

PROTEÍNA AMILASA MALTOTRIOSIA TERMOSTABLE

LISTADO DE SECUENCIAS

5 Esta solicitud incorpora por referencia el contenido de un archivo de texto de 126 kb creado el 8 de febrero de 2021 y denominado “updated-CP0201US00-sequencinglisting”, que es el listado de secuencias de esta solicitud.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 En 2015, el Comité Asesor de Guías Dietéticas del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos recomendó limitar la ingesta de azúcar añadido a menos del 10% del total de calorías diarias. En mayo de 2016, la Administración de Alimentos y Medicamentos emitió nuevas pautas de etiquetado para alinearse con estas recomendaciones. Se añadió el término "azúcares añadidos" al panel de información nutricional para el etiquetado de
15 los alimentos y el Comité definió los azúcares añadidos como mono y disacáridos. Las nuevas regulaciones sobre el azúcar agregado entraron en vigencia el 26 de julio de 2018. Se requirió que se incluyeran “azúcares agregados”, en gramos y como porcentaje del valor diario, en las etiquetas de los alimentos. Los datos científicos muestran que es difícil satisfacer las
20 necesidades de nutrientes mientras se mantiene dentro de los límites calóricos si una persona consume más del 10 por ciento del total de calorías diarias provenientes del azúcar agregada, y esto es consistente con las Guías Alimentarias para los Estadounidenses 2015-2020.

25 Para abordar este cambio en la regulación de la FDA, se han buscado métodos para elaborar jarabes de glucosa reducidos en azúcar que permitan a los fabricantes de alimentos reducir la cantidad de "azúcar total" y "azúcares añadidos" en las etiquetas de los alimentos que contienen estos jarabes reducidos de azúcar.

30 Los métodos actuales para elaborar jarabes de glucosa reducidos en azúcar (RSGS) funcionalmente bien recibidos tienen inconvenientes y limitaciones. Los métodos convencionales implican el uso de enzimas comerciales que no producen el perfil de oligosacáridos deseado para una RSGS. El perfil de oligosacáridos tiene un impacto en la viscosidad, el dulzor y

la actividad del agua del producto terminado. Los niveles de oligosacárido DP10+ tendrán un impacto en la viscosidad del jarabe terminado, lo que a su vez afecta las aplicaciones de uso final del jarabe en los alimentos. Las enzimas que se utilizan actualmente para lograr los perfiles de oligosacáridos deseados para un RSGS son enzimas especializadas costosas que impactan el costo de proporcionar el producto RSGS terminado y, por lo tanto, son un obstáculo para la adaptación al mercado.

Existe la necesidad de métodos que no tengan los inconvenientes de los métodos actuales y al mismo tiempo superen las limitaciones de los métodos convencionales. En particular, existe una necesidad de enzimas termoestables para preparar jarabes reducidos en azúcar que tengan al menos una característica mejorada con respecto a las enzimas especializadas o de productos básicos existentes. Por ejemplo, existe la necesidad de enzimas termoestables que tengan una actividad óptima a temperaturas superiores a 50°C, que son las temperaturas típicas del proceso convencional. A este respecto, existe la necesidad de enzimas termoestables que puedan funcionar a temperaturas superiores a 50°C. También existe la necesidad de una fuente de enzimas termoestables que permita una producción mejorada de enzimas mediante fermentación y procesamiento posterior.

BREVE RESUMEN

La presente invención proporciona ventajas sobre las enzimas comerciales/especiales utilizadas para la producción de jarabes bajos en azúcar. En un aspecto, se proporciona en el presente documento una familia de enzimas amilasa maltotriosa que tienen propiedades mejoradas que comprenden una variante de amilasa maltotriosa que contiene una secuencia de aminoácidos que incluye las mutaciones presentes en una variante de amilasa maltotriosa seleccionada del grupo que consiste en los aminoácidos 30-560 de las SEQ ID NOS: 2-29.

En la mayoría de las realizaciones, la variante amilasa maltotriosa es una variante de la enzima maltotriosa según la SEQ ID NO:1, en la que la variante comprende una sustitución del aminoácido Q126H.

En realizaciones ejemplares, la enzima maltotriosa variante comprende las mutaciones presentes en las enzimas maltotriosa variantes seleccionadas del grupo que consiste en las enzimas maltotriosa según los aminoácidos 30-560 de SEQ ID NOS:2-29. En una realización particular, la enzima maltotriosa variante
 5 tiene una secuencia de aminoácidos según cualquiera de las SEQ ID NOS:2-29. En determinadas realizaciones, la variante amilasa maltotriosa se expresa a partir de *Bacillus subtilis*. En tales realizaciones, la variante de amilasa maltotriosa incluye un péptido señal para la exportación de la enzima desde *Bacillus subtilis*. El péptido señal puede ser uno con una secuencia de
 10 aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO:30-32.

En otro aspecto, se proporcionan métodos que comprenden poner en contacto almidón con cualquiera de las enzimas amilasa maltotriosa anteriores a una temperatura superior a 50°C para formar un jarabe de glucosa con azúcar reducido (RSGS). En una realización preferida, el RSGS tiene un equivalente
 15 de dextrosa (DE) de 25-40.

La presente invención proporciona técnicas de procesamiento mejoradas con respecto a los métodos convencionales. La presente divulgación proporciona enzimas termoestables que pueden operar a temperaturas de 60-80°C. En realizaciones particulares, la presente divulgación proporciona la
 20 formación de un RSGS usando enzimas amilasa maltotriosa termoestables que operan a temperaturas de 60-80°C, con un aumento en actividad catalítica.

Estos y otros aspectos, realizaciones y ventajas asociadas resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La FIG. 1 es un gráfico de barras que muestra la fracción de sacáridos
 25 totales presentes en jarabes de glucosa con azúcar reducido producidos por diversas enzimas amilasa maltotriosa naturales y métodos descritos en el presente documento en términos de distribución por grado de polimerización (DP) obtenidos mediante digestión de Clintose CR10 una solución de
 30 maltodextrina ejemplar) presente en una concentración de sólidos disueltos del 30% (p/p).

La FIG. 2 es un gráfico que muestra la mejora en la estabilidad térmica y la estabilidad proteolítica en caldo completo después de la ronda 3 de ingeniería de proteínas utilizando variantes ejemplares de enzimas amilasa maltotriosa según la presente divulgación.

5 La FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra la estabilidad comparativa de variantes ejemplares de enzimas amilasa maltotriosa (según se caracteriza por su vida media) en caldo completo cuando se calienta a 57°C y 55°C.

La FIG. 4 es un gráfico de barras que muestra la hidrólisis de maltodextrina (Clintose CR10) mediante variantes enzimáticas a 56°C.

10 La FIG. 5 es un gráfico de barras que muestra la hidrólisis de maltodextrina (Clintose CR10) mediante variantes enzimáticas a 63°C.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Ahora se han descubierto enzimas amilasa maltotriosa termoestables que retienen la actividad enzimática por encima de 50°C y en algunas realizaciones hasta 70°C. Las enzimas descritas en el presente documento tienen las siguientes características: (a) hidroliza el almidón o la maltodextrina hidrolizados principalmente a DP3 con un contenido mínimo de DP1 y DP2; (b) son activos con sustrato maltodextrina presente en un 30% de sólidos disueltos (d.s.), pH 5-6, a 60-65°C; (c) son estables a 70°C durante más de 30 minutos; 15 (d) están inactivados a pH 3,5; y (e) se expresa bien en *Bacillus subtilis*.

20 Las enzimas descritas en el presente documento se pueden usar para preparar un jarabe de glucosa con azúcar reducido (RSGS) que tiene una alta concentración de DP3, *es decir*, superior al 40%, mientras que se prepara una concentración baja de DP1 y DP2, *es decir*, DP1 + DP2 inferior al 10%. En 25 realizaciones ejemplares, la proporción de DP3 a DP2 en el jarabe es al menos 6. En una realización preferida, el RSGS tiene un equivalente de dextrosa (DE) de 24-40.

Desarrollo de enzimas

30 Un derivado de *Bacillus subtilis* cepa DP1077 se creó, en el que se alteró el gen *amyE* nativo. Esta cepa se denominó DP1384, la cual se utilizó como huésped para expresar enzimas variantes de amilasa maltotriosa (también conocida como DP3 amilasa). Para garantizar que la actividad observada en el

sobrenadante del cultivo procediera de la DP3 amilasa expresada y no de la amilasa endógena, dos DP3 amilasas conocidas se expresaron en la cepa DP1384 y las cepas se cultivaron. Los homólogos naturales de la amilasa maltotriosa se expresaron y secretaron usando uno de los tres péptidos señal, uno de los cuales es el péptido señal de queratinasa de *Bacillus licheniformis* (MMRKSF~~W~~LGMLTAFMLVFTMAFSDSASA (SEQ ID NO:30); aminoácidos 1-29 de SEQ ID NO:1). Los otros dos péptidos señal eran ligeras variantes de los anteriores, que eran MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDAASA (SEQ ID NO: 31) y MMRKKSFWLGMLTAFMLVFTMAFSDVASA (SEQ ID NO: 32) donde el subrayado muestra la variación de aminoácidos. Se analizó la actividad enzimática de los sobrenadantes del cultivo utilizando ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) como indicador.

Se descubrió que la actividad de amilasa estaba presente en el sobrenadante del cultivo de la cepa de tipo salvaje DP1077 y en cultivos en los que se sobreexpresaba la amilasa DP3, pero no en la cepa huésped DP1384 en la que el gen de la amilasa *amyE* estaba desactivado. Esto demostró que la actividad observada en el sobrenadante del cultivo procedía de la amilasa DP3 expresada y no de alguna amilasa endógena expresada en la cepa huésped DP1077.

Se optimizaron los codones, se sintetizaron, clonaron y expresaron genes para noventa y seis (96) homólogos de amilasa natural en *B. subtilis* DP1384. Las cepas que expresan DP3 amilasas se cultivaron en medio LB (*es decir*, caldo de lisogenia, también denominado caldo Luria-Bertani) con antibióticos. Se analizó la expresión de proteínas y la actividad de amilasa en el sobrenadante de cultivo mediante DNS utilizando Clintose CR10 como sustrato. Clintose CR10 es un nombre comercial para una maltodextrina producida por Archer Daniels Midland Company caracterizada por tener un equivalente de dextrosa (valor DE) de 10. Se llevaron a cabo reacciones en presencia de 8% p/p de Clintose CR10 (d.s.), y el producto de reacción se caracterizó por HPLC para determinar el perfil de DP. Las enzimas homólogas que dieron el perfil de DP deseado se caracterizaron además realizando la reacción en presencia de

Clintosa CR10 al 30% (p/p) para comprender la velocidad de reacción y el espectro del producto. Los resultados se muestran en la FIG. 1.

Según el análisis, el gen de la amilasa maltotriosa denominado 343612 (612) que tiene la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID: NO: 1 se tomó como candidato principal para la ingeniería de proteínas. 343612 tuvo una mejor expresión en comparación con otros candidatos, dio una concentración más baja de DP2+1 (<10%) y fue catalíticamente activo a 50°C para la hidrólisis del almidón.

Se utilizó ingeniería de proteínas para mejorar las propiedades de la amilasa 343612. La ingeniería de proteínas implicó sintetizar genes que codifican variantes de SEQ ID: NO: 1 que contienen mutaciones aleatorias en varias regiones de la secuencia del gen original 343612 para alterar la secuencia de aminoácidos seguido de la detección de mutaciones que tenían propiedades mejoradas. A la ronda inicial de mutación le siguieron rondas adicionales de mutación que conservaban mutaciones de las variantes de la primera ronda que tenían propiedades mejoradas para descubrir mutaciones que mejoraban aún más las propiedades cuando se combinaban con mutaciones favorables de la primera ronda.

La mejora en la estabilidad térmica y la estabilidad proteolítica en el caldo entero se logró después de la ronda 3 de ingeniería de proteínas. Los resultados se muestran en la FIG. 2. La FIG. 2 muestra las propiedades de temperatura versus actividad determinadas usando 343612 (R1 parental), 354118 (R2), 357771 (R3 parental) y 372265 (R4 parental). 354118 (R2 parental) no superó a 343612 (R1 parental) en ninguna temperatura previa al tratamiento. Sin embargo, 357771 (R3 parental) y 372265 (R4 parental) superaron a 343612 (R1 parental) a temperaturas previas al tratamiento superiores a 50°C. En las oraciones anteriores, RX parental se refiere a la secuencia parental para una ronda determinada (R) de mutación designada por X.

Enzimas variantes alternativas

Desarrollo del proceso de jarabe de maíz con amilasa maltotriosa

En un aspecto, un método comprende poner en contacto almidón con una enzima amilasa maltotriosa termoestable que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene las mutaciones presentes en las enzimas variantes seleccionadas del grupo que consiste en los aminoácidos 30-560 de las SEQ ID NOS:2-29 a una temperatura por encima de 50°C para formar un jarabe de glucosa con azúcar reducido con un equivalente de dextrosa (DE) de 24-40. En una realización preferida, el jarabe de glucosa y azúcar reducido (RSGS) tiene una viscosidad similar al jarabe DE 42/43 de ~ 7000 cps, mayor DP3 y DP3+DP4 y menor DP1+2 que el jarabe DE 42/43.

En una realización preferida, la variante de la proteína amilasa maltotriosa termoestable comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 30-560 de SEQ ID NO:1. En otra realización preferida, la proteína amilasa maltotriosa termoestable comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos 30-560 de SEQ ID NO:1. pero que tiene al menos una sustitución siendo Q126H. Se encontró que las variantes de amilasa (también denominadas en el presente documento como “enzimas variantes” o “variante amilasa maltotriosa”) que tienen al menos la sustitución Q126H tenían una termoestabilidad aumentada por encima de 50°C en comparación con la amilasa maltotriosa parental.

En una realización preferida, una proteína amilasa maltotriosa termoestable variante tiene al menos una característica mejorada en comparación con la amilasa maltotriosa parental, en donde la característica mejorada se selecciona del grupo que consiste en mayor termoestabilidad por encima de 50°C, mejor actividad en presencia de un sustrato maltodextrina con un contenido de sólidos disueltos del 30% p/p, y mejor expresión proteica de la amilasa maltotriosa termoestable cuando un gen que codifica la amilasa maltotriosa termoestable se expresa en una célula huésped de *Bacillus subtilis*.

Se realizaron cuatro (4) rondas de modificación genética y cribado y se seleccionaron cinco (5) variantes de alto rendimiento. También se examinaron las variantes para determinar su actividad a pH 5.5 y 6. La temperatura se aumentó hasta oscilar entre 60°C y 69°C.

La FIG. 3 es un gráfico de barras que muestra la estabilidad comparativa de las variantes enzimáticas (según se caracteriza por su vida media) ensayadas usando los sobrenadantes de cultivos lisados que expresan las variantes y ensayadas a 57 °C y 55 °C.

5 La FIG. 4 es un gráfico de barras que muestra la hidrólisis de maltodextrina (Clintose CR10) mediante variantes enzimáticas a 56 °C.

La FIG. 5 es un gráfico de barras que muestra la hidrólisis de maltodextrina (Clintose CR10) mediante variantes enzimáticas a 63 °C.

10 La Tabla 1 muestra cambios de aminoácidos de variantes ejemplares según la presente invención con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1.

Todas las mutaciones de sustitución de aminoácidos descritas en el presente documento se presentan en la forma XNY, donde X es el código de una letra para el aminoácido en la posición N y Y es el aminoácido sustituto en esa posición. En caso de discrepancia entre las sustituciones de aminoácidos en las tablas del presente documento y las secuencias proporcionadas en el listado de secuencias, prevalecerán las sustituciones de aminoácidos que se muestran en las tablas.

20 La Tabla 2 resume las sustituciones de aminoácidos relativas a SEQ ID NO:1 y los identificadores de secuencia de ciertas variantes.

Aquellos con experiencia en la técnica, con el conocimiento adquirido a partir de la presente divulgación, reconocerán que se pueden realizar varios cambios en los procesos divulgados para lograr estas y otras ventajas, sin apartarse del alcance de la presente divulgación. Como tal, debe entenderse que las características de la divulgación son susceptibles de modificaciones y/o sustituciones. Las realizaciones específicas ilustradas y descritas en el presente documento tienen únicamente fines ilustrativos y no limitativos de la invención tal como se establece en las reivindicaciones adjuntas.

30

Tabla 1. Variantes de amilasa maltotriosa

ID del gen	Sustituciones de aminoácidos relativas a SEQ ID NO:1													
354028	K38A	A67G	I253A											
354029	T128A	Q137G	I253A											
354030	N175D	I253A	G372N											
354031	A45L	D209A	G372N											
354032	A102T	I206A	T333N											
354033	S177N	S234D	A389S											
354034	N181D	I297R	N366R											
354035	T165Q	I176V	T333S											
354036	D25A	S208A	V365N											
354037	R174A	N315K	G372N											
354038	S49N	K93R	M193L											
354039	S177N	A221G	Y350W											
354040	A45L	S49N	K294N											
354041	Q126H	G372N	S385N											
354042	Q126H	T333N	N390D											
354043	S49R	A102T	I297R											
354044	S26A	I206A	N366A											
354045	S49R	E103A	F196L											
354046	S49N	F285Y	A389S											
354047	K93R	S167A	I253A											
354048	D59N	T149D	N175D											
354049	S26A	I176V	I253A											
354050	Q137G	I176V	D252N											
354051	Q137G	S198T	T333S											
354052	T149D	S177N	S272G											
354053	D59N	T165Q	S234D											
354054	D25A	R174A	S272G											
354055	S49N	I206A	N366R											
354056	Q137G	T149D	N366A											

354057	A120V	V122A	S385N											
354058	T149D	N315Q	T333S											
354059	T165Q	K294N	N315K											
354060	N51A	K93R	F285Y											
354061	A45L	N51A	S263A											
354062	N233A	S263A	Y350W											
354063	E103A	N366R	A389S											
354064	F196L	S198T	V365N											
354065	A45L	I297R	A389S											
354066	A120V	N181D	S208A											
354067	D25A	N51A	N366A											
354068	A45L	I176V	W363F											
354069	A67G	M193L	F285Y											
354070	A102T	S234D	S272G											
354071	S28A	D59N	I297R											
354072	D252N	S385N	A389S											
354073	D25A	S28A	V122A											
354074	T232A	S263A	N390D											
354075	D59N	R174A	D209A											
354076	S28A	I206A	N233A											
354077	M193L	Y350W	V365N											
354078	T128A	S177N	S198T											
354079	S28A	S167A	N175D											
354080	A102T	A237N	S385N											
354081	N175D	T333S	Y350W											
354082	N181D	D209A	N315K											
354083	R174A	I206A	S263A											
354084	T128A	F196L	A221G											
354085	A67G	A102T	N233A											
354086	N175D	A221G	A237N											
354087	S263A	S272G	N366A											

354088	S26A	N181D	T232A											
354089	K93R	S208A	T333N											
354090	A120V	S198T	W363F											
354091	N181D	A221G	T333N											
354092	M193L	N315K	N366A											
354093	K38A	S167A	W363F											
354094	A67G	E103A	K294N											
354095	S177N	A237N	N315Q											
354096	E103A	V122A	S208A											
354097	E103A	A221G	S385N											
354098	S26A	K38A	T333N											
354099	V122A	I176V	F196L											
354100	S49R	Q126H	W363F											
354101	Q126H	S198T	T232A											
354102	N51A	F196L	D252N											
354103	T128A	T232A	N233A											
354104	K38A	A120V	D252N											
354105	D209A	F285Y	T333S											
354106	D59N	N233A	N390D											
354107	K93R	N315Q	V365N											
354108	K38A	S234D	F285Y											
354109	T128A	D252N	Y350W											
354110	S49R	T232A	N315K											
354111	S49R	M193L	N366R											
354112	K294N	N366R	G372N											
354113	D25A	D209A	N315Q											
354114	T165Q	S208A	I297R											
354115	T149D	A237N	N390D											
354116	V122A	Q137G	R174A											
354117	S28A	S272G	W363F											
354118	K294N	N315Q	N390D											

354119	T165Q	S167A	V365N											
354120	A120V	Q126H	S167A											
354121	A67G	S234D	A237N											
354122	S26A	S49N	N51A											
357753	A67G	N233A	S272G	K294N	N315Q	N390D								
357.754	A102T	E103Q	T232A	K294N	N315Q	N390D								
357.755	W50F	K294N	N315Q	V365N	N390D	A507T								
357756	W50F	K294N	N366A	N390D										
357.757	K55R	K286A	K294N	N315Q	V365N	N390D								
357.758	A221G	A250R	N315Q	N390D										
357759	S26A	N233A	K294R	N315Q	N390D									
357.760	A102T	S177A	K294R	N315Q	N390D									
357.761	I118V	A221G	K286A	K294N	N315Q	N390D								
357.762	S167A	K294N	N315Q	T333S	N366A	N390D								
357.763	S49N	G171D	K294N	N315Q	S385N	N390D								
357.764	S49N	K294N	D360G	N390D										
357.765	K286A	K294N	N315Q	T333S	N390D	A525P								
357.766	S177N	K294N	N315Q	V365N	S385N	N390D								
357.767	A67G	K294N	N315Q	N390D	A507T									
357.768	A102T	T127M	S177N	K294N	N315Q	N390D								
357.769	S49N	E103Q	S177N	K294N	N315Q	N390D								
357.770	E187H	N233A	K294N	N315Q	N390D	A507T								
357.771	A67G	Q126H	K294N	N315Q										
357.772	T127M	S167A	K294N	N315Q	N390D	Q518I								
357.773	E201D	K294N	N390D											
357.774	N51A	A120V	G171D	K294N	N315Q	N390D								
357.775	Q126H	K294N	D310A	N315Q	A389S	N390D								
357.776	S177N	S272G	K294N	N315Q	R339K	N390D								
357777	A67G	K294N	N315Q	T333S	R339K	N390D								
357.778	K55R	N233A	N315Q	N390D										
357779	S49N	K294N	N315Q	V365N	N390D	A505S								

357.780	W50F	I118V	S198T	K294N	N315Q	N390D								
357.781	T127M	N315Q	N390D	A505S										
357.782	E187H	K294N	N315Q	N390D	A505S	Q518I								
357.783	T165Q	G171D	T180R	K294N	N315Q	N390D								
357.784	I108V	K294N	N315Q	R339K										
357.785	N51A	S167A	N315Q	N390D										
357.786	K286A	K294R	N315Q	N390D	A505S									
357.787	A67G	K294N	N315Q	V365N	N366A	N390D								
357.788	T149D	T165Q	K294N	N315Q	S385N	N390D								
357.789	T149D	S177A	K294N	N315Q										
357.790	S26A	S177A	E187H	K294N	N315Q	N390D								
357.791	A67G	S198T	K294N	N315Q	N390D	Q518I								
357.792	W50F	A67G	S177N	K294N	N315Q	N390D								
357.793	N51A	E187H	S263A	K294N	N315Q	N390D								
357.794	A67G	E201D	K294N	N315K	N390D									
357.795	S49N	A120V	A221G	K294N	N315Q	N390D								
357.796	K286A	N390D												
357.797	K294N	N315K	D360G	N390D	A507T									
357.798	K105R	K294N	N315Q	S385N	A389S	N390D								
357.799	A102T	T149D	S167A	K294N	N315Q	N390D								
357.800	T149D	K294N	N315K	N390D										
357801	K294N	D310A	N315Q											
357802	K55R	T232A	K294N	N315Q	S385N	N390D								
357803	I108V	T180R	S198T	K294N	N315Q	N390D								
357804	S26A	A120V	T127M	K294N	N315Q	N390D								
357805	S49N	A67G	I118V	K294N	N315Q	N390D								
357806	E103Q	K294N	N315Q	V365N	A389S	N390D								
357807	K105R	S198T	A221G	K294N	N315Q	N390D								
357808	S177A	T180R	K294N	N315Q	A389S	N390D								
357809	S177N	K294R	N315Q	A389S	N390D									
357810	N51A	K105R	K294N	N315Q	N366A	N390D								

357811	S26A	S177N	T180R	K294N	N315Q	N390D							
357812	S49N	S272G	K294N	N315Q	N390D	A525P							
357813	T165Q	E201D	T232A	K294N	N315Q	N390D							
357814	S26A	I108V	K294N	N315Q	A389S	N390D							
357815	S26A	K294N	N315Q	T333S	N390D	A507T							
357816	K55R	S272G	K294N	N315Q	A389S	N390D							
357817	S49N	S198T	K294N	N315Q	A389S	N390D							
357818	K105R	G171D	K294N	N315Q	N390D	A525P							
357819	A120V	S272G	K294N	D310A	N315Q	N390D							
357820	K294N	N315K	S385N	N390D	A525P								
357821	Q126H	S263A	K294N	N315Q	V365N	N390D							
357822	K294N	N315Q	R339K	A389S	N390D	Q518I							
357823	W50F	N233A	K294N	D310A	N315Q	N390D							
357824	T165Q	S263A	K294N	N315Q	A389S	N390D							
357825	A67G	S177A	K294N	N315Q	D360G	N390D							
357826	Q126H	T149D	E201D	K294N	N315Q	N390D							
357827	A221G	S272G	K294N	N315Q	N390D	A505S							
357828	A250R	S272G	K294N	N315Q	S385N	N390D							
357829	K55R	K105R	I108V	K294N	N315Q	N390D							
357830	N51A	S272G	K294N	N390D									
357831	A102T	T165Q	K294N	N315Q									
357832	S26A	S272G	K294N	N315K	N390D								
357833	I108V	S177N	K294N	N315Q	N390D	Q518I							
357834	Q126H	S272G	K294N	N315Q	T333S	N390D							
357835	T149D	S272G	K294N	N315Q	V365N	N390D							
357836	E201D	S263A	K294N	N315Q	S385N	N390D							
357837	A120V	E187H	A250R	K294N	N315Q	N390D							
357838	S263A	K294N	D310A	N315Q	D360G	N390D							
357839	S167A	T232A	K294N	N315Q	R339K	N390D							
357.840	E103Q	I118V	K294N	N315Q	N390D								
357841	E103Q	T127M	K294N	N315Q	D360G	N390D							

357842	A67G	T232A	K294N	N315Q	A389S	N390D								
357.843	T149D	K294N	N315Q	A389S	N390D	A525P								
357844	S26A	S49N	T149D	K294N	N315Q	N390D								
357845	I118V	T180R	A250R	K294N	N315Q	N390D								
357846	A67G	A250R	K294R	N315Q	N390D									
357847	G171D	S272G	K294N	N315Q	N366A	N390D								
372262	A67G	Q126H	F155H	G171D	K286A	K294N	N315Q	A389S						
372,263	S26V	A67G	I118V	Q126H	G171D	K294N	D312A	N315Q						
372264	S49N	A67G	Q126H	S130A	G171D	K294D	N315Q							
372265	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q						
372266	Q126H	G171D	S198T	N249A	K294N	N315Q								
372267	A67G	Q126H	E288A	N315R	N366A									
372268	S26A	A67G	Q126H	S198T	E288A	K294N	N315Q	G541W						
372269	A67G	Q126H	G171D	Q204R	K294N	N315Q	N366H	Q518I						
372270	A67G	Q126H	G171D	E288A	K294N	I311L	N315Q							
372271	S26A	A67G	A102T	Q126H	G171D	K294N	N315Q	N366A						
372272	A67G	I118V	Q126H	S198T	K294N	I311L	N315Q	A389S						
372,273	N51A	E64A	A67G	Q126H	G171D	K294N	N315Q	A389S						
372274	A67G	Q126H	S198T	S213D	K294N	N315Q	N366A							
372275	S26V	S49N	A67G	Q126H	T281D	K294N	N315Q	T526D						
372276	A67G	I118V	Q126H	G171D	N315Q	S385N								
372277	A67G	I108V	I118V	Q126H	K294N	N315Q	Q518I	G541W						
372278	S49N	A67G	Q126H	S198T	T279D	N315Q								
372279	A67G	Q126H	N231A	N249S	K294N	N315Q	N366A	A389S						
372280	S49N	A67G	A102T	Q126H	K286A	K294N	N315Q	S385N						
372281	A67G	I118V	Q126H	S198T	N249S	K294N	N315Q	Q341A						
372282	A67G	I118V	Q126H	E288A	K294N	N315Q	S385N	D521T						
372283	N51A	A67G	Q126H	S198T	K294D	N315Q	S385N							
372284	A67G	Q126H	K294D	N315Q	R339K	Q518I								
372285	I108V	I118V	Q126H	K286A	K294N	N315Q								
372286	A67G	Q126H	S198T	S272G	K286A	K294N	N315Q	D521T						

372287	A67G	Q126H	G171D	K294N	N315R	R339K	T526D							
372288	N51A	A67G	Q126H	G171D	S272G	K294N	N315Q							
372289	A67G	Q126H	D205G	K294N	D312A	N315Q	A389S	T526D						
372,290	A67G	A102T	Q126H	D205G	S263A	N315Q								
372291	A67G	L94I	Q126H	S198T	S263A	K294N	N315Q	Q518I						
372292	E64A	A67G	A102T	Q126H	K294N	N315Q	Q341A	N366H						
372,293	A67G	Q126H	F155H	S263A	T279D	K294N	N315Q	S385N						
372,294	S26A	A67G	Q126H	N249A	A292D	K294N	N315Q							
372,295	A67G	Q126H	S272G	K294N	N315Q	Q341A	T526D							
372,296	S26A	A67G	Q126H	K294N	N315Q	G337N	R339K							
372,297	A67G	Q126H	N231A	A292D	K294N	D312A	N315Q							
372,298	S26V	A67G	D205G	K294N	N315Q									
372,299	A67G	Q126H	S198T	D205G	K294N	N315R								
372300	A67G	I118V	Q126H	K294N	K299A	N315Q								
372301	A67G	Q126H	F155H	S198T	K294N	N315Q								
372302	A67G	Q126H	G171D	T279D	A292D	K294N	N315Q							
372303	A67G	I108V	Q126H	K294N	I311L	N315Q	N366A							
372304	E64A	A67G	Q126H	K286A	K294N	I311L	N315Q							
372305	A67G	A102T	Q126H	S198T	K294N	N315Q	A389S							
372306	A67G	Q126H	K286A	K294N	N315Q	R339K	N366A							
372307	A67G	Q126H	K294N	N315Q	R339K	S385N	A389S							
372308	L94I	Q126H	K294N	N315Q	R339K									
372309	E64A	A67G	Q126H	Q204R	K294N	N315Q	R339K							
372310	A67G	D95A	A102T	Q126H	K294N	N315Q	Q518I							
372311	N51A	A67G	A102T	I118V	Q126H	K294N	N315Q							
372312	A67G	I118V	Q126H	F155H	K294N	N315Q	G337N							
372313	A67G	D95A	Q126H	T279D	K294N	I311L	N315Q							
372314	A67G	Q126H	N249S	N315Q	G337N									
372315	A67G	L94I	I108V	Q126H	K294N	D312A	N315Q							
372316	A67G	Q126H	G171D	K294N	N315Q	S385N	G541W							
372317	A67G	Q126H	Q204R	T279D	K294N	N315Q	D521T							

372318	N51A	A67G	Q126H	K294N	N315Q	N366A	Q518I						
372319	S49N	N51A	A67G	Q126H	N249S	K294N	N315Q						
372320	S49N	A67G	Q126H	S213D	K294N	N315Q	A389S						
372321	A67G	A102T	Q126H	S213D	K294N	D312A	N315Q						
372322	A67G	Q126H	Q204R	K299A	N315Q								
372323	A67G	I118V	Q126H	T281D	A292D	K294N	N315Q						
372324	A67G	N249A	K294N	N315Q	N366A								
372325	A67G	I118V	Q126H	S272G	K294N	N315Q	N366A						
372326	A67G	Q126H	G171D	T281D	K294N	N315Q	G337N						
372327	S26V	Q126H	K294D	N315Q									
372328	N51A	A67G	L94I	Q126H	D205G	K294N	N315Q						
372329	A67G	Q126H	N315Q	A389S	Q518I								
372330	A67G	Q126H	N249A	K286A	K294N	N315Q	T526D						
372331	A67G	I118V	Q126H	S198T	K294N	N315Q	R339K						
372332	S26A	A67G	I118V	Q126H	K294N	N315Q	A389S						
372333	A67G	D95A	K294N	N315Q	S385N								
372334	A67G	I108V	Q126H	K294N	N315Q	S385N							
372335	A67G	Q126H	N231A	S272G	K294N	N315R							
372336	A67G	Q126H	S130A	K294N	N315Q	S385N	Q518I						
372337	S26A	A67G	I108V	Q126H	S130A	K294N	N315Q						
372338	A67G	Q126H	N249A	S263A	K294N	N315Q	D521T						
372339	S26V	A67G	Q126H	S198T	K294N	N315Q	S385N						
372340	A67G	I108V	Q126H	F155H	S213D	K294N	N315Q						
372341	A67G	I118V	Q204R	K294N	N315Q								
372342	A67G	Q126H	S213D	K294N	K299A	N315Q	Q341A						
372343	Q126H	K294N	N315Q	N366A	S385N								
372344	A67G	Q126H	N249S	K294N	N315R	N366H							
372345	A67G	Q126H	S263A	A292D	K294N	K299A	N315Q						
372346	A67G	I108V	Q126H	T281D	K294N	N315Q	A389S						
372347	E64A	A67G	Q126H	S198T	K294N	K299A	N315Q						
372348	A67G	L94I	Q126H	K294D	N315Q	Q341A							

372349	A67G	Q126H	S130A	E288A	K294N	N315Q	G337N						
372350	A67G	Q126H	K286A	K294N	N315Q	N366H	G541W						
372351	A67G	I118V	Q126H	N231A	S263A	K294N	N315Q						
372352	A67G	D95A	Q126H	K294N	N315Q	A389S							
372353	A67G	Q126H	S130A	S272G	K294N	N315Q	G541W						
372354	N51A	A67G	I108V	Q126H	N315Q								
372355	A67G	Q126H	G171D	N231A	K294N	N315Q	D521T						
372356	A67G	Q126H	T281D	K294N	N315Q	N366H							
381,576	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q					
381,595	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	S213D	K294N	N315Q		
381,596	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q		
381597	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	K294N	D312A	N315Q		
381598	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	K294N	N315Q	D521T		
381,599	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	S263A	K294N	N315Q		
381,600	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	D312A	N315Q		
381601	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	N315Q	D521T		
381602	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	D312A	N315Q		
381603	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	D521T		
381604	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	D312A	N315Q	D521T		
381605	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	S213D	S263A	K294N	N315Q		
381606	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	S213D	K294N	D312A	N315Q		
381607	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	S213D	K294N	N315Q	D521T		
381608	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	S263A	K294N	D312A	N315Q		
381609	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	D521T		
381610	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	K294N	D312A	N315Q	D521T		
381611	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	S263A	K294N	D312A	N315Q		
381612	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	S263A	K294N	N315Q	D521T		
381,613	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	D312A	N315Q	D521T		
381614	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	D312A	N315Q	D521T		
381615	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	K294N	N315Q			
381616	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	N315Q			

381617	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q				
381618	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	D312A	N315Q				
381619	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	D521T				
381620	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	S213D	K294N	N315Q				
381621	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q				
381622	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	K294N	D312A	N315Q				
381623	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	K294N	N315Q	D521T				
381.624	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	S263A	K294N	N315Q				
381625	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	D312A	N315Q				
381.626	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	N315Q	D521T				
381.627	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	D312A	N315Q				
381.628	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	D521T				
381.629	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	D312A	N315Q	D521T				
381630	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	S198T	K294N	N315Q	G541W				
381631	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	K294N	N315Q	R339K	S506D				
381632	A67G	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	N249S	K294N	N315Q	D521T				
381633	A67G	D95A	Q126H	S198T	S263A	N315Q								
381634	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	K299S	N315Q	D521T		
381.635	A67G	D95A	A102T	I108V	G171D	S198T	K294N	N315Q	A389S	G541W				
381636	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	N315Q	D521T	G541W						
381637	E64A	A67G	D95A	A102S	I108V	G171D	S198T	K294N	D312A	N315Q				
381638	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	A389S	D521T		
381.639	E64A	D95A	A102T	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q					
381.640	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	K299A	N315Q	A507V	G541W		
381.641	S49N	D95A	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	N315Q						
381.642	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	N249S	N315Q				
381.643	E64A	A67G	D95A	I108V	G171D	S198T	K294N	N315Q	R339K	Y533W				
381.644	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	D312A	N315Q	R339K	A507V		
381.645	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	D521T	V530L	N538D		
381.646	A67G	D95A	A102T	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	N315Q	Q519E	A537T		
381647	A67G	D95A	A102T	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	R339K	D521T		

381.648	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	K294N	N315Q	A389S	D521T				
381.649	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	R339K			
381.650	E64A	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	I516L	E522S				
381.651	A67G	D95A	I108V	S130A	G171D	S198T	S213D	S263A	K294N	N315Q				
381.652	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	D312A	N315Q	D521T	G541W			
381.653	S26A	A67G	D95A	I108V	G171D	S198T	K294N	N315Q	Q519E	D521T				
381.654	S26V	E64A	A67G	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q					
381.655	D95A	I108T	G171D	S198T	K294N	N315Q								
381.656	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	N538D			
381.657	E64A	A67G	D95A	I108T	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	G541W				
381.658	A67G	D95A	A102T	I108V	Q126H	G171D	S198T	N315Q	N538D					
381.659	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	K299A	N315Q	I516L	D521T			
381.660	A67G	D95A	Q126H	G171D	S198T	K294N	A389S							
381.661	S26A	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	K294N	N315Q				
381.662	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	N315Q	A389S	V530L			
381.663	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	N315Q	D521T						
381.664	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	N315Q					
381.665	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	D312A	N315Q	A389S	R542K			
381.666	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	N315Q	A537T	A539S					
381.667	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	A389S	D513T			
381.668	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	R339K	Q519E	G541W			
381.669	A67G	D95A	A102S	I108T	Q126H	G171D	S198T	K294N	K299S	N315Q				
381.670	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	A389T	D521T	Y533W			
381.671	S49N	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	A537T					
381.672	A67G	D95A	I108V	G171D	S198T	N315Q	A389T							
381.673	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	N315Q	R339K	A389S					
381.674	A67G	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	V530L	R542K					
381.675	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	A389S	A507V				
381.676	A67G	D95A	I108V	Q126H	S198T	K294N	K299S	N315Q	R339K					
381.677	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	D312A	N315Q					
381.678	S26A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	A389T					

381.679	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	N249S	S263A	K294N	N315Q	R542K			
381680	A67G	D95A	I108V	G171D	S198T	K294N	N315Q	D513T						
381681	S26V	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	D513T					
381682	A67G	D95A	A102S	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	A539S				
381.683	A67G	D95A	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	K294N	D312A	N315Q	E522S			
381.684	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	K299A	N315Q	S506D	A539S			
381.685	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	N315Q	G541W				
381686	A67G	D95A	A102T	I108V	Q126H	S130A	G171D	S198T	K294N	N315Q	I516L			
381687	S49N	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	R339K	D521T			
381.688	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q	S506D	Y533W	G541W			
381.689	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S213D	K294N	N315Q	D521T	E522S			
385020	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	Q398H	I407V	G435A	N538D
385021	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	R404A	K472Q	T473A	N538D
385022	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	V418L	S427N	K472Q	N538D
385023	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	I407V	S427N	T483A	N538D
385024	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	Q398H	V418L	A487S	N538D
385025	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	Q398H	R404I	K472Q	N538D
385026	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	R404I	T483A	A487S	N538D
385027	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	S427N	G435A	T473A	N538D
385028	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	R404I	I407V	T498R	N538D
385029	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	R404A	G435A	T498R	N538D
385030	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	T473A	A487S	T498R	N538D
385031	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	R404A	V418L	T483A	N538D

Tabla 2. Variantes seleccionadas de amilasa maltotriosa

ID del gen	Nombre	Sustituciones de aminoácidos relativas a SEQ ID NO:1													SEQ ID NO:
343612	ETY71443														1
354034	AmyE_R1-V7	N181D	I297R	N366R											2

354040	AmyE_R1-V13	A45L	S49N	K294N												3
354041	AmyE_R1-V1	Q126H	G372N	S385N												4
354046	AmyE_R1-V1	S49N	F285Y	A389S												5
354056	AmyE_R1-V2	Q137G	T149D	N366A												6
354059	AmyE_R1-V3	T165Q	K294N	N315K												7
354118	AmyE_R1-V9	K294N	N315Q	N390D												8
354122	AmyE_R1-V95	S26A	S49N	N51A												9
357763	AmyE_R2-V11	S49N	G171D	K294N	N315Q	S385N	N390D									10
357771	AmyE_R2-V19	A67G	Q126H	K294N	N315Q											11
357775	AmyE_R2-V23	Q126H	K294N	D310A	N315Q	A389S	N390D									12
357784	AmyE_R2-V32	I108V	K294N	N315Q	R339K											13
357821	AmyE_R2-V69	Q126H	S263A	K294N	N315Q	V365N	N390D									14
357826	AmyE_R2-V74	Q126H	T149D	E201D	K294N	N315Q	N390D									15
357834	AmyE_R2-V82	Q126H	S272G	K294N	N315Q	T333S	N390D									16
372265	AmyE_R3-V4	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	N315Q							17
372274	AmyE_R3-V13	A67G	Q126H	S198T	S213D	K294N	N315Q	N366A								18
372278	AmyE_R3-V17	S49N	A67G	Q126H	S198T	T279D	N315Q									19
372291	AmyE_R3-V30	A67G	L94I	Q126H	S198T	S263A	K294N	N315Q	Q518I							20
372305	AmyE_R3-V44	A67G	A102T	Q126H	S198T	K294N	N315Q	A389S								21
372337	AmyE_R3-V76	S26A	A67G	I108V	Q126H	S130A	K294N	N315Q								22
381649	AmyE_R4_V55	E64A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	R339K				23
381656	AmyE_R4_V62	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	N538D				24
381678	AmyE_R4_V84	S26A	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	K294N	A389T						25
385020	AmyE_R4B-V1	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	Q398H	I407V	G435A	N538D	26
385022	AmyE_R4B-V3	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	V418L	S427N	K472Q	N538D	27
385023	AmyE_R4B-V4	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	I407V	S427N	T483A	N538D	28
385027	AmyE_R4B-V8	S26V	A67G	D95A	I108V	Q126H	G171D	S198T	S263A	K294N	N315Q	S427N	G435A	T473A	N538D	29

Identificación de amilasa (612) a partir del cribado inicial

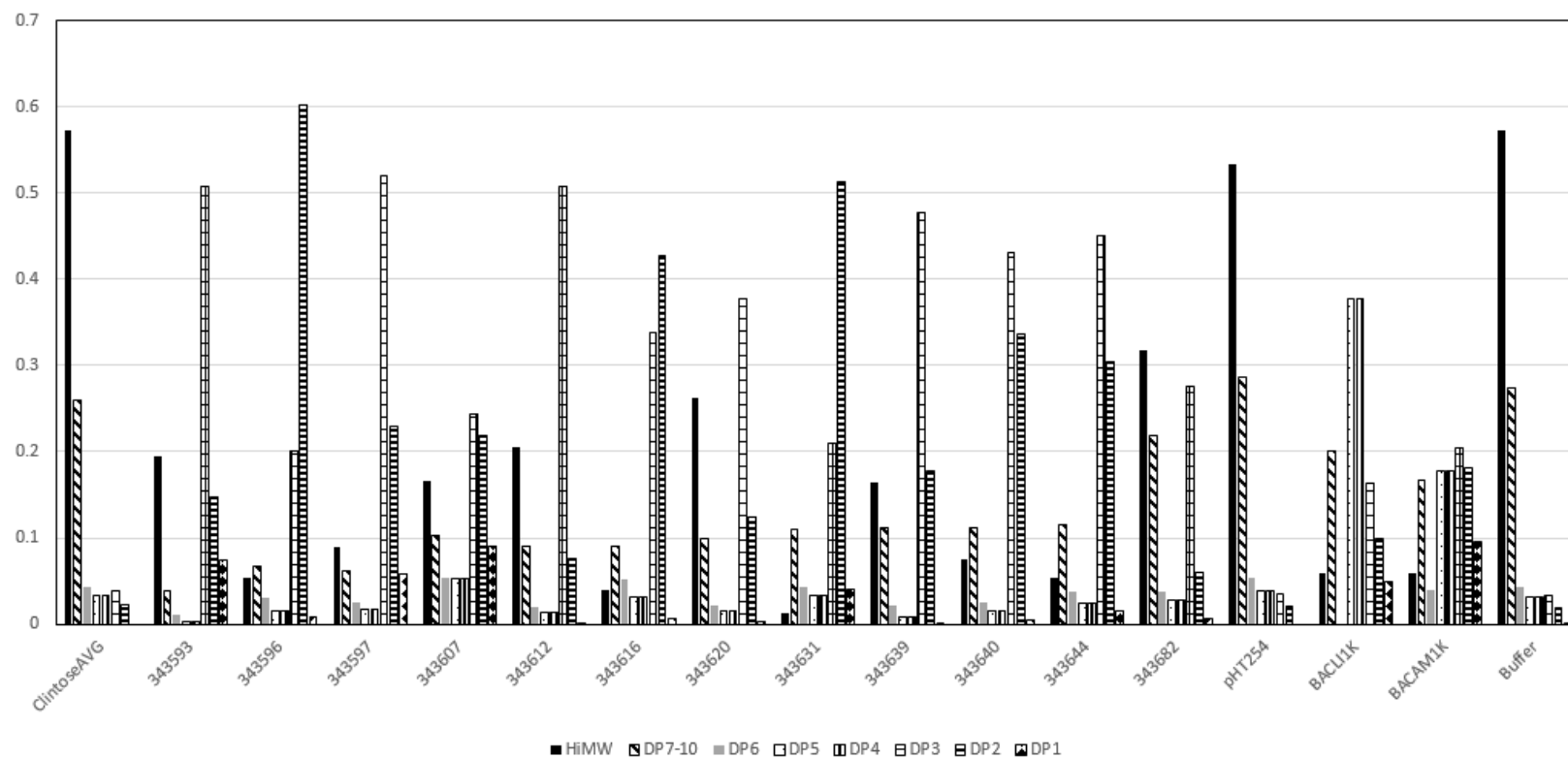


FIG. 1

Mejora en la estabilidad térmica y la estabilidad proteolítica en el caldo completo después de la ronda 3 de ingeniería de proteínas

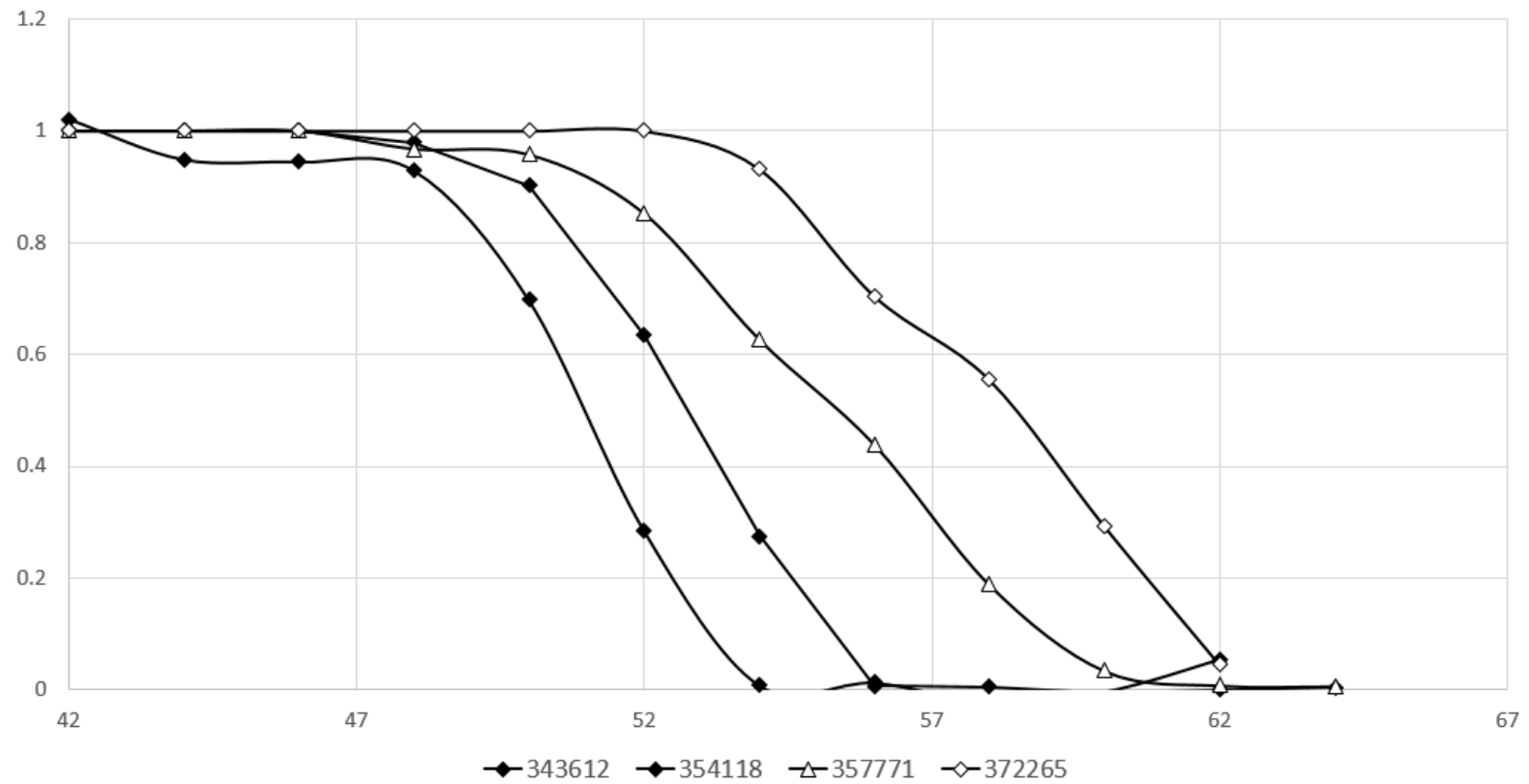


FIG. 2

Estabilidad comparativa de las variantes de la enzima en el caldo completo cuando se calientan

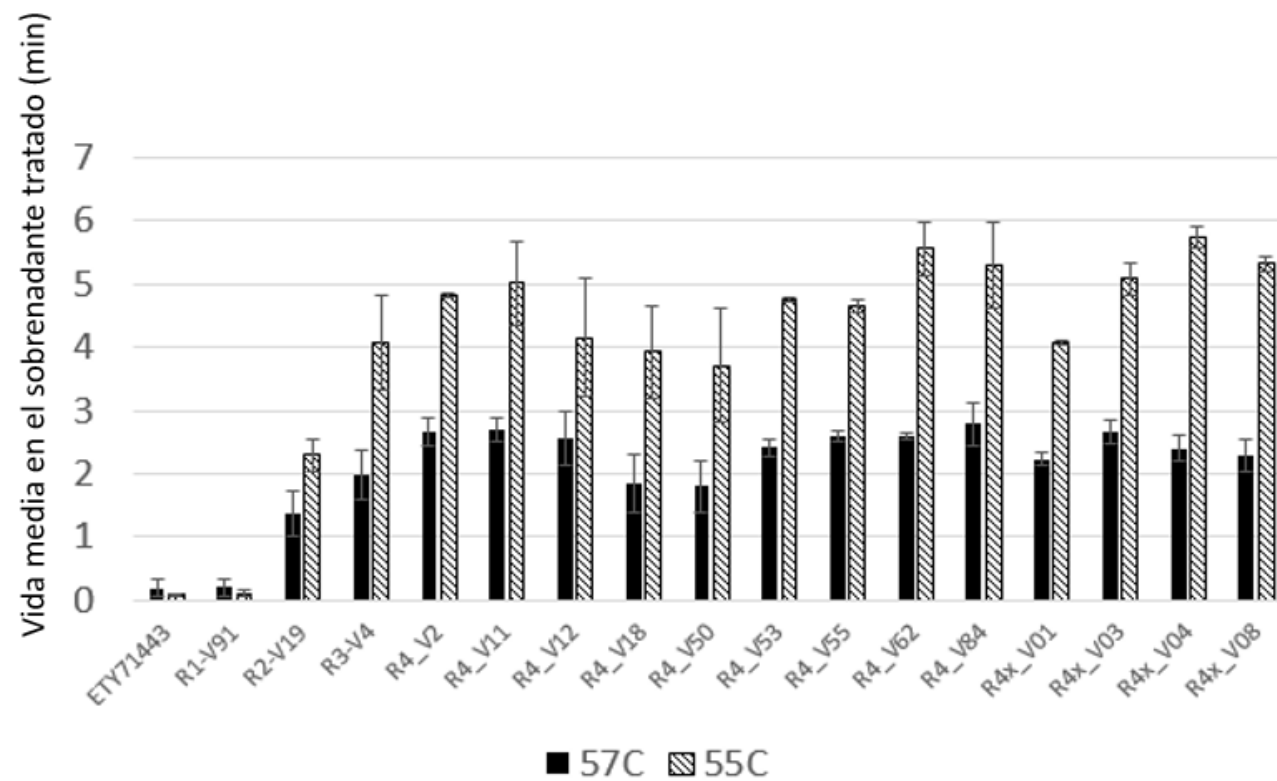


FIG. 3

Hidrólisis de maltodextrina (Clintose CR10) por las variantes de enzima a 56 C

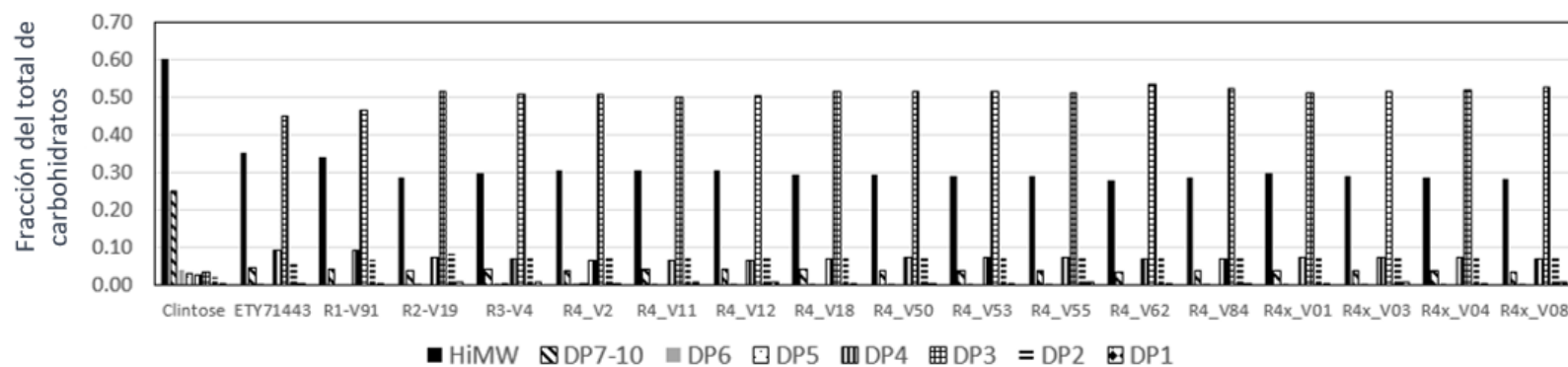


FIG. 4

Hidrólisis de maltodextrina (Clintose CR10) por las variantes de enzima a 63 C

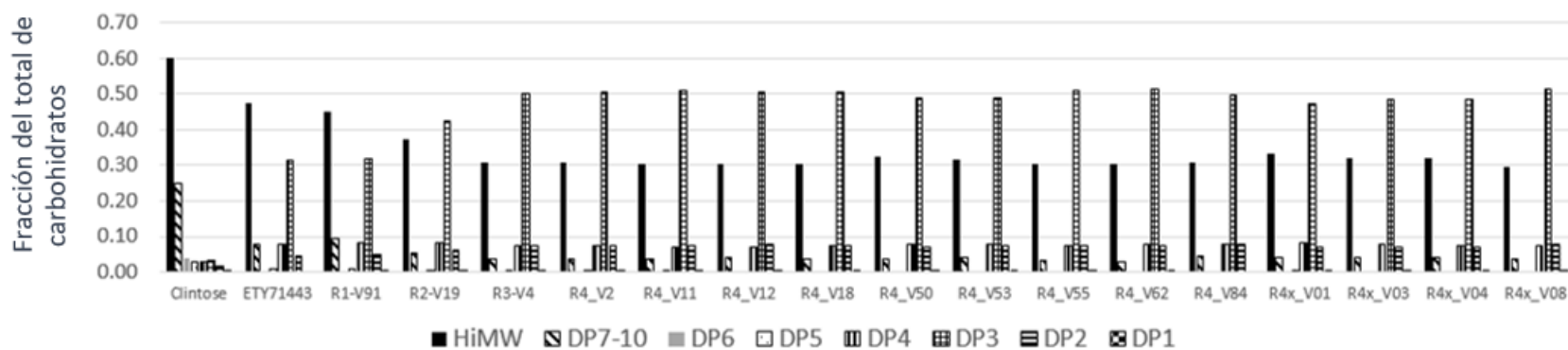


FIG. 5