyen alfa-amilasas de Bacillus, usualmente se suministran, por ejemplo, en aproximadamente 1500 unidades por kg de materia seca de almidón. Para optimizar estabilidad y actividad de •-amilasa, el pH de la suspensión se puede ajustar al pH óptimo para la variante de polipéptido usada. Se pueden añadir otras •-amilasas y pueden requerir diferentes condiciones óptimas. La •-amilasa bacteriana restante en la suspensión después de la licuefacción se puede desactivar mediante la reducción de pH en una etapa de reacción subsiguiente o mediante la eliminación de calcio de la suspensión.

La suspensión de almidón más la variante de polipéptido se pueden bombear de forma continua a través de un cocedor de chorro, que es calentado por vapor de aproximadamente 85ºC hasta 105ºC. La gelatinización se produce muy rápidamente en estas condiciones, y la actividad enzimática, combinada con las fuerzas de cizallamiento importantes, comienza la hidrólisis del sustrato de almidón. El tiempo de permanencia en el cocedor de chorro es muy breve. El almidón parcialmente gelatinizado se puede pasar en una serie de tubos de retención mantenidos a aproximadamente 85 a 105ºC y se mantuvo durante aproximadamente 5 min. para completar el proceso de

gelatinización. Estos tanques pueden contener deflectores para desalentar la retromezcla. Como se usa en la presente, la expresión "licuefacción secundaria" se refiere la etapa de licuefacción posterior a la licuefacción primaria, cuando la suspensión se deja enfriar a temperatura ambiente. Esta etapa de enfriamiento puede ser de aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 180 minutos, por ejemplo, unos 90 minutos a 120 minutos.

Una variante del polipéptido definida en la presente se puede añadir al almidón licuado obtenido por el procedimiento anterior o a una suspensión maltodextrina en aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,0 kg/MTDS. 1 kg/MTDS = 0,1% en peso de sólidos disueltos. En una forma de realización, un polipéptido definido en la presente se puede añadir a una suspensión de almidón o maltodextrina licuada a un nivel de tratamiento en un rango de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 0,01% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. En una forma de realización típica, un polipéptido definido en la presente se puede añadir a una suspensión de almidón o maltodextrina licuada a un nivel de tratamiento en un rango de aproximadamente 0,0025% en peso a aproximadamente 0,01% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. En una forma de realización, el polipéptido definido en la presente se inmoviliza, y el sustrato de almidón o maltodextrina licuado se hace pasar sobre el polipéptido inmovilizado definido en la presente y se convierte en n el producto en una reacción continua. En esta forma de realización, el polipéptido definido en la presente se puede inmovilizar con enzimas adicionales, tales como un pullulanasa.

La producción de maltotetraosa puede comprender además poner en contacto el almidón licuado u otra fuente de maltodextrinas con un isoamilasa, una proteasa, una celulasa, una hemicelulasa, una lipasa, una cutinasa, o cualquier combinación de estas.

También se proporciona un método de obtener de preparar un jarabe de sacárido (por ejemplo, maltotetraosa), que comprende añadir una variante del polipéptido definida en la presente o una composición que comprende la variante en un licuefacto de almidón y sacarificar el licuefacto de almidón para formar el jarabe de sacárido. La variante del polipéptido definida en la presente se puede añadir al licuefacto de almidón en un rango de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 0,1% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. En una forma de realización, la variante se añade al licuefacto de almidón en un rango de aproximadamente 0,0025% en peso a aproximadamente 0,01% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. Las unidades de concentración también se expresan en la presente como kg de variante del polipéptido por tonelada métrica de sólidos secos (MTDS), donde 1 kg/MTDS = 0,1% en peso de sólidos disueltos. La solución de almidón licuado puede ser una suspensión de almidón licuado a aproximadamente 20-35% p/p sólidos secos. El almidón puede obtener a partir de maíces, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, arvejas, porotos, bananas o papas. El licuefacto de almidón se puede sacarificar a aproximadamente 55ºC a aproximadamente 65ºC tal como aproximadamente 60°C a aproximadamente 65ºC. El licuefacto de almidón se puede sacarificar a aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 7,0. Una pululanasa, isoamilasa, pululanasa, proteasa, celulasa, hemicelulasa, lipasa, cutinasa, o cualquier combinación de estas, se puede añadir con la variante del polipéptido al licuefacto de almidón. En una forma de realización, el jarabe de sacárido se puede fermentar para producir etanol. El jarabe de sacárido producido por el método puede comprender al menos aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, o aproximadamente 60% en peso de maltotetraosa sobre la base del contenido de sacáridos total.

En otro aspecto se proporciona un método de preparar un jarabe de sacárido, que incluye la adición de una variante del polipéptido definida en la presente y una alfa-amilasa al almidón granular y la hidrólisis del almidón granular para formar el jarabe de sacárido. En una forma de realización, el licuefacto de almidón granular se produce mediante una alfa-amilasa. En una forma de realización, el licuefacto de almidón granular es un licuefacto producida ácido. En una forma de realización la variante del polipéptido definida en la presente se añade al almidón granular en un rango de aproximadamente 0,001% en peso a aproximadamente 0,1% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. En otra forma de realización la variante del polipéptido definida en la presente se añade al almidón granular en un rango de aproximadamente 0,0025% en peso a aproximadamente 0,01% en peso sobre la base de los sólidos disueltos. El almidón granular se puede obtener almidón de maíces, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, arvejas, porotos, bananas o papas.

En una forma de realización particular el almidón granular se sacarifica a 55°C a 65°C tal como 60°C a 65°C. En otra forma de realización el almidón granular se sacarifica a pH 5,0 a pH 7,0. Se prevé que el método también puede incluir la fermentación del jarabe de sacárido para producir etanol.

En una forma de realización el método incluye una etapa de adición de una enzima que tiene actividad de desramificación en el almidón granular. La enzima que tiene actividad de desramificación puede incluir pero sin limitación una isoamilasa, una pululanasa, una isopululanasa, una neopululanasa o cualquiera de sus combinaciones. Tambié se prevé que el método puede incluir opcionalmente una etapa adicional de adición de una proteasa, una celulasa, una hemicelulasa, una lipasa, una cutinasa, una pectato liasa o cualquiera de sus combinaciones al almidón granular.

En una forma de realización el jarabe de sacárido incluye al menos 35% en peso de maltotetraosa sobre la base del contenido de sacáridos total. De modo alternativo, el jarabe de sacárido incluye al menos 45% en peso de maltotetraosa sobre la base del contenido de sacáridos total. En otra forma de realización el jarabe de sacárido

incluye al menos 50% en peso de maltotetraosa sobre la base del contenido de sacáridos total. En una forma de realización adicional el jarabe de sacárido incluye de 45% en peso a 60% en peso de maltotetraosa sobre la base del contenido de sacáridos total.

Se prevé que la variante del polipéptido definida en la presente del método puede esta inmovilizada.

En otro aspecto se proporciona un método para obtener IMO, que incluye la adición de a) una variante del polipéptido definida en la presente, b) una alfa-amilasa, y c) una transglucosidasa para el almidón en la forma de un licuefacto de almidón o almidón granular y sacarificar el almidón para formar IMO. Se prevé que el IMO se puede formar en un número IMO de al menos 30, al menos 40 y/o al menos 45. En una forma de realización el almidón se obtiene de maíces, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, arvejas, porotos, bananas o papas.

En otro aspecto se proporciona un método para obtener IMO, que incluye la adición de a) una variante del polipéptido, b) una alfa-amilasa, y c) una transglucosidasa al almidón en la forma de un licuefacto de almidón o almidón granular y sacarificar el almidón para formar IMO. Se puede usar cualquier número de enzimas de transgucosidasa (TG), por ejemplo, TRANSGLUCOSIDASE L-500® (Danisco US Inc., Genencor Division).

Se prevé que el IMO se puede formar en un número de IMO de al menos 30, al menos 40 y/o al menos 45. En una forma de realización el almidón se obtiene de maíces, mazorcas, trigo, cebada, centeno, mijo, sagú, mandioca, tapioca, sorgo, arroz, arvejas, porotos, bananas o papas.

4.3. Proceses de fermentación

La levadura típicamente de Saccharomyces spp. se añade a la masa y la fermentación continúa durante 24-96 horas, tal como típicamente 35 a 60 horas. La temperatura es de entre aproximadamente 26-34ºC, típicamente a aproximadamente 32ºC, y el pH es de aproximadamente pH 3-6, por lo general alrededor de un pH de aproximadamente 4-5.

En una forma de realización, un proceso de fermentación por lotes se utiliza en un sistema cerrado, en donde la composición del medio se fija al comienzo de la fermentación y no se altera durante la fermentación. Al comienzo de la fermentación, el medio se inocula con el organismo microbiano deseado. En este método, se permite que la fermentación se produzca sin la adición de ningún componente al sistema. Típicamente, una fermentación por lotes califica como un "lote" con respecto a la adición de la fuente de carbono, y a menudo se realizan intentos para controlar factores tales como el pH y la concentración de oxígeno. Las composiciones de metabolitos y biomasa del sistema por lote cambian constantemente hasta el momento que se detiene la fermentación. Dentro de los cultivos por lote, las células progresan a través de una fase de latencia estática a una fase logarítmica de crecimiento alto y finalmente a una fase estacionaria, donde la tasa de crecimiento disminuye o se detiene. Si no se trata, las células en la fase estacionaria finalmente mueren. En general, las células en fase logarítmica son responsables de la masa de producción del producto.

Una variación adecuada en el sistema por lote estándar es el sistema de fermentación "alimentado por lotes". En esta variación de un sistema por lote típico, el sustrato se añade en incrementos a medida que progresa la fermentación. Los sistemas de alimentación por lotes son útiles cuando la represión de catabolitos probablemente inhibe el metabolismo de las células y cuando es conveniente tener cantidades limitadas de sustrato en el medio. La medición de la concentración de sustrato real en los sistemas alimentado por lotes es difícil y por lo tanto se estima sobre la base de los cambios de factores medibles, tales como pH, oxígeno disuelto y la presión parcial de gases residuales, tales como CO_2. Las fermentaciones por lotes y alimentados por lotes son bien conocidas en la técnica.

La fermentación continua es un sistema abierto en el que se añade un medio de fermentación definido continuamente a un biorreactor y una cantidad igual de medio acondicionado se elimina simultáneamente durante el procesamiento. La fermentación continua mantiene generalmente los cultivos a una alta densidad constante, donde las células están principalmente en crecimiento en fase logarítmica. La fermentación continua permite la modulación de uno o más factores que afectan el crecimiento celular y/o la concentración de producto. Por ejemplo, en una forma de realización, un nutriente limitante, tal como la fuente de carbono o fuente de nitrógeno, se mantiene a una tasa fija y se permiten moderar todos los otros parámetros, en otros sistemas, un número de factores que afectan al crecimiento se puede alterar continuamente mientras que la concentración celular, medida por la turbidez media, se mantiene constante. Los sistemas continuos se esfuerzan por mantener condiciones de crecimiento de estado estacionario. Por lo tanto, la pérdida de células debido al medio que se extrae se debe equilibrar con la tasa de crecimiento celular en la fermentación. Los métodos de modulación de nutrientes y factores de crecimiento para los procesos de fermentación continuos, así como técnicas para maximizar la tasa de formación de producto, son bien conocidos en la técnica de la microbiología industrial.

Después de la fermentación, la mezcla se destila para extraer el etanol. El etanol obtenido de acuerdo con el proceso de la descripción se puede usar como, por ejemplo, etanol combustible; etanol para bebida, es decir, alcohol neutro potable o etanol industrial. El sobrante de la fermentación es el grano, que normalmente se utiliza para la alimentación animal, ya sea en forma líquida o seca. Los detalles adicionales sobre cómo llevar a cabo la licuefacción, sacarificación, fermentación, destilación, y recuperación de etanol son bien conocidos por los expertos.

De acuerdo con el procedimiento de la invención, la sacarificación y la fermentación se pueden llevar a cabo simultáneamente o por separado.

5. Composiciones y métodos para la preparación de panadería y alimentos

En un aspecto, las composiciones, que incluyen aditivos, productos alimenticios, productos de panadería, composiciones mejoradoras, productos de alimentación, que incluyen alimentos para animales, etc. que comprenden tales variantes alteradas que se describen en el presente, tales como las que tienen actividad exoamilasa no maltogénica, así como los métodos de obtener y usar tales polipéptidos y se proporcionan las composiciones.

Como se señaló anteriormente, las variantes de polipéptidos descriptas anteriormente pueden comprender una o más propiedades de manipulación mejoradas, con preferencia propiedades de horneado mejoradas. Por lo tanto, las variantes de polipéptidos descriptas anteriormente pueden proporcionar productos alimenticios así tratados tienen una o más de (con preferencia todas de) una firmeza inferior, una elasticidad superior, una cohesión superior, una friabilidad inferior o mayor capacidad de plegado. Tales propiedades de manipulación u horneado mejoradas exhibidas por los polipéptidos variantes se describen con más detalle a continuación. En un aspecto, se proporciona una variante, en la que la vida media ($t_{1/2}$), con preferencia a 60 grados C, aumenta en 15% o más, con preferencia 50% o más, con máxima preferencia 100% o más, en comparación con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente, en la que un producto tratado con la variante tiene una o más, con preferencia todas las siguientes propiedades: (a) firmeza inferior; (b) elasticidad superior; (c) cohesión superior; (d) friabilidad inferior; y (e) mayor capacidad de plegado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente, en la que la elasticidad. cohesión o capacidad de plegado del producto alimenticio aumenta de modo independiente en 15% o más, con preferencia 50% o más, con máxima preferencia 100% o más, en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente, en la que cada una de elasticidad. cohesión y capacidad de plegado de un producto alimenticio tratado con la variante está aumentada en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente, en la que la firmeza o la friabilidad del producto alimenticio disminuye de modo independiente en 15% o más, con preferencia 50% o más, con máxima preferencia 100% o más, con respecto a un producto alimenticio se ha tratado con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente, en que cada una firmeza y friabilidad de un producto alimenticio tratado con el polipéptido está disminuida en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1,

En un aspecto, se proporciona una variante, como se describe en la presente que comprende un fragmento de al menos 20 residuos de un polipéptido como se expone en las reivindicaciones, en que el polipéptido tiene actividad de exoamilasa no maltogénica.

En un aspecto, una variante, como se describe en la presente tiene actividad de exoamilasa no maltogénica. Tal actividad se puede determinar mediante los métodos descriptos en US 6.667.065.

En un aspecto, el tratamiento de los productos alimenticios, en particular masas y productos de panadería con tales polipéptidos, y de modo que los productos alimenticios exhiben las cualidades deseadas expuestas anteriormente.

En un aspecto, se proporciona un proceso para tratar un almidón que comprende poner en contacto el almidón con una variante, como se describe en la presente y permitir que el polipéptido genere a partir del almidón uno o más productos lineales. En un aspecto, se proporciona el uso de una variante, como se describe en la presente para preparar un producto alimenticio o alimento para animales. En un aspecto, se proporciona un proceso para preparar un producto alimenticio o alimento para animales que comprende mezclar una variante, como se describe en la presente con un ingrediente para alimentos o alimentos para animales. En un aspecto, se proporciona el uso o un proceso, en que el producto alimenticio comprende una masa o producto de masa, con preferencia un producto de masa procesado. En un aspecto, se proporciona el uso o un proceso, en que el producto alimenticio es un producto de panadería. En un aspecto, se proporciona un proceso para obtener un producto de panadería que comprende: (a) proporcionar un medio de almidón; (b) añadir al medio de almidón una variante, como se describe en la presente; y (c) aplicar calor al medio de almidón durante o después de la etapa (b) para producir un producto de panadería. En un aspecto, se proporciona un producto alimenticio, producto alimenticio para animales, producto de masa o un producto de panadería obtenido por un proceso definido en las reivindicaciones.

En un aspecto, se proporciona el uso de una variante, como se describe en la presente, en un producto de masa para retardar o reducir el envejecimiento, con preferencia retrogradación perjudicial, del producto de masa.

En un aspecto, se proporciona el uso de una variante, como se describe en la presente, en un producto de masa para mejorar alguna o más de firmeza, elasticidad, cohesión, friabilidad o capacidad de plegado del producto de masa.

En un aspecto, una combinación de una variante, como se describe en la presente, junto con alguna o más de los siguientes:

(a) se proporciona alfa-amilasa maltogénica también llamada glucan 1,4-•-maltohidrolasa (EC 3.2.1.133) de Bacillus stearothermophilus, o una variante, homólogo o mutantes de esta que tiene actividad de alfa-amilasa maltogénica;

(b) una xilanasa de panadería (EC 3.2.1.8) de por ejemplo Bacillus sp., Aspergillus sp., Thermomyces sp. o Trichoderma sp.;

(c) α-amilasa (EC 3.2.1.1) de Bacillus amiloliquefaciens o de Aspergillus sp. o una variante, homólogo o mutantes de esta que tiene actividad de alfa-amilasa; y

(d) una lipasa tal como glicolipasa de Fusarium heterosporum.

Las variantes descriptas en la presente con preferencia comprenden una o más propiedades de manipulación mejoradas en comparación con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje, tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Las propiedades de manipulación mejoradas en formas de realización preferidas pueden comprender propiedades de horneado mejoradas.

En consecuencia, la variante descripta en la presente en un aspecto es tal que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene una propiedad de manipulación mejorada o con preferencia de horneado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. La propiedad de manipulación u horneado se puede seleccionar del grupo que consiste en: firmeza, elasticidad, cohesión, friabilidad y capacidad de plegado.

Estas propiedades de manipulación se pueden analizar mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la firmeza, elasticidad y cohesión se pueden determinar mediante el análisis de las rebanadas de pan por el análisis del perfil de textura usando por ejemplo un analizador de textura, como por ejemplo, se describe en el 11

Firmeza

Las variantes descriptas en la presente están en un aspecto de modo que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene firmeza inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

La firmeza en formas de realización preferidas está inversamente correlacionada con la blandura del producto alimenticio; en consecuencia, una blandura superior puede reflejar una firmeza inferior, y viceversa.

La firmeza se puede medir mediante el "Protocolo de evaluación de la firmeza" expuesto en el ejemplo 11.

En un aspecto, las variantes descriptas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene a 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más firmeza inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Un producto alimenticio tratado con Las variantes de polipéptidos descriptas en la presente pueden tener 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o más de firmeza inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

Elasticidad

En un aspecto, las variantes descriptas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene a elasticidad superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

La elasticidad se puede medir mediante el "Protocolo de evaluación de elasticidad" expuesto en 11.

En consecuencia en un aspecto, las variantes descriptas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene a 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más

de elasticidad superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido puede tener un 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o más de elasticidad superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

Cohesión

En un aspecto, las variantes descriptas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene cohesión superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

La cohesión se puede medir mediante el "Protocolo de evaluación de cohesión" expuesto en 11.

En consecuencia en un aspecto, las variantes descriptas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante del polipéptido descripta en la presente tienen un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más de cohesión superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido puede tener 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o más de cohesión superior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

Friabilidad

En un aspecto, las variantes descriptas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene friabilidad inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

La friabilidad se puede medir mediante el "Protocolo de evaluación de friabilidad" expuesto en el Ejemplo 13.

En consecuencia en un aspecto, las variantes descriptas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más de friabilidad inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido puede tener un 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o más de friabilidad inferior en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

Capacidad de plegado

En un aspecto, las variantes descriptas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene mayor capacidad de plegado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

La capacidad de plegado con preferencia se mide mediante el "Protocolo de evaluación de la capacidad de plegado" expuesto en el Ejemplo 14.

En consecuencia, las variantes descriptas en la presente son tales que un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido tiene un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200% o más de mayor capacidad de plegado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. Un producto alimenticio tratado con la variante de polipéptido puede tener un 1,1x, 1,5x, 2x, 3x, 4x, 5x, 6x, 7x, 8x, 9x, 10x o más de mayor capacidad de plegado en comparación con un producto alimenticio que se ha tratado con un polipéptido original o un polipéptido tipo salvaje tal como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1.

En un aspecto, se proporciona el uso de las variantes de polipéptidos descriptas en la presente en combinación con una xilanasa para mejorar la capacidad de plegado.

Además, se proporciona un método para preparar un producto alimenticio, el método que comprende: (a) obtener una exoamilasa no maltogénica; (b) introducir una mutación en cualquiera o varias de las posiciones de la

exoamilasa no maltogénica como se establece en este documento; (c) mezclar el polipéptido resultante con un ingrediente alimenticio.

Las variantes de polipéptidos se pueden usar para mejorar el volumen de productos de panadería tales como pan. Sin desear estar ligado por teoría particular alguna, se considera que esto proviene de la reducción de la viscosidad de la masa durante el calentamiento (tal como el horneado) como resultado de la amilasa que acorta las moléculas de amilosa. Esto permite que el dióxido de carbono generado por la fermentación para aumentar el tamaño del pan con menos impedimentos.

En consecuencia, los productos alimenticios que comprenden o tratar con las variantes de polipéptidos se expanden en volumen cuando se compara con productos que no se han tratado de este modo, o tratado con los polipéptidos originales tales como un polipéptido de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8 o 10, con preferencia SEQ ID NO: 1. En otras palabras, los productos alimenticios tienen un volumen más grande aire por volumen del producto alimenticio. Alternativamente, o además, los productos alimenticios tratados con variantes de polipéptidos como se describe en la presente tienen una densidad más baja, o el peso (o masa) por relación de volumen. En formas de realización particularmente preferidas, las variantes de polipéptidos se utilizan para mejorar el volumen de pan. La mejora o expansión de volumen es beneficiosa porque reduce la gomosidad o el contenido de almidón de los alimentos. Los alimentos livianos son los preferidos por los consumidores, y la experiencia del cliente está aumentada. En formas de realización preferidas, el uso de las variantes de polipéptidos aumenta el volumen en un 10%, 20%, 30% 40%, 50% o más.

Las variantes de polipéptidos y ácidos nucleicos descriptos en la presente se pueden usar como -o en la preparación de- un alimento. En particular, se pueden añadir a un alimento, es decir, como un aditivo alimentario. Se considera que el término "alimento" incluye tanto el alimento preparado, así como un ingrediente para un alimento, tal como una harina. En un aspecto preferido, el alimento es para el consumo humano. El alimento puede estar en la forma de una solución o como un sólido – de acuerdo con el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Las variantes de polipéptidos y ácidos nucleicos se pueden usar como un ingrediente alimentario. Como se usa en la presente, el término "ingrediente alimentario" incluye una formulación, que es o se puede añadir a los alimentos funcionales o comestibles e incluye formulaciones que se pueden usar a niveles bajos en una amplia variedad de productos que requieren, por ejemplo, acidificación o emulsión. El ingrediente alimentario puede estar en forma de una solución o como un sólido – de acuerdo con el uso y/o el modo de aplicación y/o el modo de administración.

Las variantes de polipéptidos y ácidos nucleicos descriptos en la presente pueden ser - o se puede añadir a - complementos alimentarios. Las variantes de polipéptidos y ácidos nucleicos descriptos en la presente pueden ser - o se puede añadir a - alimentos funcionales. Como se usa en la presente, el término "alimento funcional" significa un alimento que es capaz de proporcionar no sólo un efecto nutricional y/o una satisfacción de sabor, sino que también es capaz de suministrar un efecto beneficioso adicional al consumidor. Aunque no existe una definición legal de un alimento funcional, la mayoría de las partes interesadas en esta área están de acuerdo en que son alimentos comercializados que tienen efectos sobre la salud específicos.

Las variantes de polipéptidos también se pueden usar en la fabricación de un producto alimenticio o un comestible. Los comestibles típicos incluyen productos lácteos, productos cárnicos, productos avícolas, productos de pescado y productos de masa. El producto de masa puede ser cualquier producto de masa procesada, que incluyen masas fritas, frita con aceite, asado, horneado, al vapor y hervida, tales como pan al vapor y tortas de arroz. En formas de realización muy preferidas, el producto alimenticio es un producto de panadería.

Con preferencia, el comestible es un producto de panadería. Los productos de panadería típicos (al horno) incluyen pan - tales como panes, panecillos, bollos, rosquillas, bases de pizza, etc. pastelería, pretzels, tortillas, tortas, galletitas dulces, bizcochos, galletitas saladas, etc.

Los productos alimenticios con preferencia se benefician de una o más de las propiedades de manipulación u horneado de las variantes de polipéptidos descriptas en la presente. La propiedad de manipulación u horneado mejorada se puede seleccionar del grupo que consiste en: firmeza mejorada, elasticidad mejorada, cohesión mejorada, friabilidad mejorada y capacidad de plegado mejorada.

Además, en un aspecto, se proporciona un método para modificar un aditivo alimentario que comprende una exoamilasa no maltogénica, el método que comprende introducir una mutación en una o más de las posiciones de la exoamilasa no maltogénica expuesto en este documento. El mismo método se puede usar para modificar un ingrediente alimenticio, o un suplemento alimenticio, un producto alimenticio, o un comestible.

En un aspecto, se proporciona el uso de variantes de polipéptidos que son capaces de retardar el revenimiento de los medios de almidón, tales como geles de almidón. Las variantes de polipéptidos son especialmente capaces de retardar la retrogradación perjudicial del almidón.

La mayoría de los gránulos de almidón se componen de una mezcla de dos polímeros: un contenido de amilosa esencialmente lineal y una amilopectina altamente ramificada. La amilopectina es una molécula muy grande, ramificada que consiste en cadenas de unidades de α-D-glucopiranosilo unidas por enlaces (1-4), en el que dichas

cadenas están unidas por enlaces α-D-(1-6) para formar ramas. La amilopectina está presente en todos los almidones naturales, constituyendo aproximadamente el 75% de la mayoría de los almidones comunes. La amilosa es esencialmente una cadena lineal de unidades de α-D-glucopiranosilo (1-4) ligadas que tienen pocas ramas α-D-(1-6). La mayoría de los almidones contienen aproximadamente 25% de amilosa.

Los gránulos de almidón calentados en presencia de agua experimentan una transición de fase orden-desorden denominada gelatinización, donde el líquido es absorbido por los gránulos de hinchamiento. Las temperaturas de gelatinización varían para diferentes almidones. Después del enfriamiento del pan recién horneado la fracción de amilosa, dentro de horas, retrograda para desarrollar una red. Este proceso es beneficioso ya que crea una estructura de miga deseable con un bajo grado de firmeza y mejores propiedades de corte en rodajas. La cristalización más gradual de la amilopectina tiene lugar dentro de los gránulos de almidón gelatinizados durante los días después del horneado. En este proceso se considera que la amilopectina refuerza la red de amilosa en la que están incrustados los gránulos de almidón. Este refuerzo lleva a un aumento de la firmeza de la miga de pan. Este refuerzo es una de las principales causas de envejecimiento 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 llamada retrogradación), la capacidad de retención de agua de la miga se cambia con implicaciones importantes sobre las propiedades organolépticas y dietarias. La miga pierde suavidad y elasticidad y se vuelve firme y quebradiza. El aumento de la firmeza de la miga se utiliza a menudo como una medida del proceso de envejecimiento del pan.

La tasa de retrogradación perjudicial de la amilopectina depende de la longitud de las cadenas laterales de amilopectina. En consecuencia, la hidrólisis enzimática de las cadenas laterales de amilopectina, por ejemplo, mediante las variantes de polipéptidos descriptas en la presente que tiene actividad de exoamilasa no maltogénica, puede reducir marcadamente sus tendencias de cristalización.

En consecuencia, en un aspecto, el uso de variantes de polipéptido descriptos en la presente cuando se añade al almidón en cualquier fase de su transformación en un producto alimenticio, por ejemplo, antes, durante o después del horneado en pan puede retardar o impedir o lentificar laa retrogradación. Tal uso se describe con más detalle a continuación.

En un aspecto, se proporciona un método para mejorar la capacidad de una exoamilasa no maltogénica para prevenir el envejecimiento, con preferencia la retrogradación perjudicial, de un producto de masa, el método que comprende la introducción de una mutación en cualquiera o varias de las posiciones de la exoamilasa no maltogénica expuestas en este documento.

Para la evaluación del efecto inhibidor del antienvejecimiento de las variantes de polipéptidos, tal variante que tiene actividad de exoamilasa no maltogénica descripta en la presente, se puede medir la firmeza de la miga 1, 3 y 7 días después del horneado por medio de un Analizador de textura de alimentos universal Instron 4301 o equipo similar conocido en la técnica.

Otro método utilizado tradicionalmente en la técnica y que se usa para evaluar el efecto sobre la retrogradación del almidón de una variante de polipéptido tal como una variante que tiene actividad de exoamilasa se basa en DSC (calorimetría diferencial de barrido). En la presente, se mide la entalpía de fusión de la amilopectina retrogradada en miga de pan o miga de una masa del sistema modelo de masa horneada con o sin enzimas (control). El equipo de DSC aplicada puede ser una corrida de DSC 820 Mettler-Toledo con un gradiente de temperatura de 10ºC por minuto, de 20 a 95ºC. Para la preparación de las muestras se pesan 10 a 20 mg de miga y se transfieren a placas de aluminio Mettler-Toledo que se sellan herméticamente.

Las masas del sistema modelo pueden contener harina de trigo estándar y cantidades óptimas de agua o tampón con o sin la variante de polipéptido. Se mezclan en un farinógrafo Brabender 10 o 50 g durante 6 o 7 min., respectivamente. Las muestras de las masas se colocan 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 30 min. de incubación a 33ºC seguido de calentamiento 33 a 95ºC con un gradiente de 1,1ºC por minuto. y, finalmente, a 5 min. incubación a 95ºC. Posteriormente, los tubos se almacenan en un termostato a 20ºC antes del análisis DSC.

En una forma de realización, las variantes descriptas en la presente tienen una entalpía de fusión reducida, en comparación con el control. En una forma de realización adicional, las variantes tienen un 10% o más de entalpía de fusión reducida. En aún otro aspecto, tienen un 20% o más, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más de entalpía de fusión reducida cuando se compara con el control.

En un aspecto, se proporciona el uso de variantes de polipéptidos en la preparación de los productos alimenticios, en particular, productos de almidón. El método comprende formar el producto de almidón mediante la adición de una enzima exoamilasa no maltogénica tal como una variante de polipéptido a un medio de almidón. Si el medio de almidón es una masa, a continuación, la masa se prepara mezclando harina, agua, la exoamilasa no maltogénica que es una variante de polipéptido descripta en la presente y opcionalmente otros posibles ingredientes y aditivos.

El término "almidón" se debe entender en el sentido de almidón per se o un componente de este, especialmente amilopectina. El término "medio de almidón" significa cualquier medio adecuado que comprende almidón. El término "producto de almidón" significa cualquier producto que contiene o se basa en o se deriva de almidón. Con preferencia, el producto de almidón contiene o se basa en o se deriva de almidón obtenido a partir de harina de trigo. El término "harina", como se usa en la presente es un sinónimo de harina finamente molida de trigo o de otro grano. Con preferencia, sin embargo, el término significa harina obtenida a partir de trigo per se y no a partir de otro grano. De este modo, y a menos que se exprese lo contrario, las referencias a "harina de trigo" como se usa en la presente con preferencia significa referencias a harina de trigo per se, así como a la 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 centeno. Sin embargo, también se contempla masa que comprende harina derivada de otros tipos de cereales tales como por ejemplo de arroz, maíz, cebada y durra. Con preferencia, el producto de almidón es un producto de panadería. Con más preferencia, el producto de almidón es un producto de pan. Incluso con más preferencia, el producto de almidón es un producto de panificación farináceo horneado. El término "producto de panificación farináceo horneado" se refiere a cualquier producto horneado basado en una masa obtenible mediante la mezcla de harina, agua, y un agente de fermentación en condiciones de formación de masa. Obviamente se puede añadir otros componentes a la mezcla de masa.

En consecuencia, si el producto de almidón es un producto de panificación farináceo horneado, el proceso entonces comprende mezclar - en cualquier orden adecuado - harina, agua, y un agente leudante en condiciones de formación de masa y además la adición de una variante de polipéptido descripta en la presente, opcionalmente en 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 variante de polipéptido descripta en la presente se puede añadir junto con cualquier ingrediente de la masa incluyendo la mezcla de ingredientes agua o masa o con cualquier aditivo o mezcla de aditivos. La masa se puede preparar por cualquier método de preparación de masa convencional común en la industria de panadería o en cualquier otra industria de elaboración de productos de a base de masa de harina.

El horneado de productos de panificación farináceos tal como por ejemplo pan blanco, pan hecho de harina centeno y harina de trigo tamizados, panecillos y similares normalmente se logra mediante el horneado de la masa de pan en las temperaturas del horno en el rango de 180 a 250ºC durante aproximadamente 15 a 60 minutos. Durante el proceso de horneado un fuerte gradiente de temperatura (200 a 120ºC) es prevalente en las capas de masa exteriores donde se desarrolla la corteza característica del producto horneado. Sin embargo, a causa del consumo de calor debido a la generación de vapor, la temperatura en la miga es solamente cerca de 100ºC al final del proceso de horneado.

También se proporciona un proceso para obtener un producto de pan que comprende: (a) proporcionar un medio de almidón; (b) añadir el medio de almidón una variante de polipéptido descripto en este documento; y (c) aplicar calor al medio de almidón durante o después de la etapa (b) para producir un producto de pan. Se proporciona un proceso para obtener un producto de pan que comprende añadir a un medio de almidón una variante de polipéptido descripta.

En un aspecto, la variante de polipéptido se puede añadir como una preparación líquida o como una composición pulverulenta seca que comprende el enzima como el único componente activo o en mezcla con uno o más ingredientes de la masa o aditivo de la masa.

En un aspecto adicional, se proporcionan las composiciones mejoradoras, que incluyen composiciones de mejora del pan y composiciones de mejora de la masa. Estos comprenden una variante de polipéptido, opcionalmente junto con un ingrediente adicional, o una enzima adicional, o ambos.

En un aspecto, se proporciona una composición mejoradora para una masa, en la que la composición mejoradora comprende una variante expuesta en cualquiera de las reivindicaciones, y al menos un ingrediente de la masa o aditivo de masa adicional.

En un aspecto, se proporciona una composición que comprende una harina y una variante expuesta en cualquiera de las reivindicaciones.

En un aspecto adicional, se proporciona el uso de composiciones mejoradora de pan y masa en el horneado. En un aspecto adicional, se proporciona un producto o masa horneado u obtenido de la composición mejoradora del pan o composición mejoradora de la masa. En otro aspecto, se proporciona un producto o masa horneado u obtenido mediante el uso de una composición mejoradora del pan o composición mejoradora de la masa.

Una masa se puede preparar mediante la mezcla de harina, agua, composición mejoradora de la masa que comprende una variante de polipéptido (como se describió anteriormente) y opcionalmente otros ingredientes y aditivos.

La composición mejoradora de la masa se puede añadir junto con cualquier ingrediente de la masa que incluye harina, agua u otros ingredientes o aditivos opcionales. La composición mejoradora de la masa se puede añadir antes de la harina o el agua u otros ingredientes y aditivos opcionales. La composición mejoradora de la masa se puede añadir después de la harina o el agua, o de otros ingredientes y aditivos opcionales. La masa se puede preparar por cualquier método de preparación de masa convencional común en la industria de panadería o en cualquier otra industria de elaboración de productos de a base de masa de harina

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

La cantidad de la variante de polipéptido que se añade normalmente está en una cantidad que se produce la presencia en la masa terminada de 50 a 100.000 unidades por kg de harina, con preferencia 100 a 50,000 unidades por kg de harina. Con preferencia, la cantidad está en el rango de 200 a 20.000 unidades por kg de harina. Alternativamente, la variante de polipéptido se añade en una cantidad que se produce la presencia en la masa terminada de 0,02 - 50 ppm de enzima basada en la harina (0,02 - 50 mg enzima por kg de harina), con preferencia 0.2 - 10 ppm.

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 µm ol de azúcar reductor por min cuando se incuba a 50 grados C en un tubo de ensayo con 4 ml de 10 mg de almidón de maíz ceroso ml/en MES 50 mM, cloruro de calcio 2 mM, pH 6,0 como se describe de aquí en adelante.

La masa tal como se describe en la presente generalmente comprende sémola de trigo o harina de trigo y/o otros tipos de sémola, harina o almidón tal como harina de maíz, almidón de maíz, harina de maíz, harina de arroz, harina de centeno, sémola de centeno, harina de avena, sémola de avena, harina de soja, sémola de sorgo, harina de sorgo, sémola de papa, harina de patata o almidón de papa. La masa puede ser fresca, congelada, o parcialmente horneada.

La masa puede ser una masa leudada o una masa que se debe someter al leudado. La masa se puede leudar de varias maneras, tales como mediante la adición de agentes de leudado químicos, por ejemplo, bicarbonato sódico o mediante la adición de un leudante (masa de fermentación), pero se prefiere leudar la masa añadiendo un cultivo de levadura adecuado, tal como un cultivo de Saccharomyces cerevisiae (levadura de panadero), por ejemplo, una cepa comercialmente disponible de S. cerevisiae.

La masa puede comprender grasas, tales como grasa o manteca granulada. La masa puede comprender además un emulsionante adicional tal como mono- o diglicéridos, ésteres de azúcar de ácidos grasos, poliglicerol ésteres de ácidos grasos, ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, estearatos de polioxietileno, o lisolecitina.

También se proporciona una premezcla que comprende harina junto con la combinación descripta en la presente. La premezcla puede contener aditivos mejoradores de la masa y/o aditivos mejoradores de pan, por ejemplo, cualquiera de los aditivos, que incluyen enzimas, mencionados en la presente.

Con el fin de mejorar aún más las propiedades del producto horneado e impartir calidades distintivas al producto horneados se pueden incorporar ingredientes de la masa y/o aditivos de masa adicionales en la masa. Típicamente, tales componentes añadidos adicionalmente pueden incluir ingredientes de la masa tales como sal, granos, grasas y aceites, azúcar o edulcorante, fibras dietéticas, fuentes de proteínas tales como leche en polvo, soja gluten o huevos y aditivos de masa tales como emulsionantes, otras enzimas, hidrocoloides, agentes saborizantes, agentes oxidantes, minerales y vitaminas.

Los emulsionantes son útiles como reforzadores de la masa y suavizadores de la miga. Como reforzadores de la masa, los emulsionantes pueden proporcionar tolerancia con 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 mayoría de los reforzadores de la masa también mejoran el esponjado lo que significa el aumento del volumen de los productos fermentados a horneados. Por último, los reforzadores de la masa emulsionarán todas las 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 monoglicéridos 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 monoglicéridos 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 se pueden añadir junto con cualquier ingrediente de la masa que incluyen harina, agua u otros ingredientes o aditivos opcionales, o la composición mejoradora de la masa. El aditivo o ingrediente de masa adicional se pueden añadir antes de la harina, agua, otros ingredientes y aditivos opcionales

o la composición mejoradora de la masa. El aditivo o ingrediente de masa adicional se pueden añadir después de la harina, agua, otros ingredientes y aditivos opcionales o la composición mejoradora de la masa.

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

En un aspecto ele aditivo o ingrediente de masa adicional es al menos 1% del peso del componente de harina de la masa. En un aspecto adicional, el aditivo o ingrediente de masa adicional es al menos 2%, con preferencia al menos 3%, con preferencia al menos 4%, con preferencia al menos 5%, con preferencia al menos 6%. Si el aditivo es una grasa, luego normalmente la grasa puede estar presente en una cantidad de 1 a 5%, normalmente 1 a 3%, más normalmente aproximadamente 2%.

Para el uso comercial y el uso doméstico de harina para hornear y producir alimentos, es importante mantener un nivel adecuado de actividad de •-amilasa en la harina. Un nivel de actividad que es demasiado alto puede producir un producto que es pegajoso y/o pastoso y por lo tanto no comercializable. La harina con insuficiente actividad de •-amilasa puede no contener suficiente azúcar para la función apropiada de levadura, lo que produce pan o productos horneados friables, secos. Por consiguiente, una variante, como se describe en la presente, por sí misma o en combinación con otra •-amilasa u otra variante, se puede añadir a la harina para aumentar el nivel de actividad de •-amilasa endógena en la harina. La variante de esta forma de realización puede tener una temperatura óptima en presencia de almidón, por ejemplo en los rangos de aproximadamente 30-90ºC, 40-80ºC, 40-50ºC, 45-65ºC, o 50-60ºC. El pH óptimo en una solución de 1% de almidón soluble puede ser por ejemplo entre pH 4,5 a 6,0.

Los cereales, como la cebada, avena, trigo, así como componentes de la planta, tales como maíz, lúpulo, y arroz, también se utilizan para elaboración de la cerveza, tanto en la elaboración de cerveza industrial como casera. Los componentes utilizados en la industria cervecera pueden ser sin maltear o pueden ser malteada, es decir, parcialmente germinado, lo que produce un aumento en los niveles de enzimas, que incluyen •-amilasa. Para elaboración de la cerveza exitosa, son necesarios niveles adecuados de actividad de enzima •-amilasa para asegurar los niveles apropiados de azúcares para la fermentación. Una variante, por sí mismo o en combinación con otra •-amilasa, en consecuencia se puede añadir a los componentes usados para elaborar cerveza.

Como se usa en la presente, el término "harina" significa grano de cereal molido o triturado. El término "harina" también puede significar productos de sagú o tubérculos que han sido molidas o triturados. En algunas formas de realización, la harina también puede contener componentes además de la materia de cereales o planta molido o triturado. Un ejemplo de un componente adicional, aunque no pretende ser limitante, es un agente leudante. Los granos de cereales incluyen trigo, avena, centeno y cebada. Los productos de tubérculos incluyen harina de tapioca, harina de yuca, y el polvo de flan. El término "harina" también incluye harina de maíz molida, sémola de maíz, harina de arroz, harina de trigo integral, harina leudante, harina de tapioca, harina de yuca, arroz molido, harina enriquecido, y el polvo de flan.

Como se usa en la presente, el término "suministros", significa granos y componentes de la planta que se trituran o rompen. Por ejemplo, la cebada usada en la producción de cerveza es un grano que se ha molido o triturado grueso para obtener una consistencia apropiada para producir una pasta para la fermentación. Como usa en la presente, el término "suministros" incluye cualquiera de los tipos mencionados anteriormente de plantas y granos en formas trituradas o molidas en trozos grandes. Los métodos descriptos en la presente se pueden usar para determinar los niveles de actividad de amilasa en ambas harinas y suministros.

Una o más enzimas adicionales se pueden usar en combinación con las variantes de polipéptidos descriptos en la presente. Tales combinaciones por ejemplo se pueden añadir a la comida, preparación de la masa, producto alimenticio o composición de almidón.

Las amilasas de horneado pueden provenir de un hongo, bacteria o planta. Puede ser una alfa-amilasa (EC 3.2.1.1). La lafa-amilasa puede ser una alfa-amilasa fúngica de Aspergillus o Trichoderma, por ejemplo de Aspergillus oryzae. O puede ser una alfa-amilasa de Bacillus, por ejemplo B. amiloliquefaciens o B. licheniformis. O puede ser una beta-amilasa de planta (EC 3.2.1.2), por ejemplo beta-amilasa de malta de cebada o poroto de soja o puede ser una exo-amilasa usada para el antienvejecimiento, por ejemplo exo-amilasa no maltogénica (EC 3.2.1.60) desarrollada de maltotetrahidrolasa de Pseudomonas saccharophila (SEQ ID NO: 10) o amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133) desarrollada de Bacillus stearothermophilus que se describe adicionalmente a continuación.

En un aspecto, la amilasa adicional es una alfa-amilasa maltogénica. Una "alfa-amilasa maltogénica" (glucan 1,4-alfa-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 bajo el nombre comercial Novamyl (Novozymes, Dinamarca) y se utiliza ampliamente en la industria de panadería como un agente antienvejecimiento debido a su capacidad para reducir la retrogradación del almidón. Novamyl se describe en detalle en la Publicación de Patente Internacional WO 91/04669. La alfa-amilasa maltogénica acciones Novamyl comparte varias características con ciclodextrina glucanotransferasas (CGTasas), que incluyen homología de secuencia (Henrissat B, Bairoch A; Biochem. J., 316, 695-696 (1996)) y la formación de productos de transglicosilación (Christophersen, C., et al., 1997, starch, vol. 50, No. 1, 39-45). 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 production of maltose an a limit dextrin, the limit dextrin, and use of the limit dextrin. Dinamarca, yo WO 95/10627. Se describe adicionalmente en la patente U.S. N.º 4.598.048 y la patente U.S. N.º 4.604.355. Los ejemplos preferidos de amilasas antienvejecimiento son exo-amilasas, por ejemplo, exo-amilasa no maltogénica o G4-amilasa (EC 3.2.1.60) desarrollada a partir de maltotetraohidrolasa de Pseudomonas saccharophila que tiene la SEQ ID NO: 1 o de amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133) desarrollada a partir de Bacillus stearothermophilus que tiene la SEQ ID NO: 51.

Una amilasa antienvejecimiento reduce el envejecimiento después del horneado y lleva a una reducción en el aumento de la firmeza y una reducción de la disminución de la elasticidad desde el 1 al día 7 después del horneado con relación a un control sin enzima. Una amilasa antienvejecimiento se puede analizar mediante la realización de una prueba de horneado y usando análisis de textura para determinar el desarrollo de la firmeza y elasticidad con el tiempo. El análisis de textura se describe en el ejemplo 11.

Las enzimas adicionales se pueden seleccionar de, por ejemplo, cualquier combinación de los siguientes: (a) Novamyl, o una variante, homólogo, o mutantes de esta que tienen actividad de alfa-amilasa maltogénica; (b) una xilanasa como GRINDAMYL ™ POWERBake 900 (Danisco A/S); (c) una α-amilasa bacteriana tal como Max-Life U4 (Danisco A/S); y (d) una lipasa tal como GRINDAMIL™ POWERBake 4050 (Danisco A/S).

En una forma de realización una variante de polipéptido descripta en la presente se usa en combinación con al menos una enzima seleccionada de la lista que consiste en oxidorreductasas, hidrolasas, lipasas, esterasas, glicosidasas, amilasas, pululanasas, xilanasas, celulasas, hemicelulasas, enzimas degradantes de almidón, proteasas y lipoxigenasas. En una forma de realización, la composición comprende al menos una variante de polipéptido descripta en la presente y una amilasa maltogénica de Bacillus, descripta en WO91/04669. Una forma de realización comprende una variante de polipéptido descripta en la presente y harina.

Otras enzimas que se pueden añadir a la masa incluyen oxidorreductasas, hidrolasas, tales como lipasas y esterasas, así como glicosidasas como α-amilasa, pululanasa y xilanasa. Las oxidorreductasas, tales como por ejemplo glucosa oxidasa y hexosa oxidasa, se pueden utilizar para el fortalecimiento de la masa y el control de volumen de los productos horneados y xilanasas y otras hemicelulasas masa se puede añadir para mejorar las propiedades de manipulación de la masa, firmeza de la miga y el volumen del pan. Las lipasas son útiles como reforzadores de la masa y suavizadores de la miga y a-amilasas y otras enzimas amilolíticas se pueden incorporar en la masa para controlar el volumen del pan y reducir aún más firmeza de la miga.

Otras enzimas que se pueden usar se pueden seleccionar del grupo que consiste en una celulasa, una hemicelulasa, una enzima de degradación del almidón, una proteasa, una lipoxigenasa.

Una variante, como se define en la presente, también se puede añadir sola o en combinación con otras amilasas, que incluyen otras variantes de amilasa para prevenir o retardar el envejecimiento, es decir, firmeza de la miga de los productos horneados. La cantidad de amilasa antienvejecimiento normalmente estará en el rango de 0,01-10 mg de proteína enzimática por kg de harina, por ejemplo, 0,5 mg/kg ds. Las amilasas antienvejecimiento adicionales se pueden usar en combinación con una variante de polipéptido descripta en la presente incluyen una endo-amilasa, por ejemplo, una endo-amilasa bacteriana de Bacillus. La amilasa adicional puede ser una •-amilasa maltogénica (EC 3.2.1.133), por ejemplo, de Bacillus. Novamil® es un ejemplo de •-amilasa maltogénica de B. stearothermophilus cepa NCIB 11837 y se describe en Christophersen et al., Starch 50: 39-45 (1997). Otros ejemplos de endo-amilasas antienvejecimiento incluyen •-amilasas bacterianas derivadas de Bacillus, tal como B. licheniformis es o B. amiloliquefaciens. La amilasa antienvejecimiento puede ser una exo-amilasa, tal como •-amilasa, por ejemplo, de fuentes vegetales, tal como soja o de fuentes microbianas, tal como Bacillus.

La composición de horneado que comprende una variante de polipéptido descripta en la presente puede comprender además una fosfolipasa. La fosfolipasa puede tener actividad A_1 o A_2 para eliminar el ácido graso de los fosfolípidos, lo que forma un lisofosfolípido. Puede tener o no actividad de lipasa, es decir, la actividad en sustratos de triglicéridos. La fosfolipasa típicamente tiene una temperatura óptima en el rango de 30-90ºC, por ejemplo, 30-70ºC. Las fosfolipasas añadidas pueden ser de origen animal, por ejemplo, de páncreas, por ejemplo, páncreas bovino o porcino, veneno de serpiente o veneno de abeja. Alternativamente, la fosfolipasa puede ser de origen microbiano, por ejemplo, de hongos filamentosos, levaduras o bacterias, tales como el género o especie. Los ejemplos de fuentes de fosfolipasas incluyen Aspergillus, A. niger; Dictyostelium, D. discoideum; Mucor, M. javanicus, M. mucedo, M. subtilissimus; Neurospora, N. crassa; Rhizomucor, R. pusillus; Rhizopus, R. arrhizus, R. japonicus, R. stolonifer; Sclerotinia, S. libertiana; Trichophyton, T. rubrum; Whetzelinia, W. sclerotiorum; Bacillus, B. megaterium, B. subtilis; Citrobacter, C. freundii; Enterobacter, E. aerogenes, E. cloacae; Edwardsiella, E. tarda; Etwinia, E. herbicola; Escherichia, E. coli; Klebsiella, K. pneumoniae; Proteus, P. vulgaris; Providencia, P. stuartii; Salmonella, S. typhimurium; Serratia, S. liquefasciens, S. marcescens; Shigella, S. flexneri; Streptomyces, S. violeceoruber; Yersinia, Y. enterocolitica; Fusarium, y F. oxysporum (por ejemplo, cepa DSM 2672).

La fosfolipasa se añade en una cantidad que mejora la suavidad del pan durante el período inicial después del horneado, en particular de las primeras 24 horas. La cantidad de fosfolipasa estará típicamente en el rango de aproximadamente 0,01 a 10 mg de proteína enzimática por kg de harina, por ejemplo, 0,1 a 5 mg/kg. La actividad de

la fosfolipasa generalmente estará en el rango de aproximadamente 20 a 1000 Unidad de Lipasa (LU)/kg de harina, donde una unidad de lipasa se define como la cantidad de enzima requerida para liberar 1 µmol de ácido butírico por minuto a 30ºC, pH 7,0, con goma arábiga como emulsionante y tributirina como sustrato.

Las composiciones de masa generalmente comprenden sémola de trigo o harina de trigo y/o otros tipos de sémola, harina o almidón tal como harina de maíz, almidón de maíz, harina de maíz, harina de arroz, harina de centeno, sémola de centeno, harina de avena, sémola de avena, harina de soja, sémola de sorgo, harina de sorgo, sémola de papa, harina de patata o almidón de papa. La masa puede ser fresca, congelada, o parcialmente horneada. La masa puede ser una masa leudada o una masa que se debe someter al leudado. La masa se puede leudar de varias maneras, tales como mediante la adición de agentes de leudado químicos, por ejemplo, bicarbonato sódico o mediante la adición de un leudante, es decir, masa de fermentación. La masa también se puede leudar mediante la adición de un cultivo de levadura adecuado, tal como un cultivo de Saccharomyces cerevisiae (levadura de panadero), por ejemplo, una cepa comercialmente disponible de S. cerevisiae.

La masa también puede comprender otros ingredientes convencionales de la masa, por ejemplo, proteínas, tal como leche en polvo, gluten y soja; huevos (por ejemplo, huevos enteros, yemas de huevo o claras de huevo); un oxidante, tal como ácido ascórbico, bromato de potasio, yodato de potasio, azodicarbonamida (ADA) o persulfato de amonio; un aminoácido tal como L-cisteína; un azúcar; o una sal, tal como cloruro de sodio, acetato de calcio, sulfato de sodio o sulfato de calcio. La masa grasa puede comprender además, por ejemplo, triglicéridos, tales como grasa o manteca granulada. La masa puede comprender además un emulsionante tal como mono- o diglicéridos, ésteres de ácido diacetil tartárico de mono o diglicéridos, ésteres de azúcar de ácidos grasos, poliglicerol ésteres de ácidos grasos, ésteres de ácido láctico de monoglicéridos, ésteres de ácido acético de monoglicéridos, estearatos de polioxietileno o lisolecitina. En particular, la masa se puede hacer sin adición de emulsionantes.

Opcionalmente, se puede usar una enzima adicional junto con la amilasa de antienvejecimiento y la fosfolipasa. La enzima adicional puede ser una segunda amilasa, tal como una amiloglucosidasa, una •-amilasa, una ciclodextrina glucanotransferasa, o de la enzima adicional puede ser una peptidasa, en particular una exopeptidasa, una transglutaminasa, una lipasa, una celulasa, una hemicelulasa, en particular una pentosanasa, tal como xilanasa, una proteasa, una proteína disulfuro isomerasa, por ejemplo, una proteína disulfuro isomerasa, como se describe en WO 95/00636, por ejemplo, una glicosiltransferasa, una enzima de ramificación (enzima de ramificación 1,4-•-glucano), una 4-•-glucanotransferasa (dextrina glicosiltransferasa) o una oxidorreductasa, por ejemplo, una peroxidasa, una lacasa, una glucosa oxidasa, una piranosa oxidasa, una lipoxigenasa, una L-aminoácido oxidasa o una carbohidrato oxidasa. La enzima adicional puede ser de cualquier origen, incluyendo mamíferos y plantas, y en particular de origen microbiano (bacteriano, levadura o fúngico) y se puede obtener mediante técnicas usadas convencionalmente en la materia.

La xilanasa es normalmente de origen microbiano, por ejemplo, derivado de una bacteria u hongo, tal como una cepa de Aspergillus, en particular de A. aculeatus, A. niger (cf. WO 91/19782), A. awamori (por ejemplo, WO 91/18977), o A. tubigensis (por ejemplo, WO 92/01793); de una cepa de Trichoderma, por ejemplo, T. reesei, o de una cepa de Humicola, por ejemplo, H. insolens (por ejemplo, WO 92/17573). Pentopan® y Novozym 384® son preparaciones de xilanasa disponibles en el comercio producidas de Trichoderma reesei. La amiloglucosidasa puede ser una amiloglucosidasa de A. niger (tal como AMG®). Otros productos de amilasa útiles incluyen Grindamil® A 1000 o A 5000 (disponible en Danisco, Dinamarca) y Amylase® H o Amylase P (disponible en Gist-Brocades, Holanda). La glucosa oxidasa puede ser una glucosa oxidasa fúngica, en particular una glucosa oxidasa de Aspergillus niger (tal como Gluzyme®). Un ejemplo de proteasa es Neutrase®. Un ejemplo de lipasa se puede derivar de las cepas de Thermomyces (Humicola), Rhizomucor, Candida, Aspergillus, Rhizopus, o Pseudomonas, en particular de Thermomyces lanuginosus (Humicola lanuginosa), Rhizomucor miehei, Candida antarctica, Aspergillus niger, Rhizopus delemar o Rhizopus arrhizus, o Pseudomonas cepacia. En forma de realizaciones específicas, la lipasa puede ser Lipasa A o Lipasa B derivada de Candida Antarctica como se describe en el documento WO 88/02775, por ejemplo, o la lipasa se puede derivar de Rhizomucor miehei como se describe en el documento EP 238,023, por ejemplo, o Humicola lanuginosa, descrita en el documento EP 305.216, por ejemplo, o Pseudomonas cepacia como se describe en los documentos EP 214,761 y WO 89/01032, por ejemplo.

El proceso se puede usar para cualquier tipo de producto horneado preparado a partir de masa, ya sea de un carácter suave o crujiente, ya sea de tipo blanco, claro u oscuro. Los ejemplos son pan, en particular pan blanco, integral o centeno, por lo general en forma de panes o rollos, tales como, pero sin limitación, pan tipo baguette francesa, pan de pita, tortillas, tortas, panqueques, bizcochos, galletitas, masa quebrada, pan crujiente, pan al vapor, pizza y similares.

En otra forma de realización, una variante de polipéptido descripta en la presente se puede usar en una premezcla, que comprende harina junto con una amilasa antienvejecimiento, una fosfolipasa y un fosfolípido. La premezcla puede contener otros aditivos mejoradores de masa y/o mejoradores del pan, por ejemplo, cualquiera de los aditivos, que incluyen las enzimas, mencionadas anteriormente. En un aspecto, la variante de polipéptido descripta en la presente es un componente de una preparación enzimática que comprende una amilasa antienvejecimiento y una fosfolipasa, para usar como aditivo de horneado.

La preparación enzimática está opcionalmente en forma de un granulado o polvo aglomerado. La preparación puede tener una distribución de tamaño de partícula estrecha de más de 95% (en peso) de las partículas en el rango de 25 a 500 µm. Los granulados y polvos aglomerados se pueden preparar por métodos convencionales, por ejemplo, por pulverización de la de polipéptido descripta en la presente sobre un portador en un granulador de lecho fluido. El portador puede consistir en núcleos de partículas que tienen un tamaño de partícula adecuado. El portador puede ser soluble o insoluble, por ejemplo, una sal (tal como NaCl o sulfato de sodio), un azúcar (tal como sacarosa o lactosa), un alcohol de azúcar (tal como sorbitol), almidón, arroz, sémola de maíz, o soja.

Otro aspecto contempla la envoltura de partículas que comprenden una variante de polipéptido descripta en la presente, es decir, partículas de •-amilasa. Para preparar las partículas de amilasa envueltas, la enzima se pone en contacto con un lípido de calidad alimentaria en cantidad suficiente para suspender la totalidad de las partículas de •-amilasa. Los lípidos de calidad alimentaria, como se usa en la presente, pueden ser cualquier compuesto orgánico natural, que insoluble en agua pero es soluble en solventes orgánicos no polares tales como hidrocarburos o éter dietílico. Los lípidos adecuados de calidad alimentaria incluyen, pero sin limitación, triglicéridos, ya sea en forma de grasas o aceites que son saturados o insaturados. Los ejemplos de ácidos grasos y combinaciones de estos que componen los triglicéridos saturados incluyen, pero sin limitación, ácido butírico (derivado de grasa de la leche), palmítico (derivado de grasa animal y vegetal), y/o esteárico (derivado de grasa animal y vegetal). Los ejemplos de ácidos grasos y combinaciones de estos que componen los triglicéridos insaturados incluyen, pero sin limitación, palmitoleico (derivado de grasa animal y vegetal), oleico (derivado de grasa animal y vegetal), linoleico (derivado de los aceites vegetales), y/o linolénico (derivado de aceite de linaza). Otros lípidos adecuados de calidad alimentaria incluyen, pero sin limitación, monoglicéridos y diglicéridos derivados de los triglicéridos mencionados anteriormente, fosfolípidos y glicolípidos.

El lípido de calidad alimentaria, en particular en forma de líquido, se pone en contacto con una forma en polvo de las partículas de •-amilasa de manera tal que el material de lípidos cubre al menos una porción de la superficie de al menos una mayoría, por ejemplo, 100% de las partículas de •-amilasa. De este modo, cada partícula de •-amilasa está envuelto individualmente en un lípido. Por ejemplo, todas o sustancialmente todas las partículas de •-amilasa están provistas de una película envolvente de lípidos fina y continua. Esto se puede lograr mediante el vertido primero de una cantidad de lípidos en un recipiente y, a continuación suspensión de las partículas de fina, continua de manera que el lípido humecta completamente la superficie de cada partícula de •-amilasa. Después de un corto periodo de agitación, las partículas de •-amilasa envueltas, que llevan una cantidad sustancial de los lípidos en sus superficies, se recuperan. El grosor del recubrimiento aplicado de este modo a las partículas de •-amilasa se puede controlar mediante la selección del tipo de lípido utilizado y la repetición de la operación con el fin de construir una película más gruesa, cuando se desee.

El almacenamiento, la manipulación y la incorporación del vehículo de administración cargado se puede lograr por medio de una mezcla envasada. La mezcla envasada puede comprender la •-amilasa con envoltura. Sin embargo, la mezcla de envasado puede contener además ingredientes adicionales según sea requerido por el fabricante o el panadero. Después de que la •-amilasa con envoltura se ha incorporado en la masa, el panadero continúa a través del proceso normal de producción de dicho producto.

Las ventajas de envolver las partículas de •-amilasa son de dos veces. En primer lugar, el lípido de calidad alimentaria protege la enzima de la desnaturalización térmica durante el proceso de horneado para las enzimas que son lábiles al calor. En consecuencia, mientras que la •-amilasa se estabiliza y protege durante las etapas de fermentación y horneado, se libera de la capa protectora en el producto horneado final, en el que hidroliza los enlaces glucosídicos en poliglucanos. El vehículo de suministro cargado también proporciona una liberación sostenida de la enzima activa en el producto horneado. Es decir, después de proceso de horneado, la •-amilasa activa se libera continuamente de la capa protectora a una tasa que contrarresta, y por lo tanto reduce la tasa de los mecanismos de envejecimiento.

En general, la cantidad de lípidos aplicado a las partículas •-amilasa puede variar de unos pocos por ciento del peso total de la •-amilasa en muchas veces es el peso, de acuerdo con la naturaleza del lípido, la manera en la que se aplica a las partículas de •-amilasa, la composición de la mezcla de la masa para tratar, y la gravedad de la operación de mezcla de la masa involucrada.

El vehículo de suministro cargado, es decir, la enzima con envoltura de lípidos, se añade a los ingredientes usados para preparar un producto horneado en una cantidad efectiva para extender la vida útil del producto horneado. El panadero calcula la cantidad de •-amilasa con envoltura, preparada como se describió anteriormente, que se requerirá para lograr el efecto antienvejecimiento deseado. La cantidad de •-amilasa con envoltura, necesaria se calcula sobre la base de la concentración de la enzima con envoltura en la proporción de •-amilasa a la harina especificada. Se ha hallado que un amplio rango de concentraciones es efectivo, aunque, como se ha discutido, las mejoras observables en el antienvejecimiento no corresponden linealmente con la concentración de •-amilasa, pero por encima de ciertos niveles mínimos, grandes aumentos en la concentración de •-amilasa producen poca mejora adicional. La concentración de •-amilasa utilizada realmente en una producción de panadería particular podría ser mucho más alta que la mínima necesaria para proporcionar al panadero algo de seguridad contra errores involuntarios de medición por el panadero. El límite inferior de concentración de la enzima se determina por el mínimo efecto antienvejecimiento que el panadero desea alcanzar.

Un método para preparar un producto horneado puede comprender: (a) preparar partículas de •-amilasa recubiertas con lípido, donde sustancialmente todas las partículas de •-amilasa están recubiertas; (b) mezclar una masa que contiene harina; (c) añadir las partículas de •-amilasa recubiertas con lípido antes de que la mezcla esté completa y terminar la mezcla antes de eliminar la capa de lípidos de la •-amilasa; (d) fermentar la masa; y (e) hornear la masa para proporcionar el producto horneado, en el que la •-amilasa está inactivo durante las etapa de mezcla, fermentación y horneado y está activa en el producto horneado.

La •-amilasa con envoltura se puede añadir a la masa durante el ciclo de mezcla, por ejemplo, cerca del final del ciclo de mezcla. La •-amilasa con envoltura se añade en un punto en la etapa de mezcla que permite la distribución suficiente de la •-amilasa con envoltura en toda la masa; sin embargo, la etapa de mezclado se termina antes de que la capa protectora sea desprendida de la partícula de •-amilasa. De acuerdo con el tipo y volumen de la masa, y la acción y velocidad del mezclador, se puede requerir en cualquier momento de uno a seis minutos o más para mezclar la •-amilasa con envoltura en la masa, pero dos a cuatro minutos es el promedio. Por lo tanto, varias variables pueden determinar con precisión el procedimiento. En primer lugar, la cantidad de •-amilasa con envoltura debe tener un volumen total suficiente para permitir que la •-amilasa con envoltura se extienda por toda la mezcla de masa. Si la preparación de •-amilasa con envoltura está muy concentrada, puede ser necesario añadir aceite a la premezcla antes de añadir la •-amilasa con envoltura a la masa. Las recetas y procesos de producción pueden requerir modificaciones específicas; sin embargo, los buenos resultados en general, se pueden lograr cuando el 25% del aceite especificado en una fórmula de masa de pan se mantiene fuera de la masa y se utiliza como un portador para una •-amilasa con envoltura concentrada cuando se añade cerca del final del ciclo de mezcla. En pan u otros productos horneados, especialmente los que tienen un bajo contenido de grasa, por ejemplo, los panes de tipo francés, una mezcla de •-amilasa con envoltura de aproximadamente 1% del peso de harina seca es suficiente para mezclar la •-amilasa con envoltura correctamente con la masa. El rango de porcentajes adecuados es amplio y depende de la fórmula, producto terminado y los requerimientos de la metodología de producción del panadero individual. En segundo lugar, la suspensión de la •-amilasa con envoltura se debe añadir a la mezcla con el tiempo suficiente para la mezcla completa en la masa, pero no durante un tiempo tal que la acción mecánica excesiva desprenda la capa lipídica protectora de las partículas de •-amilasa con envoltura.

6. Composiciones de desencolado textil y uso

También se contemplan las composiciones y métodos de tratar telas (por ejemplo, para desencolar un tejido) usando una variante de polipéptido descripta en la presente. En un aspecto, se proporciona un método de desencolar tejidos, que comprende poner en contacto la variante de polipéptido descripta en la presente con un tejido durante un tiempo suficiente para desencolar el tejido.

Los métodos de tratamiento de telas son bien conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, la Patente U.S. N.º. 6.077.316). Por ejemplo, en un aspecto, el tacto y el aspecto de una tela se mejora mediante un método que comprende poner en contacto la tela con la variante de polipéptido descripta en la presente en una solución. En un aspecto, la tela se trata con la solución bajo presión.

En un aspecto, una variante de polipéptido descripta en la presente se aplica durante o después del tejido de un tejido, o durante la etapa de desencolado, o una o más etapas adicionales de procesamiento de tejido. Durante el tejido del material textil, los hilos se exponen a tensión mecánica considerable. Antes de tejer en telares mecánicos, los hilos de urdimbre a menudo se recubren con almidón de encolado o derivados de almidón para aumentar su resistencia a la tracción y para evitar la rotura. Una variante de polipéptido descripta en la presente se puede aplicar durante o después del tejido para eliminar estos derivados de almidón de encolada o almidón. Después de tejer, una variante de polipéptido descripta en la presente se puede usar para eliminar la ACPA de encolado antes de procesar adicionalmente la tela para asegurar un resultado homogéneo y a prueba de agua.

A variante de polipéptido descripta en la presente se puede usar solo o con otros reactivos químicos de desencolado y/o enzimas de desencolado para desencolar telas, incluidos las telas que contienen algodón, como aditivos detergentes, por ejemplo, en composiciones acuosas. Una variante de polipéptido descripta en la presente también se puede utilizar en composiciones y métodos para producir un aspecto de lavado a la piedra en la tela y prendas de denim teñidas con índigo. Para la fabricación de ropa, la tela se puede cortar y coser ropa o prendas de vestir, que luego se someten al acabado. En particular, para la fabricación de pantalones vaqueros, se han desarrollado diferentes métodos de acabado enzimático. El acabado de prendas de denim normalmente se inicia con una etapa de desencolado enzimático, durante la cual las prendas se someten a la acción de enzimas amilolíticas para proporcionar suavidad a la tela y hacer al algodón más accesible a las etapas de acabado enzimático posteriores. Una variante del polipéptido descripta en la presente se puede usar en métodos de acabado de prendas de denim (por ejemplo, un "proceso de pre-lavado biológico"), desencolado enzimático y provisión de suavidad a los tejidos, y/o proceso de acabado.

Ejemplos

Ejemplo 1. Clonación de PS4 y G4-amilasas

Se cultivó *Pseudomonas sacharophila* durante la noche en medio LB y se aisló ADN cromosómico por métodos estándar (Sambrook J, 1989). Un fragmento de 2190 bp que contenía el marco de lectura abierto PS4 (Zhou *et al.,* 1989) se amplificó de ADN cromosómico de *P. sacharophila* por PCR usando los cebadores P1 y P2 (ver Tabla 3). El fragmento resultante se usó 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 introdujo un codón para una metionina N-terminal, permitiendo la expresión intracelular de PS4. El fragmento de 1605 bp se clonó en pCRBLUNT TOPO (Invitrogen) y se analizó la integridad del constructo por secuenciación. El vector transportador del *Bacillus E.coli* p*DP*66K (Penninga *et al.,* 1996) se modificó para permitir la expresión del PS4 bajo control del promotor P32 y la secuencia señal *ctg*asa. El plásmido resultante, pCSmta es transformado en *B. subtilis.*

Se preparó un segundo constructo de expresión en el cual se removió el dominio de ligación de almidón de PS4. En una PCR con los cebadores P3 y P6 (Tabla 3) en pCSmta, se generó una versión truncada del gen mta. El gen mta de longitud completa en pCSmta se intercambió con la versión truncada que resultó en el plásmido pCSmta-SBD.

Amilasas G4 de Pseudomonas sp. AM1 (2006), Pseudomonas sp. 7193, Pseudomonas mendocina (cepa ymp) y Hahella chejuensis (cepa KCTC 2396) fueron clonadas en un vector de expresión de Bacillus con la secuencia señal por síntesis de genes (GeneScript; NJ, USA) de las secuencias que codifican las proteínas maduras con un M agregado en el extremo N como se muestra en las SEQ ID NO 3, 5, 7 y 9.

Ejemplo 2. Mutagénesis dirigida a un sitio

La mutagénesis dirigida a un sitio se usó para producir polipéptido variante como se divulga en la presente. Las mutaciones fueron introducidas en un ácido nucleico que codifica pMS 382 que tiene la SEQ ID: 1, usando el método Quick Change™ (Stratagene, California), de acuerdo con las instrucciones suministradas con el kit con algunas modificaciones. Brevemente, se tomó una sola colonia y se inoculó en 3 ml de LB (22 g/l de Caldo Base Lennox L, Sigma) suplementado con 50 •g/ml de kanamicina (Sigma) en un tubo Falcon de 10 ml. Después de incubación durante la noche a 37ºC a 200 rpm, el cultivo fue centrifugado a 5000 rpm durante 5 min. El medio fue removido y se preparó un molde de ADN de doble hebra usando columnas de QIAGEN (QIAGEN). Los cebadores fueron diseñados de acuerdo con el protocolo del fabricante. Por ejemplo, la TABLA 1 indica los cebadores que se usaron para generar nuevas variantes basadas en la secuencia de nucleótidos de pMS382 como se muestra en la SEQ ID NO: 52.

A continuación se realizó una PCR para sintetizar la hebra mutante. La mezcla de reacción de la PCR contenía lo siguiente:

2.5 • l 10 X QuickChange tampón de multirreacción

0.75 • l QuickSolution

X • l cebadores (10 pmoles para los cebadores de 28-35 nt; 7 pmoles para los cebadores de 24-27 nt; o 5 pmoles para los cebadores de 20-23 nt)

1 • l mezcla de dNTP

X • l molde de ds-ADNe (200 ng)

1 • l QuickChange mezcla de multienzimas (2.5 U/• l) (PfuTurbo ADN polimerasa)

X • l dH2O (hasta un volumen final de 25 • l)

La reacción de PCR se realizó en un ciclador térmico Eppendorf durante 35 ciclos de desnaturalización (96ºC durante 1 min), reasociación de cebadores (62,8ºC durante 1 min), y alargamiento (65ºC durante 15 min), y luego se mantuvo a 4ºC. Para cada reacción de amplificación se agregaron 2 • l de enzima de restricción DpnI (10 U/• l), y la mezcla se incubó a 37ºC durante ~ 3 hs.

El ADN tratado con DpnI se usó luego para transformar células ultracompetentes XL10-Gold® (Stratagene). Las células XL10-Gold® fueron descongeladas en hielo. Para cada reacción de mutagénesis se agregaron 45 • l células a un tubo Falcon preenfriado. Subsiguientemente, se agregaron 2 • l de mezcla de beta-mercaptoetanol a cada tubo. La mezcla se incubó en hielo durante 10 min con haciéndola girar cada 2 min. Luego se agregaron 1,5 • l de ADN tratado con DpnI a cada alícuota de células, y la mezcla se incubó en hielo durante 30 min. La muestra fue sometida a un pulso térmico de 30 seg a 42ºC, y se colocó en hielo durante otros 2 min. Se agregaron 0,5 ml de caldo NZY* precalentado a cada muestra y se llevó a cabo la incubación a 37ºC durante 1 h con agitación a 225-250 rpm. Se colocaron en placas 200 • l de cada reacción de transformación sobre placas con LB (33,6 g/l de Lennox L Agar, Sigma) suplementado con 1% de almidón y 50 • g/ml de kanamicina. Las placas fueron incubadas durante la noche

a 37ºC. Se identificaron colonias individuales que alojaban las mutaciones deseadas por secuenciación de ADN y se sometieron a preps de plásmidos para cosechar plásmidos con las mutaciones deseadas.

Ejemplo 3. Transformación en Bacillus subtilis.

Se transformó Bacillus subtilis (cepa DB104A; Smith et al., Gene 70, 351-361 (1988)) con el ADN plásmido mutado de acuerdo con el siguiente protocolo.

A. Medios para preparación de protoplastos y transformación

2 x SMM	por litro: 342 g sacarosa (1 M); 4,72 g de maleato de sodio (0,04 M); 8,12 g de $MgC1_2 \cdot 6H_20$ (0,04 M); pH 6,5 con NaOH concentrado. Distribuir en porciones de 50 ml y colocar en autoclave durante 10 min.
4 x YT (1/2 NaCl)	2 g de extracto de levadura + 3,2 g de Triptona + 0,5 g de NaCl por 100 ml.
SMMP	mezclar volúmenes iguales de 2 x SMM y 4 x YT.
PEG	10 g de polietilenglicol 6000 (BDH) o 8000 (Sigma) en 25 ml

1 x SMM (Autoclave durante 10 min.).

B. Medios para colocación en placas/regeneración

agar	4% Difco minimal agar. Autoclave durante 15 min.
succinato de sodio	270 g/1 (1 M), pH 7,3 con HCl. Autoclave durante 15 min.
tampón fosfato	3,5 g de K_2HPO_4 + 1,5 g de KH_2PO_4 por 100 ml. Autoclave durante 15 min
$MgCl_2$	20,3 g de $MgC1_2 \cdot 6H_2O$ por 100 ml (1 M).
casaminoácidos	solución al 5% (p/v). Autoclave durante 15 min.
extracto de levadura	10 g por 100 ml, autoclave durante 15 min.
glucosa	solución al 20% (p/v). Autoclave durante 10 min.

Medio de regeneración DM3: mezclar a 60ºC (baño de agua; frasco de 500 ml):

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 de $MgCl_2$

100 ml agar fundido

Agregar antibióticos apropiados: cloranfenicol y tetraciclina, 5 • g/ml; eritromicina, l • g/ml. La selección en kanamicina es problemática en medio DM3: pueden requerirse concentraciones de 250 • g/ml.

C. Preparación de protoplastos

Usar recipientes de plástico o de vidrio libres de detergente.

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

Diluir el cultivo de una noche 20 veces en 100 ml de 2 x medio YT fresco (matraz de 250 ml) y cultivar hasta OD_{600} = 0,4-0,5 (aprox. 2 hs) a 37°C en un agitador (200-250 rev/min).

Cosechar las células por centrifugación (9000 g, 20 min, 4°C).

Remover el sobrenadante con una pipeta y volver a suspender las células en 5 ml de SMMP + 5 mg lisozima, filtrada en forma estéril.

Incubar a 37ºC en un agitador en un baño de agua (100 rpm).

Después de 30 min y luego a intervalos de 15 min, examinar muestras de 25 • l por el microscopio. Continuar la incubación hasta que 99% de las células son formadas como protoplastos (aspecto globular). Cosechar los protoplastos por centrifugación (4000 g, 20 min, RT) y retirar con una pipeta el sobrenadante. Volver a suspender el pellet suavemente en 1-2 ml de SMMP.

Los protoplastos están listos ahora para usar. Porciones (por ejemplo, 0,15 ml) pueden ser congeladas a -80ºC para uso futuro (no se requiere adición de glicerol). Aunque esto puede dar por resultado una cierta reducción de la capacidad de transformación, se pueden obtener 106 transformantes por ug de ADN con protoplastos congelados).

D. Transformación

Transferir 450 • l de PEG a un microtubo.

Mezclar 1-10 • l de ADN (0,2 • g) con 150 • l de protoplastos y agregar la mezcla al microtubo con PEG. Mezclar inmediatamente, pero suavemente.

Dejar durante 2 min a temperatura ambiente, y luego agregar 1,5 ml de SMMP y mezclar.

Cosechar los protoplastos por microcentrifugado (10 min, 13.000 rpm (10.000-12.000 g)) y retirar el sobrenadante. Remover las gotas remanentes con un papel tisú.

Agregar 300 • l de SMMP (no agitar en torbellino) e incubar durante 60-90 min a 37ºC en un agitador con baño de agua (100 rpm) para permitir la expresión de marcadores de resistencia a antibióticos. (Los protoplastos son suficientemente resuspendidos a través de la acción de agitación del baño de agua). Realizar diluciones apropiadas en 1 x SSM y colocar en placas 0,1 ml en placas de DM3.

Ejemplo 4. Fermentación de variantes en matraces de agitación.

El sustrato del matraz de agitación es preparado disolviendo lo siguiente en agua:

Extracto de levadura	2% (p/v)
Harina de soja	2% (p/v)
NaCl	0,5% (p/v)
Fosfato dipotásico	0,5% (p/v)
Agente antiespumante	0,05% (p/v)

El substrato se ajustó a pH 6,8 con ácido sulfúrico 4 N o hidróxido de sodio antes de colocar en autoclave. Se colocaron 100 ml de sustrato en un matraz de 500 ml con un baffle y se colocó en autoclave durante 30 minutos. Subsiguientemente, se agregaron 6 ml de jarabe de dextrosa estéril. El jarabe de dextrosa es preparado mezclando un volumen de 50% p/v de dextrosa con un volumen de agua seguido por colocación en autoclave durante 20 minutos.

Los matraces de agitación son inoculados con las variantes e incubados durante 24 horas a 35ºC y 180 rpm en una incubadora. Después de la incubación se separan las células del caldo por centrifugación (10.000 g en 10 minutes) y finalmente, se retiran las células del sobrenadante por microfiltración a 0,2 µm. El sobrenadante libre de células se usa para ensayos y ensayos de aplicación.

Tabla 1. Cebadores usados para generar variantes en base a la secuencia de nucleótidos de pMS382 como se muestra en la SEQ ID NO: 52.

Mutación	5' Oligosecuencia 3'	Modificación	Hebra	Propósito
Q42K	GTATAACATCCTGAGACAAaaaGCGAGCACAATTGC CG	5' fosfato	+	MSDM
Q42N	GTATAACATCCTGAGACAAaacGCGAGCACAATTGC C	5' fosfato	+	MSDM
R88L	GCATGACTTTAACAAAAACGGCctgTATGGAAGCGA TGCTC	5' fosfato	+	MSDM
R88Y	GGCATGACTTTAACAAAAACGGCtatTATGGAAGCG ATGCTCAAC	5' fosfato	+	MSDM
L88K	GGCATGACTTTAACAAAAACGGCaaaTATGGAAGC GATGCTCAAC	5' fosfato	+	MSDM
S205L	GCCCCGGAAAGAGTTGATctgTGGATGAGCGATTCA GCG	5' fosfato	+	MSDM
T235R	GTGGGATTGGAGAAATagaGCGAGCTGGCAGC	5' fosfato	+	MSDM
T235K	GTGGGATTGGAGAAATaaaGCGAGCTGGCAGC	5' fosfato	+	MSDM
T235H	GCCGTGGGATTGGAGAAATcatGCGAGCTGGCAGC AG	5' fosfato	+	MSDM
T235Q	CCGTGGGATTGGAGAAATcagGCGAGCTGGCAGCA G	5' fosfato	+	MSDM
Q240E	CGCTCCAATCTTTGATGATTTCCTGCCAGCTCGCTG	5' fosfato	-	MSDM
Q240D	CAGCGAGCTGGCAGgatATCATCAAAGATTGGAGC G	5' fosfato	+	MSDM
Q311P	CAACATAAATGGCCGCTTccgGATGGCCTTATCAGA CAG	5' fosfato	+	MSDM
A392D	GCCCTGAATAGCGATCTGgatAATCCGGGACAAGTT GC	5' fosfato	+	MSDM
A392Y	CGCCCTGAATAGCGATCTGtatAATCCGGGACAAGT TGCTAG	5' fosfato	+	MSDM
S409E	GCGAAGCAGTCAATGCCgaaAATGGCCAAGTCAGA GTCTG	5' fosfato	+	MSDM
R248H	CATCAAAGATTGGAGCGATcatGCAAAATGCCCG GTCTTTGAC	5' fosfato	+	MSDM
S266T	CGCATGCAAAATGGAacgGTCGCCGATTGGAAAC ATG	5' fosfato	+	MSDM
S377D	CTACAGTTgatGGCAGCCAACAAAC	5' fosfato	+	MSDM

Ejemplo 5. Ensayos de amilasa

Ensayo de Betamyl

Una unidad Betamyl se define como la actividad que degrada 0,0351 mmoles por 1 min de maltopentaosa acoplada con PNP de tal modo que 0,0351 mmoles de PNP por 1 min pueden ser liberados por exceso de alfa-glucosidasa en la mezcla de ensayo. La mezcla de ensayo contienes 50 ul de 50 nM citrato de Na, 5 mM de CaCl2, pH 6,5 con 25 ul de muestra de enzima y 25 ul de sustrato Betamyl (Glc5-PNP y alfa-glucosidasa) de Megazyme, Irlanda (1 vial disuelto en 10 ml de agua). La mezcla de ensayo se incubó durante 30 min a 40ºC y luego se detuvo agregando 150 ul de 4% Tris. Se midió la absorbancia a 420 nm usando un lector ELISA y se calculó la actividad de Betamyl en base a la Actividad = A420 * d en unidades Betamyl/ml de muestra de enzima ensayada. Para la dosificación en los ensayos de horneado se usaron 1 BMK = 1000 unidades Betamyl.

Ensayo de endo-amilasa

El ensayo de endo-amilasa es idéntico al ensayo Phadebas realizado de acuerdo con el fabricante (Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB).

Exo-especificidad

La relación entre la exo-actividad de amilasa y la actividad de Phadebas se usó para evaluar la exo-especificidad.

Ejemplo 6. Determinaciones de estabilidad térmica del procedimiento basadas en la actividad residual

Las muestras de enzimas en diluciones apropiadas fueron incubadas en 50 mM de tampón acetato de Na, pH 5,0 con 0,5 M de NaCl a temperatura ambiente (control) o durante 4 minutos a 80°C (muestra calentada), e inmediatamente después que la muestra control y la muestra calentada fueron analizadas usando el ensayo Betamyl. La actividad residual se calculó como la actividad Betamyl de la muestra calentada dividido por la actividad Betamyl de la muestra control.

Ejemplo 7. Efectos estabilizadores de mutaciones

Usando el procedimiento descripto en el Ejemplo 6 los efectos estabilizadores de las mutaciones Q42K, R88L, S205L, E223S, Q311P, S409E y T235K se muestran en la Tabla 2 como un aumento de la actividad residual después del calentamiento. De igual forma el efecto estabilizador de A392D se muestra en la Tabla 3, de S205L, S223A y S205L combinado con S409 en la Tabla 4, de N34Q y G100Q en la Tabla 5 y de Q240E en la Tabla 6. En las tablas 2-6, las variantes tienen la misma secuencia que la mencionada en la primera línea excepto para la o las mutaciones ulteriores realizadas como se describió en la segunda columna.

Tabla 2. Efecto estabilizador de Q42K, R88L, S205L, E223S, Q311P, S409E y T235K combinados con Q311P

Variante	Mutación ulterior en pMS382	Actividad residual (%)
pMS382 (SEQ ID NO: 1)		8,4
pMS465 (SEQ ID NO: 18)	E223S	9,6
pMS1042 (SEQ ID NO: 19)	Q311P	13,1
pMS1104 (SEQ ID NO: 20)	Q42K	11,2
pMS1153 (SEQ ID NO: 21)	R88L	19,5
pMS1286 (SEQ ID NO: 22)	T235R	12,3
pMS1284 (SEQ ID NO: 23)	T235R, Q311P	17,2
pMS1290 (SEQ ID NO: 24)	T235K	14,1
pMS1484 (SEQ ID NO: 25)	S205L	8,8
pMS1579 (SEQ ID NO: 26)	S409E	16,4

Tabla 3. Efecto estabilizador de A392D

Variante	Mutación ulterior en pMS1105	Actividad residual (%)
pMS1105 (SEQ ID NO: 27)		11,0
pMS1723 (SEQ ID NO: 28)	A392D	12,3

Tabla 4. Efecto estabilizador de S205L, S223A y S205L combinado con S409E

Variante	Mutación ulterior en pMS1776	Actividad residual (%)
pMS1776 (SEQ ID NO: 12)		18,9
pMS2104 (SEQ ID NO: 29)	S223A	22,1
pMS2138 (SEQ ID NO: 30)	S205L	22,4
pMS2022 (SEQ ID NO: 15)	S205L, S409E	23,3

Tabla 5. Efecto estabilizador de N34Q y G100Q

Variante	Mutación ulterior en pMS2124	Actividad residual (%)
pMS2124 (SEQ ID NO: 31)		24,7
pMS2177 (SEQ ID NO: 32)	N34Q	28,8

Variante	Mutación ulterior en pMS2124	Actividad residual (%)
pMS2178 (SEQ ID NO: 33)	G100Q	26,4

Tabla 6. Efecto estabilizador de Q240E

Variante	Mutación ulterior en pMS2022	Actividad residual (%)
pMS2022 (SEQ ID NO: 15)		23,3
pMS2118 (SEQ ID NO: 34)	Q240E	26,8

Ejemplo 10. Receta para los ensayos de horneado

Los ensayos de horneado fueron llevados a cabo con una receta de esponja (prefermento) y masa de pan blanco estándar para el pan de tostada de Estados Unidos. La masa de esponja es preparada a partir de 1500 g de harina "Gold Medal" de General Mills, USA, 890 g de agua, 40 g de aceite de poroto de soja, 7,5 g de GRINDSTED™ SSL P55 Veg, 10 g de emulsionante DIMODAN™ PH300, 26 g de levadura seca y ácido ascórbico (20 ppm de concentración final). La esponja es mezclada durante 1 min a baja velocidad y subsiguientemente 3 min a velocidad 2 en un mezclador de espiral Hobart. La esponja es fermentada subsiguientemente durante 3 horas a 25ºC, 85% de HR.

Luego se agregan a la esponja 500 g de harina "Gold Medal", 14 g de levadura seca, 5 g de propionato de calcio, 240 g de jarabe de maíz alto en fructosa (42%), 5 g de propionato de calcio, 250 g de agua y ácido ascórbico (30 ppm de concentración final) y 40 g de sal. La masa resultante se mezcla durante 0,5 min a baja velocidad y luego durante 10,5 min a alta velocidad en un mezclador de espiral Hobart.

La masa se deja descansar durante 5 min a temperatura ambiente, y luego trozos de masa de 794 g son pesados, moldeados en un moldeador de grano cruzado y transferido a recipientes. Después de 60 min de fermentación a 43ºC a 80% HR las masas son horneadas durante 21 min a 200ºC en un horno de bandejas Reed.

Ejemplo 11. Protocolo para la evaluación de la firmeza, la resistencia y la cohesividad

Análisis del perfil de textura del pan

La firmeza, la resistencia y la cohesividad son determinadas analizando rebanadas de pan por el Análisis de Perfil de Textura usando un Analizador de Textura de Stable Micro Systems, Reino Unido. El cálculo de la firmeza, la resistencia, y la cohesividad se realiza de acuerdo con el estándar prefijado suministrado por Stable Micro System, Reino Unido. La sonda usada es redonda de aluminio de 50 mm.

La firmeza es determinada a 40% de compresión durante la primera compresión. La cifra es la fuerza requerida para comprimir la rebanada al 40% del espesor total. Cuanto más bajo el valor, más blando es el pan. La firmeza se expresa, por ejemplo, en gramos.

Ejemplo 12. Evaluación de los efectos antiranciamiento de los polipéptidos variantes de amilasa G4

El pan fue horneado como se describió en el Ejemplo 10 con pMS1776, pMS1934, pMS2020, pMS2022 y pMS2062 en dosificaciones que variaban de 7,5 a 20 BMK/kg correspondientes a 7.500 a 20.000 unidades Betamyl/kg.

La firmeza del pan es testeada de acuerdo con el protocolo presentado en el Ejemplo 11 a diversos tiempos después del horneado. Como controles, también se horneó pan horneado con dosificaciones estándar de 600 ppm de Novamyl 1500 y/o 416,66 ppm de una composición que comprende la SEQ ID NO: 1.

Las Figs. 1 y 2 muestran los resultados de la firmeza. Con relación a los controles con dosificaciones estándar de 600 ppm de Novamyl 1500 y/o 416,66 ppm de una composición que comprende la SEQ ID NO: 1, se obtiene una reducción mucho más fuerte en la tasa de firmeza del día 3 al día 10 después del horneado con pMS1776, pMS1934, pMS2020, pMS2022 y pMS2062. Estos panes también habían mejorado mucho en cuanto a resistencia y la cohesividad con relación a los controles.

Esto indica que los polipéptidos variantes, como se describió en la presente mejoraron mucho los efectos anti-enranciamiento en comparación con Novamyl 1500 y una composición que comprende la SEQ ID NO: 1.

Ejemplo 13. Protocolo para la evaluación de la friabilidad (Resistencia a la friabilidad)

Dos rebanadas de pan son colocadas sobre un trozo de papel. Cada rebanada es dividida en 4 cuadrados mediante rupturas verticales y subsiguientemente horizontales de la rebanada.

La ruptura se realiza desmenuzando la miga con los dedos. Primero se separa la rebanada del centro de la superficie superior del pan al centro de la superficie inferior del pan. Luego, cada mitad de la rebanada original se

separa del lado de la corteza al interior de la rebanada. Los pequeños trozos de miga, que son separados de los 4 cuadrados, son retirados agitando cada trozo al menos 3 veces moviendo la mano hacia arriba y hacia abajo.

El peso de los pequeños trozos de miga separados es determinado como una medida de la friabilidad. Este ensayo puede ser denominado "Protocolo de evaluación de la friabilidad".

Ejemplo 14. Protocolo para la evaluación de la capacidad de plegado

El pan para tostadas es cortado usando un cortador de pan automático con un espesor de rebanada prefijado de 15 mm. La rebanada es plegada a mano desde la parte superior de la rebanada hacia la parte inferior, de tal modo que la dirección del pliegue es de lado a lado.

La capacidad de plegado es evaluada visualmente usando el siguiente sistema de puntuación:

Resultado	Característica
1	No plegable, la rebanada se rompe al plegar
2	Plegable, toda la rebanada se rompe dentro de 5 segundos después del plegado
3	Plegable, parte de la rebanada se rompe dentro de 5 segundos después del plegado. Otras partes se rompen después.
4	Plegable, parte de la rebanada se rompe después de 5 segundos después del plegado. Otras partes no se rompen.
5	Plegable, ninguna parte de la rebanada se rompe después del plegado.

Este ensayo puede ser denominado "Protocolo de evaluación de la capacidad de plegado".

Ejemplo 15. Preparación de jarabe DP4

Materiales:

SPEZYME FRED® licuado de almidón de maíz granular (34%ds, 9.1DE) tratado con alfa-amilasa bacteriana (Danisco US Inc., Genencor Division).

Pululanasa (OPTIMAX L-1000, Danisco US Inc., Genencor Division)

Experimental:

Se ajustó el pH del licuado de almidón a 5,2 con NaOH y luego cada 100 g de licuado fue incubado a 60ºC durante la sacarificación con DP4 dosificando enzimas a 0,03 BMK/gds. Cuando se usó pululanasa, se dosificó a 0,5 ASPU/gds. La reacción se llevó a cabo hasta 40 horas, se detuvo para el muestreo periódico para chequear el DP4 máximo. Cuando se observó el DP4 máximo, se detuvo la reacción calentando en agua hirviendo.

Resultados:

Tabla 1.

Producción (%)

Enzimas	Hs	% DP1	% DP2	% DP3	% DP4	% DP5	% DP6	% DP7	% DP8	% DP9	% DP10	% DP11+
pMS2062	16	2,31	5,50	8,67	38,00	0,81	0,17	0,67	0,99	3,23	0,39	39,30
pMS2062+PU		2,42	5,70	8,99	38,12	1,06	0,19	0,85	1,29	4,10	1,06	36,20
pMS2062	19.5	2,49	5,73	9,03	39,86	0,63	0,00	0,51	0,83	2,62	0,38	37,90
pMS2062+PU		2,60	5,89	9,45	40,37	0,88	0,00	0,70	1,18	3,65	1,19	34,10
pMS2062	22	2,59	5,69	9,20	41,16	0,56	0,00	0,45	0,75	2,27	0,37	37,00
pMS2062+PU		2,81	5,95	9,91	41,96	0,78	0,00	0,58	1,02	3,30	1,26	32,40
pMS2062	40	3,41	6,32	10,47	43,76	0,24	0,12	0,16	0,87	0,30	0,20	34,10
pMS2062+PU		3,67	7,01	11,42	45,80	0,43	0,26	0,42	2,22	1,87	0,17	26,70

Como se muestra en la Tabla 1, los resultados indicaron que PMS2062 produjo un DP4 como un producto de azúcar principal. Como también se indicó, la adición de pululanasa (PU) (PMS2062 + PU) dio por resultado una reducción más rápida de los azúcares superiores (ver, por ejemplo, DP11+), mientras que el nivel de DP4 fue afectado mínimamente.

Secuencias

SEQ ID NO: 1. Secuencia de proteínas maduras de pMS382

```
DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPYNWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSWTDGDKSGGGEGYFWHDF
NKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRFYPDKEINLPAGQRFWRNDCPDPGNGPNDCDDGDRFLGGEADLNTG
HPQIYGMFRDEFTNLRSGYGAGGFRFDFVRGYAPERVDSWMSDSADSSFCVGELWKEPSEYPPWDWRNTASWQQIIKDWSDRA
KCPVFDFALKERMQNGSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHKWPLQDGLIRQAYAYILTSPGTPVVY
WPHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQVASGSFSEAVNASNGQVRV
WRSGSGDGGGNDGG
```

SEQ ID NO: 2. Proteína madura de amilasa G4 de Pseudomonas sp. AM1 (2006) con M agregado en el extremo N (proteína Q1EJP2):

```
  1    MDLAGKSPGG VRYHGGDEII LQGFHWNVIR ESPNNWYNTL RDMAPTIAAD
 51    GFSAIWMPVP WRDFSSWSDG ANSGGGEGYF WHDFNKNGRY GSDTQLKQAA
101    GALNNAQVKV LYDVVPNHMN RGYPDKQINL PAGQGFWRND CADPGNYPND
151    CDDGDRFMGG DADLNTANPQ VYGMFRDEFA NLRSNYGAGG FRFDFVRGYA
201    GERVDSWMGA AHDNAFCVGE LWKAPAEYPS WDWRNTASWQ QVIKDWSDRA
251    KCPVFDFALK ERMQNGSIAD WKNGLNGNPD PRWREVAVTF VDNHDAGYSP
301    GQNGGQHHWA LQDGLIRQAY AYILTSPGTP VVYWSHMYDW GYGDFIRQLI
351    QVRRTAGVRA DSAISFHSGY SGLVATVSGS QQTLVVALNS DLANPGQVAS
401    GSFSEAVNAS NGQVRVWRSG SGDGGGNDGG EGGLVNVNFR CDNGVTQMGD
451    SVYAVGNVSQ LGNWSPASAV RLTDTSSYPT WKGSIALPDG QNVEWKCLIR
501    NEADATLVRQ WQSGGNNQVQ AAAGASTSGS F*
```

SEQ ID NO: 3. Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Pseudomonas sp. AM1 (2006) (Q1EJP2) con M agregado en el extremo N (ADN de QIEJP2):

```
atggatctggcaggcaaatcaccgggcggcgttagatatcatggcggcgatgaaattattctgcaaggctttcattggaatgt
tattagagaatcaccgaataattggtataatacactgagagatatggcaccgacaattgcagcagatggcttttcagcaattt
ggatgccggttccgtggagagatttttcatcatggtcagatggcgcaaattcaggcggcggcgaaggctatttttggcatgat
tttaataaaaatggcagatatggctcagatacacaactgaaacaagcagcaggcgcactgaataatgcacaagttaaagttct
gtatgatgttgttccgaatcatatgaatagaggctatccggataaacaaattaatctgccggcaggccaaggcttttggagaa
atgattgcgcagatccgggcaattatccgaatgattgcgatgatggcgatagatttatgggcggcgatgctgatctgaataca
gcaaatccgcaagtttatggcatgtttagagatgaatttgcaaatctgagatcaaattatggcgcaggcggctttagatttga
ttttgttagaggctatgcaggcgaaagagttgattcatggatgggcgcagcacatgataatgcattttgcgttggcgaactgt
ggaaagcaccggcagaatatccgtcatgggattggagaaatacagcatcatggcaacaagttattaaagattggtcagataga
gcaaaatgcccggtttttgattttgcactgaaagaaagaatgcaaaatggctcaattgcagattggaaaaatggcctgaatgg
caatccggatccgagatggagagaagttgcagttacatttgttgataatcatgatgcaggctattcaccgggccaaaatggcg
gccaacatcattgggcactgcaagatggcctgattagacaagcatatgcatatattctgacatcaccgggcacaccggttgtt
tattggtcacatatgtatgattggggctatggcgattttattagacaactgattcaagttagaagaacagcaggcgttagagc
agattcagcaatttcatttcattcaggctattcaggcctggttgcaacagtttcaggctcacaacaaacactggttgttgcac
tgaatagcgatctggcaaatccgggccaagttgcatcaggctcattttcagaagcagttaatgcatcaaatggccaagttaga
gtttggagatcaggctcaggcgatggcggcggcaatgatggcggcgaaggcggcctggttaatgttaattttagatgcgataa
tggcgttacacaaatgggcgattcagtttatgcagttggcaatgtttcacaactgggcaattggtcaccggcatcagcagtta
gactgacagatacatcatcatatccgacatggaaaggctcaattgcactgccggatggccaaaatgttgaatggaaatgcctg
attagaaatgaagcagatgcaacactggttagacaatggcaatcaggcggcaataatcaagttcaagcagcaggcgcatc
aacatcaggctcattttaa
```

SEQ ID NO: 4. Proteína madura de amilasa G4 de Pseudomonas sp. 7193 con M agregado en el extremo N (proteína A5CVD5):

```
  1    MDLAGKSPGG VRYHGGDEII LQGFHWNVIR ESPNNWYNTL RDMAPTIAAD
 51    GFSAIWMPVP WRDFSSWSDG ANSGGGEGYF WHDFNKNGRY GSDTQLKQAA
101    GALNNAQVKV LYDAVPNHMN RGYPDKQINL PAGQGFWRND CADPGNYPND
151    CDDGDRFMGG DADLNTANPQ VYGMFRDEFA NLRSNYGAGG FRFDFVRGYA
201    GERVDSWMGD GACQRLLRGR ALEGTGRIPE LGLAQYGQLA AVIKDWSDRA
251    KVPGCSNFAL KGAHAERLPS PTGRTASTAT PMPRWREVAV TFVDNHDTGY
301    SPGQNGGQHH WALRDDLVRQ AYAYILASPG TPVVYWSHMY DWGHGPLIRQ
351    LIQIRRAAGV RADSAIEFHS GYSGLVATVR GTAQTLVMAL GSNLSSPAEV
401    SSGSFSQALN QDSGQLRIWT TGSTGGDEGD GGGDGTMVSV NFRCDNGITQ
451    PGDSVYAVGS LAQLGSWSPA NAVRLTDVSN YPTWKGAISL PAGQAVEWKC
501    IVRSEADPTQ VRQWQAGDNN RVTAGAGATT IGRL*
```

SEQ ID NO: 5. Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Pseudomonas sp. 7193 (A5CVD5) con M agregado en el extremo N (A5CVD5 DNA):

```
atggatctggcaggcaaatcaccgggcggcgttagatatcatggcggcgatgaaattattctgcaaggctttcattggaatgt
tattagagaatcaccgaataattggtataatacactgagagatatggcaccgacaattgcagcagatggcttttcagcaattt
ggatgccggttccgtggagagatttttcatcatggtcagatggcgcaaattcaggcggcggcgaaggctatttttggcatgat
tttaataaaaatggcagatatggctcagatacacaactgaaacaagcagcaggcgcactgaataatgcacaagttaaagttct
gtatgatgcagttccgaatcatatgaatagaggctatccggataaacaaattaatctgccggcaggccaaggcttttggagaa
atgattgcgcagatccgggcaattatccgaatgattgcgatgatggcgatagatttatgggcggcgatgctgatctgaataca
gcaaatccgcaagtttatggcatgtttagagatgaatttgcaaatctgagatcaaattatggcgcaggcggctttagatttga
ttttgttagaggctatgcaggcgaaagagttgattcatggatgggcgatggcgcatgccaaagactgctgagaggcagagcac
tggaaggcacaggcagaattccggaactgggcctggcacaatatggccaactggcagcagttattaaagattggtcagataga
gcaaaagttccgggctgctcaaattttgcactgaaaggcgcacatgcagaaagactgccgtcaccgacaggcagaacagcatc
aacagcaacaccgatgccgagatggagagaagttgcagttacatttgttgataatcatgatacaggctattcaccgggccaaa
atggcggccaacatcattgggcactgagagatgatctggttagacaagcatatgcatatattctggcatcaccgggcacaccg
gttgtttattggtcacatatgtatgattggggtcatggaccgctgattagacaactgattcaaattagaagagcagcaggcgt
tagagcagattcagcaattgaatttcattcaggctattcaggcctggttgcaacagttagaggcacagcacaaacactggtta
tggcactgggctcaaatctgtcatcaccggcagaagtttcatcaggctcattttcacaagcactgaatcaagattcaggccaa
ctgagaatttggacaacaggctcaacaggcggcgatgaaggcgatggcggcggcgatggcacaatggtttcagttaattttag
atgcgataatggcattacacaaccgggcgattcagtttatgcagttggctcactggcacaactgggctcatggtcaccggcaa
atgcagttagactgacagatgtttcaaattatccgacatggaaaggcgcaatttcactgccggcaggccaagcagttgaatgg
aaatgcattgttagatcagaagcagatccgacacaagttagacaatggcaagcaggcgataataatagagttacagcaggcgc
aggcgcaacaacaattggcagactgtaa
```

SEQ ID NO: 6. Proteína madura de amilasa G4 de Pseudomonas mendocina (cepa ymp) con M agregado en el extremo N (proteína A4XX23):

```
  1    MDAPGKTASG VRYHGGDEII LQGFHWNTVR TSSNWYATLA SMAPTLAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWSDPG NGTSGGGEGY FWHDFNKNGR YGSDSLLRQA
101    ASALNAAGVK PIYDVVPNHM NRGYPDKEIN LPAGQGLWRH DCNDPGNYAN
151    DCDDGDRFMG GDADLNTGHP QNYAMFRDEF ARLRSQYGAG GFRFDFVRGY
201    AGERVASWMS DAHDNGFCLG ELWKAPGEYP SWDWRNGASW QQILKDWSDR
251    AKCTVFDFAL KERMQNGGIA DWRHGLNGNP DARWREVAVT FVDNHDTGYS
301    PGPHGGQHHW PLPDARLKQA YAYILSSPGT PVVYWPHMYD WGHGDFIRQL
351    IQIRRAAGVK AASAIQFHTG FSGLVATISG SQQQLLIALD SNLSSPGQVA
401    SGDFTQALNT DNGAIRIWRS GQGGGDGQGN LVSVNFRCDN GVTQWGDSVY
451    ALGNVTQLGN WSPAGAVRLT DTSAYPTWKG SIALPAGQQV QWKCIVRSES
501    NPTQVKTWQP GGNNSVTVAS GASTAGSF*
```

SEQ ID NO: 7. Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Pseudomonas mendocina (cepa ymp) (A4XX23) con M agregado en el extremo N: (A4XX23 DNA):

```
atggatgcaccgggcaaaacagcatcaggcgttagatatcatggcggcgatgaaattattctgcaaggctttcattggaatac
agttagaacatcatcaaattggtatgcaacactggcatcaatggcaccgacactggcagcagatggcttttcagcaatttgga
tgccggttccgtggagagatttttcatcatggtcagatccgggcaatggcacatcaggcggcggcgaaggctatttttggcat
gattttaataaaaatggcagatatggctcagattcactgctgagacaagcagcatcagcactgaatgcagcaggcgtttaaacc
gatttatgatgttgttccgaatcatatgaatagaggctatccggataaagaaattaatctgccggcaggccaaggcctgtgga
gacatgattgcaatgatccgggcaattatgcaaatgattgcgatgatggcgatagatttatgggcggcgatgctgatctgaat
acaggccatccgcaaaattatgcaatgtttagagatgaatttgcaagactgagatcacaatatggcgcaggcggctttagatt
tgattttgttagaggctatgcaggcgaaagagttgcatcatggatgtcagatgcacatgataatggcttttgcctgggcgaac
tgtggaaagcaccgggcgaatatccgtcatgggattggagaaatggcgcatcatggcaacaaattctgaaagattggtcagat
agagcaaaatgcacagtttttgattttgcactgaaagaaagaatgcaaaatggcggcattgcagattggagacatggcctgaa
tggcaatccggatgcaagatggagagaagttgcagttacatttgttgataatcatgatacaggctattcaccgggcccgcatg
gcggccaacatcattggccgctgccggatgcaagactgaaacaagcatatgcatatattctgtcatcaccgggcacaccggtt
gtttattggccgcatatgtatgattggggtcatggagattttattagacaactgattcaaattagaagagcagcaggcgttaa
agcagcatcagcaattcaatttcatacaggcttttcaggcctggttgcaacaatttcaggctcacaacaacaactgctgattg
cactggattcaaatctgtcatcaccgggccaagttgcatcaggcgattttacacaagcactgaatacagataatggcgcaatt
agaatttggagatcaggccaaggcggcggcgatggccaaggcaatctggtttcagttaattttagatgcgataatggcgttac
acaatggggcgattcagtttatgcactgggcaatgttacacaactgggcaattggtcaccggcaggcgcagttagactgacag
atacatcagcatatccgacatggaaaggctcaattgcactgccggcaggccaacaagttcaatggaaatgcattgttagatca
gaatcaaatccgacacaagttaaaacatggcaaccgggcggcaataattcagttacagttgcatcaggcgcatcaacagcagg
ctcattttaa
```

SEQ ID NO: 8. Proteína madura de amilasa G4 de Hahella chejuensis (cepa KCTC 2396) con M agregado en el extremo N (proteína Q2SEA8):

```
  1    MESSGKSGAG VRFHGGDEII LQGFHWNVVR TAERNWYNIL QSKAQQISED
 51    GFTAIWMPVP WRDNSSWQAS SDTRFGGEGY FWADMDKNSR YGDDGQLKQA
101    ASALKNKGVK VIYDIVPNHH DRGHSNDSLN LPSGQGYYRS DCSSCDDGDP

151    FMDGGSDFST AHPDVYDLFK NELVNLKTNY SAGGFRFDFV RGYAPERISA
201    WMSASLDSGY CVGELWKGPS EYPSWDWRHS ASWQEILKDF TDASDCSVFD
251    FALKERMQNG SISDWRYGLN GNPSAQWREV AVTFVDNHDT GYSPGPLGGQ
301    HHWALPDWKR KMAYAYILSS PGTPVVYWPH MYDWGMRDFI RNLIQLRKSA
351    GVKAYSGVQF HDGFSGLVGT TSGSNGKLLF AIDSNFSSPN QVAGGAWNLA
401    VNEDNGRIRI WRQ*
```

SEQ ID NO: 9. Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Hahella chejuensis (cepa KCTC 2396) con M agregado en el extremo N (ADN de Q2SEA8):

```
atggaatcatcaggcaaatcaggcgcaggcgttagatttcatggcggcgatgaaattattctgcaaggctttcattggaacgt
tgttagaacagcagaaagaaactggtacaacatcctgcaatcaaaagcacaacaaatttcagaagatggctttacagcaattt
ggatgccggttccgtggagagataattcatcatggcaagcatcatcagatacaagatttggcggcgaaggctatttttgggca
gatatggataaaaattcaagatatggcgatgatggccaactgaaacaagcagcatcagcactgaaaaataaaggcgttaaagt
tatttatgatattgttccgaatcatcatgatagaggccattcaaatgattcactgaatctgccgtcaggccaaggctattata
gatcagattgctcatcatgcgatgatggcgatccgtttatggatggcggctcagattttcaacagcacatccggatgtttac
gatctgtttaaaaacgaactggttaacctgaaaacaaactactcagcaggcggctttagatttgattttgttagaggctatgc
accggaaagaatttcagcatggatgtcagcatcactggattcaggctattgcgttggcgaactgtggaaaggcccgtcagaat
atccgtcatgggattggagacattcagcatcatggcaagaaattctgaaagattttacagatgcatcagattgctcagttttt
gattttgcactgaaagaaagaatgcaaaatggctcaatttcagattggagatatggcctgaatggcaatccgtcagcacaatg
gagagaagttgcagttacatttgttgataatcatgatacaggctattcaccgggcccgctgggcggccaacatcattgggcac
tgccggattggaaaagaaaaatggcatatgcatatattctgtcatcaccgggcacaccggttgtttattggccgcatatgtat
gattggggcatgagagattttattagaaatctgattcaactgagaaaatcagcaggcgttaaagcatattcaggcgttcaatt
tcatgatggcttttcaggcctggttggcacaacatcaggctcaaatggcaaactgctgtttgcaattgattcaaatttttcat
caccgaatcaagttgcaggcggcgcatggaatctggcagttaatgaagataatggcagaattagaatttggagacaataa
```

SEQ ID NO: 10. >gi|77787|pir||S05667 proteína madura glucano 1,4-alfa-maltotetraohidrolasa (EC 3.2.1.60) sin la secuencia señal - Pseudomonas saccharophila

```
DQAGKSPAGVRYHGGDEIILQGFHWNVVREAPNDWYNILRQQASTIAADGFSAIWMPVPWRDFSSWTDGGKSGGGEGYFWHDF
NKNGRYGSDAQLRQAAGALGGAGVKVLYDVVPNHMNRGYPDKEINLPAGQGFWRNDCADPGNYPNDCDDGDRFIGGESDLNTG
HPQIYGMFRDELANLRSGYGAGGFRFDFVRGYAPERVDSWMSDSADSSFCVGELWKGPSEYPSWDWRNTASWQQIIKDWSDRA
KCPVFDFALKERMQNGSVADWKHGLNGNPDPRWREVAVTFVDNHDTGYSPGQNGGQHHWALQDGLIRQAYAYILTSPGTPVVY
WSHMYDWGYGDFIRQLIQVRRTAGVRADSAISFHSGYSGLVATVSGSQQTLVVALNSDLANPGQVASGSFSEAVNASNGQVRV
WRSGSGDGGGNDGGEGGLVNVNFRCDNGVTQMGDSVYAVGNVSQLGNWSPASAVRLTDTSSYPTWKGSIALPDGQNVEWKCLI
RNEADATLVRQWQSGGNNQVQAAAGASTSGSF
```

SEQ ID NO: 11. Péptido señal de glucano 1,4-alfa-maltotetraohidrolasa (EC 3.2.1.60) - Pseudomonas saccharophila

MSHILRAAVLAAVLLPFPALA

SEQ ID NO: 12. Secuencia de proteínas maduras de pMS1776

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 13. Secuencia de proteínas maduras de pMS1934

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKKPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KDGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 14 Secuencia de proteínas maduras de pMS2020

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG


 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 15 Secuencia de proteínas maduras de pMS2022

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 16 Secuencia de proteínas maduras de pMS2062

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKKPSEYPPW DWRNRASWQE IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 17 Secuencia de proteínas maduras de pMS2171

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 18 Secuencia de proteínas maduras de pMS465:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 19 Secuencia de proteínas maduras de pMS1042:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 20 Secuencia de proteínas maduras de pMS1104:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 21 Secuencia de proteínas maduras de pMS1153:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 22 Secuencia de proteínas maduras de pMS1286:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 23 Secuencia de proteínas maduras de pMS1284:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 24 Secuencia de proteínas maduras de pMS1290:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNKASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 25 Secuencia de proteínas maduras de pMS1484:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP

201    ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 26 Secuencia de proteínas maduras de pMS1579:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QQASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKEPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401    SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 27 Secuencia de proteínas maduras de pMS1105:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LANPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 28 Secuencia de proteínas maduras de pMS1723:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGRYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNTASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL QDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 29 Secuencia de proteínas maduras de pMS2104:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDSWMSDS ADSSFCVGEL WKAPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 30 Secuencia de proteínas maduras de pMS2138:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNRASWQQ IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNASN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 31 Secuencia de proteínas maduras de pMS2124:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKKPSEYPPW DWRNRASWQE IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 32 Secuencia de proteínas maduras de pMS2177:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYQWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKKPSEYPPW DWRNRASWQE IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 33 Secuencia de proteínas maduras de pMS2178:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAQ
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKKPSEYPPW DWRNRASWQE IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 34 Secuencia de proteínas maduras de pMS2118:

```
  1    DQAGKSPAGV RYHGGDEIIL QGFHWNVVRE APYNWYNILR QKASTIAADG
 51    FSAIWMPVPW RDFSSWTDGD KSGGGEGYFW HDFNKNGLYG SDAQLRQAAG
101    ALGGAGVKVL YDVVPNHMNR FYPDKEINLP AGQRFWRNDC PDPGNGPNDC
151    DDGDRFLGGE ADLNTGHPQI YGMFRDEFTN LRSGYGAGGF RFDFVRGYAP
201    ERVDLWMSDS ADSSFCVGEL WKSPSEYPPW DWRNRASWQE IIKDWSDRAK
251    CPVFDFALKE RMQNGSVADW KHGLNGNPDP RWREVAVTFV DNHDTGYSPG
301    QNGGQHKWPL PDGLIRQAYA YILTSPGTPV VYWPHMYDWG YGDFIRQLIQ
351    VRRTAGVRAD SAISFHSGYS GLVATVSGSQ QTLVVALNSD LDNPGQVASG
401    SFSEAVNAEN GQVRVWRSGS GDGGGNDGG*
```

SEQ ID NO: 35. Secuencia Enlazadora

GSGDGGGNDGG

SEQ ID NO: 36: Secuencia de PS4 SBD:

```
  1    EGGLVNVNFR CDNGVTQMGD SVYAVGNVSQ LGNWSPASAV RLTDTSSYPT
 51    WKGSIALPDG QNVEWKCLIR NEADATLVRQ WQSGGNNQVQ AAAGASTSGS
101    F*
```

SEQ ID NO: 37

HGGDEIILQFHWN

SEQ ID NO: 38

DGF-X1-AIW-X2-p-X3-PWRD-X4-SSW

SEQ ID NO: 39 GGEGYFW

SEQ ID NO: 40 VPNH

SEQ ID NO: 41 CDDGD

SEQ ID NO: 42 AGGFRFDFVRG

SEQ ID NO: 43 FALK

SEQ ID NO: 44 WREVAVTFVDNHD

SEQ ID NO: 45 GYSPG

SEQ ID NO: 46 GQH

SEQ ID NO: 47 AYAYI

SEQ ID NO: 48 SPGTP

SEQ ID NO: 49 VYW

SEQ ID NO: 50 HMYDWG

SEQ ID NO: 51: Novamyl:

SSSASVKGDVIYQIIIDRFYDGDTTNNNPAKSYGLYDPTKSKWKMYWGGDLEGVRQKLPYLKQLGVTTIWLSPVLDNLDTLAG
TDNTGYHGYWTRDFKQIEEHFGNWTTFDTLVNDAHQNGIKVIVDFVPNHSTPFKANDSTFAEGGALYNNGTYMGNYFDDATKG
YFHHNGDISNWDDRYEAQWKNFTDPAGFSLADLSQENGTIAQYLTDAAVQLVAHGADGLRIDAVKHFNSGFSKSLADKLYQKK
DIFLVGEWYGDDPGTANHLEKVRYANNSGVNVLDFDLNTVIRNVFGTFTQTMYDLNNMVNQTGNEYKYKENLITFIDNHDMSR
FLSVNSNKANLHQALAFILTSRGTPSIYYGTEQYMAGGNDPYNRGMMPAFDTTTTAFKEVSTLAGLRRNNAAIQYGTTTQRWI
NNDVYIYERKFFNDVVLVAINRNTQSSYSISGLQTALPNGSYADYLSGLLGGNGISVSNGSVASFTLAPGAVSVWQYSTSASA
PQIGSVAPNMGIPGNVVTIDGKGFGTTQGTVTFGGVTATVKSWTSNRIEVYVPNMAAGLTDVKVTAGGVSSNLYSYNILSGTQ
TSVVFTVKSAPPTNLGDKIYLTGNIPELGNWSTDTSGAVNNAQGPLLAPNYPDWFYVFSVPAGKTIQFKFFIKRADGTIQWEN
GSNHVATTPTGATGNITVTWQN

SEQ ID NO: 52: Secuencia de nucleótidos de pMS382:

```
   1 gatcaagcag gaaaaagccc ggcaggcgtc agatatcatg gcggcgatga aatcatcctt
  61 cagggctttc attggaacgt cgtcagagaa gcgccgtata actggtataa catcctgaga
 121 caacaagcga gcacaattgc cgctgatggc ttttccgcaa tctggatgcc ggttccgtgg
 181 agagatttta gcagctggac ggatggagat aaaagcggag gcggcgaagg atatttttgg
 241 catgacttta acaaaaacgg ccgctatgga agcgatgctc aactgagaca agcagcagga
 301 gcacttggag gagcaggagt caaagtcctg tacgatgtcg tcccgaacca tatgaaccgc
 361 ttttatccgg acaaagaaat caatctgccg gcaggccaaa gattttggag aaacgattgc
 421 ccggacccgg gaaatggacc gaatgattgc gatgatggcg atagatttct gggcggcgaa
 481 gcggatctga atacaggcca tccgcaaatc tatggcatgt ttcgggacga atttacgaat
 541 ctgagaagcg gatatggagc gggcggattt cgctttgatt ttgtcagagg ctatgccccg
 601 gaaagagttg atagctggat gagcgattca gcggatagca gcttttgcgt cggcgaactt
 661 tggaaagaac cgagcgaata tccgccgtgg gattggagaa atacagcgag ctggcagcag
 721 atcatcaaag attggagcga tagagcaaaa tgcccggtct ttgactttgc cctgaaagaa
 781 cgcatgcaaa atggaagcgt cgccgattgg aaacatggcc tgaacggaaa tccggacccg
 841 agatggagag aagtcgccgt cacgtttgtc gataaccatg acacaggata tagcccggga
 901 caaaatggag gacaacataa atggccgctt caagatggcc ttatcagaca ggcgtatgcc
 961 tatatcctta catcaccggg aacaccggtt gtttattggc cgcatatgta tgattggggc
1021 tatggcgatt tcatccgcca actgatccag gttagaagaa cagcaggagt cagagcggat
1081 agcgccatta gctttcatag cggctatagc ggacttgtcg ctacagttag cggcagccaa
1141 caaacactgg tcgtcgccct gaatagcgat ctggcaaatc cgggacaagt tgctagcggc
1201 agctttagcg aagcagtcaa tgccagcaat ggccaagtca gagtctggag aagcggaagc
1261 ggagatggag gaggaaatga cggaggataa
```

Nota: El extremo N derivado de esta secuencia de nucleótidos es DQA... Sin embargo, el constructo final se puede extender en el extremo 5’ con atg para codificar M en el extremo N.

Listado de secuencias

<110> DuPont Nutrition Biosciences Aps

<120> Polipéptidos de amilasa

<130> P109558EPAA

<150> PCT/EP2010/056913
<151> 19-05-2009

<150> EP 09160655.8
<151> 19-05-2009

<150> US 61/179.525
<151> 19-05-2009

<160> 72

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS382

<400> 1

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                  10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125
```

```
Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380
```

```
Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 2
<211> 531
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Proteína madura de amilasa G4 de Pseudomonas sp. AM1 (2006) con M agregado en el extremo N (proteína Q1EJP2)

<400> 2

```
Met Asp Leu Ala Gly Lys Ser Pro Gly Gly Val Arg Tyr His Gly Gly
1               5                   10                  15

Asp Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Ile Arg Glu Ser
            20                  25                  30

Pro Asn Asn Trp Tyr Asn Thr Leu Arg Asp Met Ala Pro Thr Ile Ala
        35                  40                  45

Ala Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe
    50                  55                  60

Ser Ser Trp Ser Asp Gly Ala Asn Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe
65                  70                  75                  80

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

Lys Gln Ala Ala Gly Ala Leu Asn Asn Ala Gln Val Lys Val Leu Tyr
            100                 105                 110

Asp Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Gly Tyr Pro Asp Lys Gln Ile
        115                 120                 125

Asn Leu Pro Ala Gly Gln Gly Phe Trp Arg Asn Asp Cys Ala Asp Pro
    130                 135                 140

Gly Asn Tyr Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Met Gly Gly
145                 150                 155                 160
```

```
Asp Ala Asp Leu Asn Thr Ala Asn Pro Gln Val Tyr Gly Met Phe Arg
                165                 170                 175

Asp Glu Phe Ala Asn Leu Arg Ser Asn Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg
            180                 185                 190

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

Gly Ala Ala His Asp Asn Ala Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ala
    210                 215                 220

Pro Ala Glu Tyr Pro Ser Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln
225                 230                 235                 240

Gln Val Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp
                245                 250                 255

Phe Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Ile Ala Asp Trp Lys
            260                 265                 270

Asn Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val
        275                 280                 285

Thr Phe Val Asp Asn His Asp Ala Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly
    290                 295                 300

Gly Gln His His Trp Ala Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr
305                 310                 315                 320

Ala Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Ser His
                325                 330                 335

Met Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val
            340                 345                 350

Arg Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser
        355                 360                 365

Gly Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu
    370                 375                 380

Val Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser
385                 390                 395                 400

Gly Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val
                405                 410                 415
```

```
Trp Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly Glu Gly
            420                 425                 430

Gly Leu Val Asn Val Asn Phe Arg Cys Asp Asn Gly Val Thr Gln Met
        435                 440                 445

Gly Asp Ser Val Tyr Ala Val Gly Asn Val Ser Gln Leu Gly Asn Trp
    450                 455                 460

Ser Pro Ala Ser Ala Val Arg Leu Thr Asp Thr Ser Ser Tyr Pro Thr
465                 470                 475                 480

Trp Lys Gly Ser Ile Ala Leu Pro Asp Gly Gln Asn Val Glu Trp Lys
                485                 490                 495

Cys Leu Ile Arg Asn Glu Ala Asp Ala Thr Leu Val Arg Gln Trp Gln
            500                 505                 510

Ser Gly Gly Asn Asn Gln Val Gln Ala Ala Ala Gly Ala Ser Thr Ser
        515                 520                 525

Gly Ser Phe
    530
```

<210> 3
<211> 1596
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Pseudomonas sp. AM1 (2006) (Q1EJP2) con M agregado en el extremo N (ADN de Q1EJP2):

<400> 3

```
atggatctgg caggcaaatc accgggcggc gttagatatc atggcggcga tgaaattatt      60

ctgcaaggct ttcattggaa tgttattaga gaatcaccga ataattggta taatacactg     120

agagatatgg caccgacaat tgcagcagat ggcttttcag caatttggat gccggttccg     180

tggagagatt tttcatcatg gtcagatggc gcaaattcag gcggcggcga aggctatttt     240

tggcatgatt ttaataaaaa tggcagatat ggctcagata cacaactgaa acaagcagca     300

ggcgcactga ataatgcaca agttaaagtt ctgtatgatg ttgttccgaa tcatatgaat     360

agaggctatc cggataaaca aattaatctg ccggcaggcc aaggcttttg gagaaatgat     420

tgcgcagatc cgggcaatta tccgaatgat tgcgatgatg gcgatagatt tatgggcggc     480

gatgctgatc tgaatacagc aaatccgcaa gtttatggca tgtttagaga tgaatttgca     540

aatctgagat caaattatgg cgcaggcggc tttagatttg attttgttag aggctatgca     600
```

ggcgaaagag ttgattcatg gatgggcgca gcacatgata atgcattttg cgttggcgaa 660

ctgtggaaag caccggcaga atatccgtca tgggattgga gaaatacagc atcatggcaa 720

caagttatta aagattggtc agatagagca aaatgcccgg tttttgattt tgcactgaaa 780

gaaagaatgc aaaatggctc aattgcagat tggaaaaatg gcctgaatgg caatccggat 840

ccgagatgga gagaagttgc agttacattt gttgataatc atgatgcagg ctattcaccg 900

ggccaaaatg gcggccaaca tcattgggca ctgcaagatg gcctgattag acaagcatat 960

gcatatattc tgacatcacc gggcacaccg gttgtttatt ggtcacatat gtatgattgg 1020

ggctatggcg attttattag acaactgatt caagttagaa gaacagcagg cgttagagca 1080

gattcagcaa tttcatttca ttcaggctat tcaggcctgg ttgcaacagt ttcaggctca 1140

caacaaacac tggttgttgc actgaatagc gatctggcaa atccgggcca agttgcatca 1200

ggctcatttt cagaagcagt taatgcatca aatggccaag ttagagtttg gagatcaggc 1260

tcaggcgatg gcggcggcaa tgatggcggc gaaggcggcc tggttaatgt taattttaga 1320

tgcgataatg gcgttacaca aatgggcgat tcagtttatg cagttggcaa tgtttcacaa 1380

ctgggcaatt ggtcaccggc atcagcagtt agactgacag atacatcatc atatccgaca 1440

tggaaaggct caattgcact gccggatggc caaaatgttg aatggaaatg cctgattaga 1500

aatgaagcag atgcaacact ggttagacaa tggcaatcag gcggcaataa tcaagttcaa 1560

gcagcagcag gcgcatcaac atcaggctca ttttaa 1596

<210> 4
<211> 534
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Proteína madura de amilasa G4 de Pseudomonas sp. 7193 con M agregado en el extremo N (proteína A5CVD5)

<400> 4

Met Asp Leu Ala Gly Lys Ser Pro Gly Gly Val Arg Tyr His Gly Gly
1 5 10 15

Asp Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Ile Arg Glu Ser
20 25 30

Pro Asn Asn Trp Tyr Asn Thr Leu Arg Asp Met Ala Pro Thr Ile Ala
35 40 45

Ala Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe
50 55 60

```
Ser Ser Trp Ser Asp Gly Ala Asn Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe
65                  70                  75                  80

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

Lys Gln Ala Ala Gly Ala Leu Asn Asn Ala Gln Val Lys Val Leu Tyr
            100                 105                 110

Asp Ala Val Pro Asn His Met Asn Arg Gly Tyr Pro Asp Lys Gln Ile
        115                 120                 125

Asn Leu Pro Ala Gly Gln Gly Phe Trp Arg Asn Asp Cys Ala Asp Pro
    130                 135                 140

Gly Asn Tyr Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Met Gly Gly
145                 150                 155                 160

Asp Ala Asp Leu Asn Thr Ala Asn Pro Gln Val Tyr Gly Met Phe Arg
                165                 170                 175

Asp Glu Phe Ala Asn Leu Arg Ser Asn Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg
            180                 185                 190

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

Gly Asp Gly Ala Cys Gln Arg Leu Leu Arg Gly Arg Ala Leu Glu Gly
    210                 215                 220

Thr Gly Arg Ile Pro Glu Leu Gly Leu Ala Gln Tyr Gly Gln Leu Ala
225                 230                 235                 240

Ala Val Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Val Pro Gly Cys Ser
                245                 250                 255

Asn Phe Ala Leu Lys Gly Ala His Ala Glu Arg Leu Pro Ser Pro Thr
            260                 265                 270

Gly Arg Thr Ala Ser Thr Ala Thr Pro Met Pro Arg Trp Arg Glu Val
        275                 280                 285

Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln
    290                 295                 300

Asn Gly Gly Gln His His Trp Ala Leu Arg Asp Asp Leu Val Arg Gln
305                 310                 315                 320
```

```
Ala Tyr Ala Tyr Ile Leu Ala Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp
                325                 330                 335

Ser His Met Tyr Asp Trp Gly His Gly Pro Leu Ile Arg Gln Leu Ile
            340                 345                 350

Gln Ile Arg Arg Ala Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Glu Phe
        355                 360                 365

His Ser Gly Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Arg Gly Thr Ala Gln
    370                 375                 380

Thr Leu Val Met Ala Leu Gly Ser Asn Leu Ser Ser Pro Ala Glu Val
385                 390                 395                 400

Ser Ser Gly Ser Phe Ser Gln Ala Leu Asn Gln Asp Ser Gly Gln Leu
                405                 410                 415

Arg Ile Trp Thr Thr Gly Ser Thr Gly Gly Asp Glu Gly Asp Gly Gly
            420                 425                 430

Gly Asp Gly Thr Met Val Ser Val Asn Phe Arg Cys Asp Asn Gly Ile
        435                 440                 445

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

Gly Ser Trp Ser Pro Ala Asn Ala Val Arg Leu Thr Asp Val Ser Asn
465                 470                 475                 480

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

Glu Trp Lys Cys Ile Val Arg Ser Glu Ala Asp Pro Thr Gln Val Arg
            500                 505                 510

Gln Trp Gln Ala Gly Asp Asn Asn Arg Val Thr Ala Gly Ala Gly Ala
        515                 520                 525

Thr Thr Ile Gly Arg Leu
    530
```

<210> 5
<211> 1605
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Pseudomonas sp. 7193 (A5CVD5) con M agregado en el extremo N (ADN de A5CVD5)

<400> 5

atggatctgg caggcaaatc accgggcggc gttagatatc atggcggcga tgaaattatt 60

ctgcaaggct ttcattggaa tgttattaga gaatcaccga ataattggta taatacactg 120

agagatatgg caccgacaat tgcagcagat ggcttttcag caatttggat gccggttccg 180

tggagagatt tttcatcatg gtcagatggc gcaaattcag gcggcggcga aggctatttt 240

tggcatgatt ttaataaaaa tggcagatat ggctcagata cacaactgaa acaagcagca 300

ggcgcactga ataatgcaca agttaaagtt ctgtatgatg cagttccgaa tcatatgaat 360

agaggctatc cggataaaca aattaatctg ccggcaggcc aaggctttg gagaaatgat 420

tgcgcagatc cgggcaatta tccgaatgat tgcgatgatg gcgatagatt tatgggcggc 480

gatgctgatc tgaatacagc aaatccgcaa gtttatggca tgtttagaga tgaatttgca 540

aatctgagat caaattatgg cgcaggcggc tttagatttg attttgttag aggctatgca 600

ggcgaaagag ttgattcatg gatgggcgat ggcgcatgcc aaagactgct gagaggcaga 660

gcactggaag gcacaggcag aattccggaa ctgggcctgg cacaatatgg ccaactggca 720

gcagttatta aagattggtc agatagagca aaagttccgg gctgctcaaa ttttgcactg 780

aaaggcgcac atgcagaaag actgccgtca ccgacaggca gaacagcatc aacagcaaca 840

ccgatgccga gatggagaga agttgcagtt acatttgttg ataatcatga tacaggctat 900

tcaccgggcc aaaatggcgg ccaacatcat tgggcactga gagatgatct ggttagacaa 960

gcatatgcat atattctggc atcaccgggc acaccggttg tttattggtc acatatgtat 1020

gattggggtc atggaccgct gattagacaa ctgattcaaa ttagaagagc agcaggcgtt 1080

agagcagatt cagcaattga atttcattca ggctattcag gcctggttgc aacagttaga 1140

ggcacagcac aaacactggt tatggcactg ggctcaaatc tgtcatcacc ggcagaagtt 1200

tcatcaggct cattttcaca agcactgaat caagattcag gccaactgag aatttggaca 1260

acaggctcaa caggcggcga tgaaggcgat ggcggcggcg atggcacaat ggtttcagtt 1320

aattttagat gcgataatgg cattacacaa ccgggcgatt cagtttatgc agttggctca 1380

ctggcacaac tgggctcatg gtcaccggca aatgcagtta gactgacaga tgtttcaaat 1440

tatccgacat ggaaaggcgc aatttcactg ccggcaggcc aagcagttga atggaaatgc 1500

attgttagat cagaagcaga tccgacacaa gttagacaat ggcaagcagg cgataataat 1560

agagttacag caggcgcagg cgcaacaaca attggcagac tgtaa 1605

<210> 6
<211> 528
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteína madura de amilasa G4 de Pseudomonas mendocina (CEPA ymp) con M agregado en el extremo N (proteína A4XX23)

<400> 6

```
Met Asp Ala Pro Gly Lys Thr Ala Ser Gly Val Arg Tyr His Gly Gly
1               5                  10                  15

Asp Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Thr Val Arg Thr Ser
            20                  25                  30

Ser Asn Trp Tyr Ala Thr Leu Ala Ser Met Ala Pro Thr Leu Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Ser Asp Pro Gly Asn Gly Thr Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr
65                  70                  75                  80

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

Leu Arg Gln Ala Ala Ser Ala Leu Asn Ala Ala Gly Val Lys Pro Ile
            100                 105                 110

Tyr Asp Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Gly Tyr Pro Asp Lys Glu
        115                 120                 125

Ile Asn Leu Pro Ala Gly Gln Gly Leu Trp Arg His Asp Cys Asn Asp
    130                 135                 140

Pro Gly Asn Tyr Ala Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Met Gly
145                 150                 155                 160

Gly Asp Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Asn Tyr Ala Met Phe
                165                 170                 175

Arg Asp Glu Phe Ala Arg Leu Arg Ser Gln Tyr Gly Ala Gly Gly Phe
            180                 185                 190

Arg Phe Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Gly Glu Arg Val Ala Ser Trp
        195                 200                 205

Met Ser Asp Ala His Asp Asn Gly Phe Cys Leu Gly Glu Leu Trp Lys
    210                 215                 220
```

```
Ala Pro Gly Glu Tyr Pro Ser Trp Asp Trp Arg Asn Gly Ala Ser Trp
225                 230                 235                 240

Gln Gln Ile Leu Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Thr Val Phe
                245                 250                 255

Asp Phe Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Gly Ile Ala Asp Trp
            260                 265                 270

Arg His Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Ala Arg Trp Arg Glu Val Ala
        275                 280                 285

Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Pro His
    290                 295                 300

Gly Gly Gln His His Trp Pro Leu Pro Asp Ala Arg Leu Lys Gln Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ala Tyr Ile Leu Ser Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro
                325                 330                 335

His Met Tyr Asp Trp Gly His Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln
            340                 345                 350

Ile Arg Arg Ala Ala Gly Val Lys Ala Ala Ser Ala Ile Gln Phe His
        355                 360                 365

Thr Gly Phe Ser Gly Leu Val Ala Thr Ile Ser Gly Ser Gln Gln Gln
    370                 375                 380

Leu Leu Ile Ala Leu Asp Ser Asn Leu Ser Ser Pro Gly Gln Val Ala
385                 390                 395                 400

Ser Gly Asp Phe Thr Gln Ala Leu Asn Thr Asp Asn Gly Ala Ile Arg
                405                 410                 415

Ile Trp Arg Ser Gly Gln Gly Gly Gly Asp Gly Gln Gly Asn Leu Val
            420                 425                 430

Ser Val Asn Phe Arg Cys Asp Asn Gly Val Thr Gln Trp Gly Asp Ser
        435                 440                 445

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

Gly Ala Val Arg Leu Thr Asp Thr Ser Ala Tyr Pro Thr Trp Lys Gly
465                 470                 475                 480
```

Ser Ile Ala Leu Pro Ala Gly Gln Gln Val Gln Trp Lys Cys Ile Val
485 490 495

Arg Ser Glu Ser Asn Pro Thr Gln Val Lys Thr Trp Gln Pro Gly Gly
500 505 510

Asn Asn Ser Val Thr Val Ala Ser Gly Ala Ser Thr Ala Gly Ser Phe
515 520 525

<210> 7
<211> 1587
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Pseudomonas mendocina (cepa ymp) (A4XX23) con M agregado en el extremo N: (ADN A4XX23)

<400> 7

atggatgcac cgggcaaaac agcatcaggc gttagatatc atggcggcga tgaaattatt 60

ctgcaaggct ttcattggaa tacagttaga acatcatcaa attggtatgc aacactggca 120

tcaatggcac cgacactggc agcagatggc ttttcagcaa tttggatgcc ggttccgtgg 180

agagattttt catcatggtc agatccgggc aatggcacat caggcggcgg cgaaggctat 240

ttttggcatg attttaataa aaatggcaga tatggctcag attcactgct gagacaagca 300

gcatcagcac tgaatgcagc aggcgttaaa ccgatttatg atgttgttcc gaatcatatg 360

aatagaggct atccggataa agaaattaat ctgccggcag gccaaggcct gtggagacat 420

gattgcaatg atccgggcaa ttatgcaaat gattgcgatg atggcgatag atttatgggc 480

ggcgatgctg atctgaatac aggccatccg caaaattatg caatgtttag agatgaattt 540

gcaagactga gatcacaata tggcgcaggc ggctttagat ttgattttgt tagaggctat 600

gcaggcgaaa gagttgcatc atggatgtca gatgcacatg ataatggctt ttgcctgggc 660

gaactgtgga aagcaccggg cgaatatccg tcatgggatt ggagaaatgg cgcatcatgg 720

caacaaattc tgaaagattg gtcagataga gcaaaatgca cagtttttga ttttgcactg 780

aaagaaagaa tgcaaaatgg cggcattgca gattggagac atggcctgaa tggcaatccg 840

gatgcaagat ggagagaagt tgcagttaca tttgttgata atcatgatac aggctattca 900

ccgggcccgc atggcggcca acatcattgg ccgctgccgg atgcaagact gaaacaagca 960

tatgcatata ttctgtcatc accgggcaca ccggttgttt attggccgca tatgtatgat 1020

tggggtcatg gagattttat tagacaactg attcaaatta gaagagcagc aggcgttaaa 1080

gcagcatcag caattcaatt tcatacaggc ttttcaggcc tggttgcaac aatttcaggc 1140

tcacaacaac aactgctgat tgcactggat tcaaatctgt catcaccggg ccaagttgca 1200

tcaggcgatt ttacacaagc actgaataca gataatggcg caattagaat ttggagatca 1260

ggccaaggcg gcggcgatgg ccaaggcaat ctggtttcag ttaattttag atgcgataat 1320

ggcgttacac aatggggcga ttcagtttat gcactgggca atgttacaca actgggcaat 1380

tggtcaccgg caggcgcagt tagactgaca gatacatcag catatccgac atggaaaggc 1440

tcaattgcac tgccggcagg ccaacaagtt caatggaaat gcattgttag atcagaatca 1500

aatccgacac aagttaaaac atggcaaccg ggcggcaata attcagttac agttgcatca 1560

ggcgcatcaa cagcaggctc attttaa 1587

<210> 8
<211> 413
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Proteína madura de amilasa G4 de Hahella chejuensis (cepa KCTC 2396) con M agregado en el extremo N (proteína Q2SEA8)

<400> 8

Met Glu Ser Ser Gly Lys Ser Gly Ala Gly Val Arg Phe His Gly Gly
1 5 10 15

Asp Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Thr Ala
20 25 30

Glu Arg Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Gln Ser Lys Ala Gln Gln Ile Ser
35 40 45

Glu Asp Gly Phe Thr Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Asn
50 55 60

Ser Ser Trp Gln Ala Ser Ser Asp Thr Arg Phe Gly Gly Glu Gly Tyr
65 70 75 80

Phe Trp Ala Asp Met Asp Lys Asn Ser Arg Tyr Gly Asp Asp Gly Gln
85 90 95

Leu Lys Gln Ala Ala Ser Ala Leu Lys Asn Lys Gly Val Lys Val Ile
100 105 110

Tyr Asp Ile Val Pro Asn His His Asp Arg Gly His Ser Asn Asp Ser
115 120 125

Leu Asn Leu Pro Ser Gly Gln Gly Tyr Tyr Arg Ser Asp Cys Ser Ser
130 135 140

```
Cys Asp Asp Gly Asp Pro Phe Met Asp Gly Gly Ser Asp Phe Ser Thr
145                 150                 155                 160

Ala His Pro Asp Val Tyr Asp Leu Phe Lys Asn Glu Leu Val Asn Leu
                165                 170                 175

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

Tyr Ala Pro Glu Arg Ile Ser Ala Trp Met Ser Ala Ser Leu Asp Ser
        195                 200                 205

Gly Tyr Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Gly Pro Ser Glu Tyr Pro Ser
    210                 215                 220

Trp Asp Trp Arg His Ser Ala Ser Trp Gln Glu Ile Leu Lys Asp Phe
225                 230                 235                 240

Thr Asp Ala Ser Asp Cys Ser Val Phe Asp Phe Ala Leu Lys Glu Arg
                245                 250                 255

Met Gln Asn Gly Ser Ile Ser Asp Trp Arg Tyr Gly Leu Asn Gly Asn
            260                 265                 270

Pro Ser Ala Gln Trp Arg Glu Val Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His
        275                 280                 285

Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Pro Leu Gly Gly Gln His His Trp Ala
    290                 295                 300

Leu Pro Asp Trp Lys Arg Lys Met Ala Tyr Ala Tyr Ile Leu Ser Ser
305                 310                 315                 320

Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met Tyr Asp Trp Gly Met
                325                 330                 335

Arg Asp Phe Ile Arg Asn Leu Ile Gln Leu Arg Lys Ser Ala Gly Val
            340                 345                 350

Lys Ala Tyr Ser Gly Val Gln Phe His Asp Gly Phe Ser Gly Leu Val
        355                 360                 365

Gly Thr Thr Ser Gly Ser Asn Gly Lys Leu Leu Phe Ala Ile Asp Ser
    370                 375                 380

Asn Phe Ser Ser Pro Asn Gln Val Ala Gly Gly Ala Trp Asn Leu Ala
385                 390                 395                 400
```

Val Asn Glu Asp Asn Gly Arg Ile Arg Ile Trp Arg Gln
405 410

<210> 9
<211> 1242
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de ADN de nucleótido que codifica la amilasa G4 de Hahella chejuensis (cepa KCTC 2396) con M agregado en el extremo N (ADN de Q2SEA8)

<400> 9

atggaatcat caggcaaatc aggcgcaggc gttagatttc atggcggcga tgaaattatt 60

ctgcaaggct ttcattggaa cgttgttaga acagcagaaa gaaactggta caacatcctg 120

caatcaaaag cacaacaaat ttcagaagat ggctttacag caatttggat gccggttccg 180

tggagagata attcatcatg gcaagcatca tcagatacaa gatttggcgg cgaaggctat 240

ttttgggcag atatggataa aaattcaaga tatggcgatg atggccaact gaaacaagca 300

gcatcagcac tgaaaaataa aggcgttaaa gttatttatg atattgttcc gaatcatcat 360

gatagaggcc attcaaatga ttcactgaat ctgccgtcag gccaaggcta ttatagatca 420

gattgctcat catgcgatga tggcgatccg tttatggatg gcggctcaga tttttcaaca 480

gcacatccgg atgtttacga tctgtttaaa aacgaactgg ttaacctgaa aacaaactac 540

tcagcaggcg gctttagatt tgattttgtt agaggctatg caccggaaag aatttcagca 600

tggatgtcag catcactgga ttcaggctat tgcgttggcg aactgtggaa aggcccgtca 660

gaatatccgt catgggattg gagacattca gcatcatggc aagaaattct gaaagatttt 720

acagatgcat cagattgctc agtttttgat tttgcactga aagaaagaat gcaaaatggc 780

tcaatttcag attggagata tggcctgaat ggcaatccgt cagcacaatg gagagaagtt 840

gcagttacat ttgttgataa tcatgataca ggctattcac cgggcccgct gggcggccaa 900

catcattggg cactgccgga ttggaaaaga aaaatggcat atgcatatat tctgtcatca 960

ccgggcacac cggttgttta ttggccgcat atgtatgatt ggggcatgag agattttatt 1020

agaaatctga ttcaactgag aaaatcagca ggcgttaaag catattcagg cgttcaattt 1080

catgatggct tttcaggcct ggttggcaca acatcaggct caaatggcaa actgctgttt 1140

gcaattgatt caaatttttc atcaccgaat caagttgcag gcggcgcatg gaatctggca 1200

gttaatgaag ataatggcag aattagaatt tggagacaat aa 1242

<210> 10
<211> 530
<212> PRT
<213> Pseudomonas saccharophila

<400> 10

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                  10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Asn Asp Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Gly Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Gly Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Gly Phe Trp Arg Asn Asp Cys Ala Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Tyr Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Ile Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ser Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

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

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Gly Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Ser Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240
```

```
Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His His Trp Ala Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Ser His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly Glu Gly Gly
            420                 425                 430

Leu Val Asn Val Asn Phe Arg Cys Asp Asn Gly Val Thr Gln Met Gly
        435                 440                 445

Asp Ser Val Tyr Ala Val Gly Asn Val Ser Gln Leu Gly Asn Trp Ser
    450                 455                 460

Pro Ala Ser Ala Val Arg Leu Thr Asp Thr Ser Ser Tyr Pro Thr Trp
465                 470                 475                 480

Lys Gly Ser Ile Ala Leu Pro Asp Gly Gln Asn Val Glu Trp Lys Cys
                485                 490                 495
```

Leu Ile Arg Asn Glu Ala Asp Ala Thr Leu Val Arg Gln Trp Gln Ser
500 505 510

Gly Gly Asn Asn Gln Val Gln Ala Ala Ala Gly Ala Ser Thr Ser Gly
515 520 525

Ser Phe
530

<210> 11
<211> 21
<212> PRT
<213> Pseudomonas saccharophila

<400> 11

Met Ser His Ile Leu Arg Ala Ala Val Leu Ala Ala Val Leu Leu Pro
1 5 10 15

Phe Pro Ala Leu Ala
20

<210> 12
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1776

<400> 12

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp

```
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350
```

```
Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 13
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1934

<400> 13

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                   10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
```

```
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys Asp
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380
```

```
Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 14
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2020

<400> 14

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                   10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
```

```
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415
```

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
420 425

<210> 15
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2022

<400> 15

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Leu Trp Met Ser

195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro
210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln
225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
420 425

<210> 16
<211> 429
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2062

<400> 16

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                  10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Glu
```

```
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 17
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2171

<400> 17

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                  10                  15
```

```
Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

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

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ala Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
```

260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
420 425

<210> 18
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS465

<400> 18

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala
35 40 45

```
Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
```

290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
420 425

<210> 19
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1042

<400> 19

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65 70 75 80

```
His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
```

325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
420 425

<210> 20
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1104

<400> 20

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro
210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln
225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly

355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
420 425

<210> 21
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1153

<400> 21
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
130 135 140

```
Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
```

385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
420 425

<210> 22
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1286

<400> 22

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
180 185 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
195 200 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro
210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln
225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
420 425

<210> 23
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1284

<400> 23

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                  10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205
```

```
Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 24
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1290

<400> 24

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                  10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Lys Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240
```

```
Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 25
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1484

<400> 25

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                  10                  15
```

```
Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

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

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270
```

```
Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 26
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1579

<400> 26

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                   10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Gln Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45
```

```
Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Glu Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300
```

```
Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 27
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1105

<400> 27

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                   10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80
```

```
His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335
```

```
Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Ala Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 28
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS1723

<400> 28

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                   10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Arg Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110
```

```
Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Thr Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Gln Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365
```

```
Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 29
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2104

<400> 29

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                   10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140
```

```
Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Ser Trp Met Ser
        195                 200                 205

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ala Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400
```

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
420 425

<210> 30
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2138

<400> 30

Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1 5 10 15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
20 25 30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
35 40 45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
50 55 60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65 70 75 80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
85 90 95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
100 105 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
115 120 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
130 135 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145 150 155 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
165 170 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
180 185 190

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

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro
210 215 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Gln
225 230 235 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
245 250 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
260 265 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
275 280 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
290 295 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305 310 315 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
325 330 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
340 345 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
355 360 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
370 375 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385 390 395 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Ser Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
405 410 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
420 425

<210> 31
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2124

<400> 31

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                  10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

Asp Phe Val Arg Gly Tyr Ala Pro Glu Arg Val Asp Leu Trp Met Ser
        195                 200                 205
```

```
Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Glu
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 32
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2177

<400> 32

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                  10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Gln Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

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

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Glu
225                 230                 235                 240
```

```
Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 33
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2178

<400> 33

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                  10                  15
```

```
Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45

Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gln Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

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

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Lys Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Glu
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270
```

```
Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300

Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 34
<211> 429
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de proteínas maduras de pMS2118

<400> 34

```
Asp Gln Ala Gly Lys Ser Pro Ala Gly Val Arg Tyr His Gly Gly Asp
1               5                   10                  15

Glu Ile Ile Leu Gln Gly Phe His Trp Asn Val Val Arg Glu Ala Pro
            20                  25                  30

Tyr Asn Trp Tyr Asn Ile Leu Arg Gln Lys Ala Ser Thr Ile Ala Ala
        35                  40                  45
```

```
Asp Gly Phe Ser Ala Ile Trp Met Pro Val Pro Trp Arg Asp Phe Ser
    50                  55                  60

Ser Trp Thr Asp Gly Asp Lys Ser Gly Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
65                  70                  75                  80

His Asp Phe Asn Lys Asn Gly Leu Tyr Gly Ser Asp Ala Gln Leu Arg
                85                  90                  95

Gln Ala Ala Gly Ala Leu Gly Gly Ala Gly Val Lys Val Leu Tyr Asp
            100                 105                 110

Val Val Pro Asn His Met Asn Arg Phe Tyr Pro Asp Lys Glu Ile Asn
        115                 120                 125

Leu Pro Ala Gly Gln Arg Phe Trp Arg Asn Asp Cys Pro Asp Pro Gly
    130                 135                 140

Asn Gly Pro Asn Asp Cys Asp Asp Gly Asp Arg Phe Leu Gly Gly Glu
145                 150                 155                 160

Ala Asp Leu Asn Thr Gly His Pro Gln Ile Tyr Gly Met Phe Arg Asp
                165                 170                 175

Glu Phe Thr Asn Leu Arg Ser Gly Tyr Gly Ala Gly Gly Phe Arg Phe
            180                 185                 190

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

Asp Ser Ala Asp Ser Ser Phe Cys Val Gly Glu Leu Trp Lys Ser Pro
    210                 215                 220

Ser Glu Tyr Pro Pro Trp Asp Trp Arg Asn Arg Ala Ser Trp Gln Glu
225                 230                 235                 240

Ile Ile Lys Asp Trp Ser Asp Arg Ala Lys Cys Pro Val Phe Asp Phe
                245                 250                 255

Ala Leu Lys Glu Arg Met Gln Asn Gly Ser Val Ala Asp Trp Lys His
            260                 265                 270

Gly Leu Asn Gly Asn Pro Asp Pro Arg Trp Arg Glu Val Ala Val Thr
        275                 280                 285

Phe Val Asp Asn His Asp Thr Gly Tyr Ser Pro Gly Gln Asn Gly Gly
    290                 295                 300
```

```
Gln His Lys Trp Pro Leu Pro Asp Gly Leu Ile Arg Gln Ala Tyr Ala
305                 310                 315                 320

Tyr Ile Leu Thr Ser Pro Gly Thr Pro Val Val Tyr Trp Pro His Met
                325                 330                 335

Tyr Asp Trp Gly Tyr Gly Asp Phe Ile Arg Gln Leu Ile Gln Val Arg
            340                 345                 350

Arg Thr Ala Gly Val Arg Ala Asp Ser Ala Ile Ser Phe His Ser Gly
        355                 360                 365

Tyr Ser Gly Leu Val Ala Thr Val Ser Gly Ser Gln Gln Thr Leu Val
    370                 375                 380

Val Ala Leu Asn Ser Asp Leu Asp Asn Pro Gly Gln Val Ala Ser Gly
385                 390                 395                 400

Ser Phe Ser Glu Ala Val Asn Ala Glu Asn Gly Gln Val Arg Val Trp
                405                 410                 415

Arg Ser Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
            420                 425
```

<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia Enlazadora

<400> 35

```
Gly Ser Gly Asp Gly Gly Gly Asn Asp Gly Gly
1               5                   10
```

<210> 36
<211> 101
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de PS4 SBD

<400> 36

```
Glu Gly Gly Leu Val Asn Val Asn Phe Arg Cys Asp Asn Gly Val Thr
1               5                   10                  15

Gln Met Gly Asp Ser Val Tyr Ala Val Gly Asn Val Ser Gln Leu Gly
            20                  25                  30
```

Asn Trp Ser Pro Ala Ser Ala Val Arg Leu Thr Asp Thr Ser Ser Tyr
35 40 45

Pro Thr Trp Lys Gly Ser Ile Ala Leu Pro Asp Gly Gln Asn Val Glu
50 55 60

Trp Lys Cys Leu Ile Arg Asn Glu Ala Asp Ala Thr Leu Val Arg Gln
65 70 75 80

Trp Gln Ser Gly Gly Asn Asn Gln Val Gln Ala Ala Ala Gly Ala Ser
85 90 95

Thr Ser Gly Ser Phe
100

<210> 37
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Residuos de aminoácidos en las posiciones 13-26 de SEQ ID NO: 1

<400> 37

His Gly Gly Asp Glu Ile Ile Leu Gln Phe His Trp Asn
1 5 10

<210> 38
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de unidad artificial

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_NUEVA
<222> (4)..(4)
<223> Xaa en la posición 4 es Ser o Thr

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_NUEVA
<222> (8)..(8)
<223> Xaa en la posición 8 es Met o Leu

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_NUEVA
<222> (10)..(10)
<223> Xaa en la posición 10 es Val o Pro

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_NUEVA
<222> (15)..(15)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 38

Asp Gly Phe Xaa Ala Ile Trp Xaa Pro Xaa Pro Trp Arg Asp Xaa Ser
1 5 10 15

Ser Trp

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 39

Gly Gly Glu Gly Tyr Phe Trp
1 5

<210> 40
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 40

Val Pro Asn His
1

<210> 41
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 41

Cys Asp Asp Gly Asp
1 5

<210> 42
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 42

Ala Gly Gly Phe Arg Phe Asp Phe Val Arg Gly
1 5 10

<210> 43
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 43

Phe Ala Leu Lys
1

<210> 44
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 44

Trp Arg Glu Val Ala Val Thr Phe Val Asp Asn His Asp
1 5 10

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 45

Gly Tyr Ser Pro Gly
1 5

<210> 46
<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 46

Gly Gln His
1

<210> 47
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 47

Ala Tyr Ala Tyr Ile
1 5

<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 48

Ser Pro Gly Thr Pro
1 5

<210> 49

<211> 3
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 49

Val Tyr Trp
1

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Subsecuencia artificial

<400> 50

His Met Tyr Asp Trp Gly
1 5

<210> 51
<211> 686
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia AA de Novamyl

<400> 51

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

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

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

Gly Asp Leu Glu Gly Val Arg Gln Lys Leu Pro Tyr Leu Lys Gln Leu
    50                  55                  60

Gly Val Thr Thr Ile Trp Leu Ser Pro Val Leu Asp Asn Leu Asp Thr
65                  70                  75                  80

Leu Ala Gly Thr Asp Asn Thr Gly Tyr His Gly Tyr Trp Thr Arg Asp
                85                  90                  95

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

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

Val Pro Asn His Ser Thr Pro Phe Lys Ala Asn Asp Ser Thr Phe Ala
    130                 135                 140

Glu Gly Gly Ala Leu Tyr Asn Asn Gly Thr Tyr Met Gly Asn Tyr Phe
145                 150                 155                 160

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ala Pro Gln Ile Gly Ser Val Ala Pro Asn Met Gly Ile Pro Gly
```

```
            500                 505                 510

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 52
<211> 1290
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótido de pMS382

<400> 52

```
gatcaagcag gaaaaagccc ggcaggcgtc agatatcatg gcggcgatga aatcatcctt       60

cagggctttc attggaacgt cgtcagagaa gcgccgtata actggtataa catcctgaga      120

caacaagcga gcacaattgc cgctgatggc ttttccgcaa tctggatgcc ggttccgtgg      180

agagatttta gcagctggac ggatggagat aaaagcggag gcggcgaagg atatttttgg      240
```

catgacttta acaaaaacgg ccgctatgga agcgatgctc aactgagaca agcagcagga 300

gcacttggag gagcaggagt caaagtcctg tacgatgtcg tcccgaacca tatgaaccgc 360

ttttatccgg acaaagaaat caatctgccg gcaggccaaa gattttggag aaacgattgc 420

ccggacccgg gaaatggacc gaatgattgc gatgatggcg atagatttct gggcggcgaa 480

gcggatctga atacaggcca tccgcaaatc tatggcatgt ttcgggacga atttacgaat 540

ctgagaagcg gatatggagc gggcggattt cgctttgatt ttgtcagagg ctatgccccg 600

gaaagagttg atagctggat gagcgattca gcggatagca gcttttgcgt cggcgaactt 660

tggaaagaac cgagcgaata tccgccgtgg gattggagaa atacagcgag ctggcagcag 720

atcatcaaag attggagcga tagagcaaaa tgcccggtct ttgactttgc cctgaaagaa 780

cgcatgcaaa atggaagcgt cgccgattgg aaacatggcc tgaacggaaa tccggacccg 840

agatggagag aagtcgccgt cacgtttgtc gataaccatg acacaggata tagcccggga 900

caaaatggag gacaacataa atggccgctt caagatggcc ttatcagaca ggcgtatgcc 960

tatatcctta catcaccggg aacaccggtt gtttattggc cgcatatgta tgattggggc 1020

tatggcgatt tcatccgcca actgatccag gttagaagaa cagcaggagt cagagcggat 1080

agcgccatta gctttcatag cggctatagc ggacttgtcg ctacagttag cggcagccaa 1140

caaacactgg tcgtcgccct gaatagcgat ctggcaaatc cgggacaagt tgctagcggc 1200

agctttagcg aagcagtcaa tgccagcaat ggccaagtca gagtctggag aagcggaagc 1260

ggagatggag gaggaaatga cggaggataa 1290

<210> 53
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 53

gtataacatc ctgagacaaa aagcgagcac aattgccg 38

<210> 54
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 54

gtataacatc ctgagacaaa acgcgagcac aattgcc 37

<210> 55
<211> 41
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 55

gcatgacttt aacaaaaacg gcctgtatgg aagcgatgct c 41

<210> 56
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 56

ggcatgactt taacaaaaac ggctattatg gaagcgatgc tcaac 45

<210> 57
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 57

ggcatgactt taacaaaaac ggcaaatatg gaagcgatgc tcaac 45

<210> 58
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 58

gccccggaaa gagttgatct gtggatgagc gattcagcg 39

<210> 59
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 59

gtgggattgg agaaatagag cgagctggca gc 32

<210> 60
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 60

gtgggattgg agaaataaag cgagctggca gc 32

<210> 61
<211> 37
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 61

gccgtgggat tggagaaatc atgcgagctg gcagcag 37

<210> 62
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 62

ccgtgggatt ggagaaatca ggcgagctgg cagcag 36

<210> 63
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 63

cgctccaatc tttgatgatt tcctgccagc tcgctg 36

<210> 64
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 64

cagcgagctg gcaggatatc atcaaagatt ggagcg 36

<210> 65
<211> 39
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 65

caacataaat ggccgcttcc ggatggcctt atcagacag 39

<210> 66
<211> 38
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 66

gccctgaata gcgatctgga taatccggga caagttgc 38

<210> 67

<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 67

cgccctgaat agcgatctgt ataatccggg acaagttgct ag 42

<210> 68
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 68

gcgaagcagt caatgccgaa aatggccaag tcagagtctg 40

<210> 69
<211> 43
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 69

catcaaagat tggagcgatc atgcaaaatg cccggtcttt gac 43

<210> 70
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 70

cgcatgcaaa atggaacggt cgccgattgg aaacatg 37

<210> 71
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 71

ctaccgtcga tggcagccag cagac 25

<210> 72
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador de ADN

<400> 72

ctacagttga tggcagccaa caaac 25

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que tiene actividad amilasa que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 65% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, y en donde el polipéptido comprende una sustitución de aminoácido en la posición 205, con referencia a la numeración de la posición de la secuencia mostrada como SEQ ID NO: 1, en donde el polipéptido tiene una termoestabilidad mejorada comparada con la amilasa de la SEQ ID NO: 1.

2. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende una o más sustituciones de aminoácidos en las siguientes posiciones: 88, 235, 240, 311 o 409 y/o una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: 42K/A/V/N/I/H/F, 34Q, 100Q/K/N/R, 272D o 392K/D/E/Y/N/Q/R/S/T/G.

3. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el polipéptido comprende además el aminoácido 223A/K/S.

4. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que tiene al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 o 99% de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

5. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende una secuencia de aminoácidos se expone en la SEQ ID NO: 25.

6. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que tiene un enlazador fusionado en el extremo C.

7. El polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que tiene exoactividad amilasa, preferiblemente exoactividad amilasa no maltogénica.

8. Un ácido nucleico capaz de codificar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

9. Un vector de expresión vector que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8, o capaz de expresar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

10. Un plásmido que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 8.

11. Una célula huésped que comprende, preferentemente transformada con, un vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 9 o plásmido de acuerdo con la reivindicación 10.

12. Uso de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 como un aditivo de alimentos o de piensos.

13. Un método de preparación de un jarabe de sacárido, que comprende agregar un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7 a un licuado de almidón granular para formar el jarabe de sacárido.

14. Un producto alimenticio que comprende un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7.

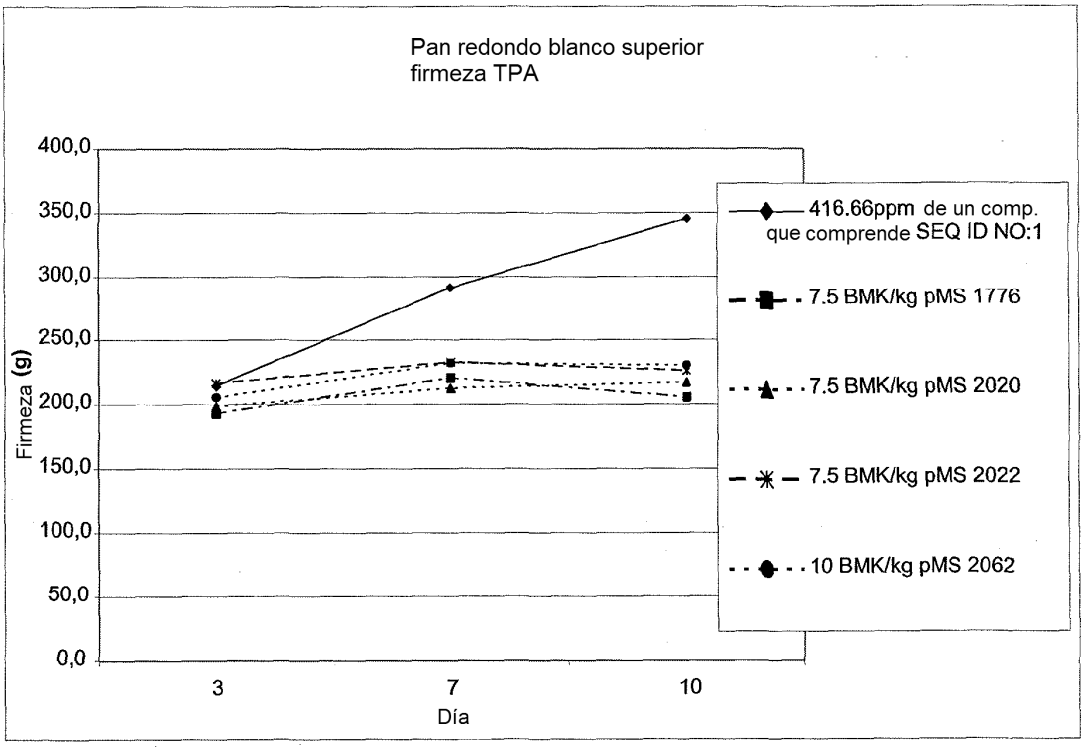
Pan redondo blanco superior
firmeza TPA
400,0
350,0
300,0
250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
Firmeza (g)
3
7
10
Día
416.66ppm de un comp. que comprende SEQ ID NO:1
7.5 BMK/kg pMS 1776
7.5 BMK/kg pMS 2020
7.5 BMK/kg pMS 2022
10 BMK/kg pMS 2062

Fig. 1

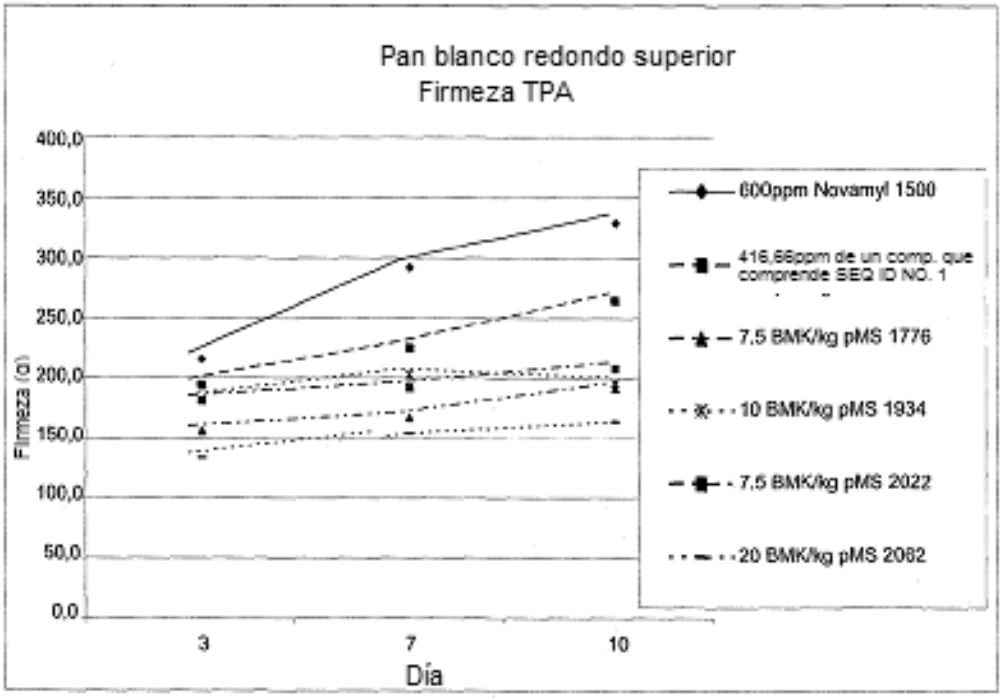
Pan blanco redondo superior
Firmeza TPA
Firmeza (g)
400,0
350,0
300,0
250,0
200,0
150,0
100,0
50,0
0,0
3
7
10
Día
600ppm Novamyl 1500
416,66ppm de un comp. que comprende SEQ ID NO. 1
7,5 BMK/kg pMS 1776
10 BMK/kg pMS 1934
7,5 BMK/kg pMS 2022
20 BMK/kg pMS 2082

Fig. 2