



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0913402-6 B1



(22) Data do Depósito: 02/06/2009

(45) Data de Concessão: 02/07/2019

(54) Título: ALFA AMILASES (AMYS) VARIANTES DE GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS COM PROPRIEDADES MELHORADAS

(51) Int.Cl.: C12N 9/28; C11D 3/386.

(30) Prioridade Unionista: 06/06/2008 US 61/059,423.

(73) Titular(es): DANISCO US INC..

(72) Inventor(es): WILLIAM A. CUEVAS; WALTER WEYLER; DAVID A. ESTELL; SUR A HUSSAIN HADI; SANG-KYU LEE; SANDRA W. RAMER; ANDREW SHAW; AMR R. TOPPOZADA.

(86) Pedido PCT: PCT US2009046034 de 02/06/2009

(87) Publicação PCT: WO 2009/149130 de 10/12/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 03/12/2010

(57) Resumo: ALFA AMILASES (AMYS) VARIANTES DE GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS COM PROPRIEDADES MELHORADAS A presente invenção refere-se a variantes de uma alfa-amilase parental que exibem uma alteração em pelo menos uma das seguintes propriedades em relação à dita alfa-amilase parental: atividade específica, especificidade por substrato, ligação de substrato, clivagem de substrato, estabilidade térmica, atividade dependente de pH, estabilidade dependente de pH, estabilidade oxidativa, dependência de cálcio, pl e desempenho de lavagem. As variantes são adequadas para conversão de amido, produção de etanol, lavagem de roupas, lavagem de louças, limpeza de superfície dura, desengomagem têxtil e/ou produção de adoçante.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**ALFA AMILASES (AMYS) VARIANTES DE GEOBACILLUS STEAROTHERMOPHILUS COM PROPRIEDADES MELHORADAS**".

PRIORIDADE

5 O presente pedido de patente reivindica prioridade sobre o Pedido Provisório de Patente norte-americana Nº de Série 61/059.423, depositado em 6 de junho de 2008, que é neste pedido incorporado por referência.

CAMPO TÉCNICO

São descritas variantes de uma α -amilase parental que exibem
10 uma alteração em pelo menos uma das seguintes propriedades em relação à dita α -amilase parental: atividade específica, especificidade por substrato, ligação de substrato, clivagem de substrato, estabilidade térmica, atividade dependente de pH, estabilidade dependente de pH, estabilidade oxidativa, dependência de Ca^{2+} , pl e desempenho de lavagem. As variantes são adequadas para conversão de amido, produção de etanol, lavagem de roupas,
15 lavagem de louças, limpeza de superfície dura, desengomagem têxtil e/ou produção de adoçante.

ANTECEDENTES

Alfa (α)-amilases (α -1,4-glican-4-glicanohidrolases, E.C. 3.2.1.1)
20 constituem um grupo de enzimas, que catalisam a hidrólise de amido e outros oligo- e polissacarídeos 1,4-glicosídicos lineares e ramificados. α -Amilases podem ser usadas comercialmente nos estágios iniciais do processamento de amido (liquefação); na moagem úmida de milho; na produção de álcool; como agentes de limpeza em matrizes de detergente; na indústria têxtil de desengomagem de amido; em aplicações de panificação; na indústria de bebidas; em campos petrolíferos em processos de perfuração; na desengomagem de papel reciclado e em forragem.
25

Embora as α -amilases atualmente disponíveis tenham sido usadas com algum êxito nestas aplicações, permanece uma necessidade de α -amilases com atividade específica aumentada, especificidade pelo substrato adaptada, estabilidade térmica, de pH e oxidativa melhoradas e dependência de Ca^{2+} reduzida.
30

SUMÁRIO

Em um aspecto, novas variantes α -amilolíticas (mutantes) de SPEZYME[®] Xtra ou AmyS similares à α -amilase, são fornecidas, a partir de variantes particulares que exibem propriedades alteradas que são vantajosas com relação ao processamento industrial do amido (liquefação, sacarifi-

5 cação, limpeza de amido, e similares).

Tais alterações nas propriedades podem ser alcançadas pela introdução de mutações em uma α -amilase parental que afetem, *por exemplo*, a atividade específica, a especificidade por substrato, a ligação de substrato,

10 o padrão de clivagem de substrato, a estabilidade térmica, o perfil pH/atividade, o perfil pH/estabilidade, a estabilidade em relação à oxidação, a dependência de Ca^{2+} e outras propriedades de interesse. Por exemplo, a alteração pode resultar em uma variante que, em comparação com Spezyme Xtra parental similar à α -amilase, tem uma dependência reduzida de Ca^{2+}

15 e/ou um perfil de pH/atividade e/ou termoestabilidade alterado.

Em algumas modalidades, as variantes são baseadas na α -amilase de *Geobacillus stearothermophilus* parental, ou têm um grau especificado de identidade de sequência de aminoácidos a esta α -amilase, *por exemplo*, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

20 96%, 97%, 98% ou até 99%. Em outras modalidades, as variantes são baseadas na α -amilase parental relacionada, *por exemplo*, àquelas que têm identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou até 99% à α -amilase de *Geobacillus stearothermophilus*.

Em algumas modalidades, é fornecido um polipeptídeo variante tendo atividade de α -amilase e pelo menos uma característica alterada que melhore o desempenho enzimático, o polipeptídeo variante compreendendo uma sequência de aminoácidos tendo identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 60% a um polipeptídeo α -amilase parental selecionado a

25 partir de AmyS (SEQ ID NO: 1) ou uma variante truncada de AmyS (SEQ ID NO: 2), e tendo pelo menos uma das seguintes mutações em um resíduo de aminoácido correspondente àquele do polipeptídeo α -amilase parental como

30

determinado pelo alinhamento dos polipeptídeos variantes com o polipeptídeo parental, em que a mutação modifica o resíduo de aminoácido a partir daquele dos polipeptídeos parentais:

- 5 a) uma substituição que introduz um resíduo de aminoácido positivamente carregado em uma ou mais posições selecionadas do grupo consistindo em D19, N28, E29, Q86, Q89, Q97, N224, N271, N281, D306, D318, Q319, Q358, D393, Q443 e D458;
- 10 b) uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em 74A, 115L, 124K, 124R, 132A, 132C, 135A, 145A, 146A, 148A, 148N, 159A, 159C, 159D, 159E, 159F, 159G, 159H, 159K, 159L, 159N, 159R, 159S, 159T, 159V, 169A, 169L, 169M, 169Y, 179A, 181A, 181C, 181D, 181E, 181L, 181P, 181Q, 181V, 181Y, 242A, 242D, 242E, 242Q, 261L, 271A, 271V, 278A, 278H, 278K, 278N, 278R, 281A, 281L, 281M, 302D, 302M, 304D, 15 304E, 304M, 321A, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 378D, 378N, 378R, 382D, 398A, 418A, 418M, 418N, 420A, 421R, 432A, 432D, 432L, 432M, 432N, 432Q, 432R, 432Y, 437D, 437G, 437H, 437L, 437M, 437Y, 446A, 446Y, 454A, 464Q, 464Y, 474A, 474E, 474K, 474L, 474M, 474N, 474P, 474Q, 474R, 474S e 474V;
- 20 c) uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em 6I, 6N, 6Q, 6T, 6V, 14T, 16F, 25A, 25C, 25G, 25Q, 27M, 36Q, 36S, 39G, 39V, 50I, 50L, 50M, 50N, 50Q, 52S, 53T, 67N, 67S, 80D, 80I, 90E, 133P, 133V, 137M, 137S, 141E, 141I, 141L, 141M, 141Q, 141R, 141S, 141V, 150E, 151I, 152G, 25 155S, 155Y, 168W, 173T, 188P, 193F, 193K, 193L, 193Y, 213L, 213M, 213V, 217Q, 220P, 220Q, 220R, 220S, 220V, 221I, 221S, 249E, 250F, 250I, 250M, 252L, 253Y, 254E, 254F, 254T, 254V, 255F, 255K, 255W, 257L, 257M, 257S, 257V, 258D, 258G, 258H, 258K, 258Q, 258T, 258V, 268F, 274W, 283M, 283N, 283V, 285E, 285Q, 293G, 293K, 294W, 301F, 301I, 30 301P, 301R, 301T, 301W, 309D, 309V, 312H, 312S, 312V, 312Y, 313G, 313H, 313I, 313L, 313S, 313V, 318T, 338A, 338C, 338G, 338M, 338T, 339K, 339T, 339V, 340A, 340M, 340Q, 340T, 343C, 343I, 343P, 343R, 343Y, 345I,

345Q, 369I, 369T, 370G, 375T, 385T, 386K, 394L, 394V, 400A, 400N, 400V, 402H, 402I, 402T, 402V, 402W, 403A, 403E, 403G, 403Q, 403R, 403T, 403V, 404C, 404E, 404G, 404I, 404V, 419A, 419C, 419M, 419T, 422E, 422G, 433A, 433H, 433I, 433K, 433L, 433M, 433V, 433Y, 442A, 442G, 5 442N, 442R, 442S, 442T, 442V, 442W, 442Y, 445G, 445I, 445N, 445T, 445V, 445W, 447I, 447N, 447Q, 447W, 447Y, 448C, 448F, 448G, 448H, 448I, 448N, 448Y, 450C, 450H, 450M, 450N, 450R, 450S, 450T, 450W, 455G, 455I, 455P, 455V, 463A, 463M, 463S, 463T, 463V, 463W, 465G, 465I, 465K, 465N, 465T, 465V, 469D, 469W, 469Y, 471I, 471V, 473G, 473Y, 10 476A, 476G, 476L, 476M, 476N e 476T

d) uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em 124N, 125A, 125K, 125N, 130A, 130S, 159A, 159D, 159E, 159G, 159H, 159K, 159L, 159N, 159R, 159S, 159T, 166F, 166G, 166H, 166S, 166Y, 169L, 179A, 15 179P, 180A, 180D, 180H, 180K, 180L, 180N, 180T, 180V, 180Y, 181A, 181D, 181E, 181G, 181P, 181R, 181S, 181V, 187A, 187C, 187K, 187N, 187P, 187Q, 187R, 187S, 242H, 242N, 278H, 278K, 278N, 278R, 281M, 302D, 304M, 304Y, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 432Q, 437Y, 446A, 474Q e 474S,

e) uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em 6A, 6D, 6E, 6H, 6I, 6K, 6L, 6M, 6N, 6P, 6Q, 6R, 6S, 6T, 6V, 6W, 6Y, 13K, 14F, 14T, 14Y, 15A, 15D, 15E, 15G, 15H, 15K, 15N, 15P, 15Q, 15R, 15S, 15T, 15W, 16A, 16E, 16G, 16H, 16K, 16N, 16P, 16Q, 16R, 16T, 25C, 39D, 39E, 39N, 39Q, 25 81Y, 121P, 139D, 139H, 139R, 139Y, 177A, 188D, 191H, 191K, 192A, 192D, 192G, 192N, 192P, 192Q, 192S, 192T, 192V, 192Y, 196A, 196C, 196D, 196E, 196F, 196H, 196I, 196K, 196P, 196R, 196S, 196T, 196V, 201A, 201E, 201G, 201H, 201M, 202H, 216E, 216G, 216H, 216M, 216Q, 216R, 216S, 216T, 216Y, 221A, 221D, 221F, 221I, 221L, 221M, 221N, 221R, 221S, 221V, 30 221Y, 237G, 240G, 240N, 240P, 240Q, 240R, 240T, 246R, 250A, 250D, 250E, 250F, 250G, 250I, 250K, 250L, 250M, 250N, 250Q, 250R, 250S, 250W, 252K, 268A, 268D, 268E, 268G, 268H, 268K, 268N, 268P, 268Q,

268R, 268S, 274A, 274D, 274G, 274I, 274K, 274L, 274N, 274Q, 274R, 274S, 274T, 275K, 285Q, 285Y, 293K, 293R, 318A, 318F, 318G, 318I, 318K, 318L, 318M, 318R, 318S, 318T, 318V, 318Y, 319C, 319D, 319H, 319I, 319K, 319R, 319Y, 320K, 320R, 320T, 338A, 338G, 338I, 338M, 338P, 338S, 338V, 339G, 339P, 340A, 340D, 340E, 340H, 340K, 340N, 340Q, 345E, 363D, 363E, 363M, 363N, 363Q, 363S, 366Q, 370A, 370D, 370E, 370H, 370K, 370N, 370Q, 370S, 375A, 375D, 375E, 375K, 375N, 375Q, 375R, 375S, 419A, 419I, 419M, 419P, 419S, 419V, 448Y, 452N, 452Q, 452R, 452S, 471R e 471Y; e

- 10 f) uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em I181A, I181P, I181C, I181E, I181Y, S242A, S242E, G132A, N193Y e E188P.

Em algumas modalidades, a variante inclui uma mutação que introduz um resíduo de aminoácido positivamente carregado em uma ou mais posições selecionadas do grupo consistindo em D19, N28, E29, Q86, Q89, Q97, N224, N271, N281, D306, D318, Q319, Q358, D393, Q443 e D458, e as exposições de polipeptídeos variantes melhoraram o desempenho de limpeza. Em modalidades particulares, a limpeza melhorada é sob as condições de lavagem de roupa norte-americanas, e é determinada usando um ensaio de microamostra. Em modalidades particulares, o resíduo de aminoácido positivamente carregado é arginina.

Em algumas modalidades, a variante inclui uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em 74A, 115L, 124K, 124R, 132A, 132C, 135A, 145A, 146A, 148A, 148N, 159A, 159C, 159D, 159E, 159F, 159G, 159H, 159K, 159L, 159N, 159R, 159S, 159T, 159V, 169A, 169L, 169M, 169Y, 179A, 181A, 181C, 181D, 181E, 181L, 181P, 181Q, 181V, 181Y, 242A, 242D, 242E, 242Q, 261L, 271A, 271V, 278A, 278H, 278K, 278N, 278R, 281A, 281L, 281M, 302D, 302M, 304D, 304E, 304M, 321A, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 378D, 378N, 378R, 382D, 398A, 418A, 418M, 418N, 420A, 421R, 432A, 432D, 432L, 432M, 432N, 432Q, 432R, 432Y, 437D, 437G, 437H, 437L, 437M, 437Y, 446A, 446Y, 454A, 464Q, 464Y, 474A, 474E, 474K,

474L, 474M, 474N, 474P, 474Q, 474R, 474S e 474V, e a variante melhorou a termoestabilidade em comparação com o polipeptídeo parental.

Em algumas modalidades, a variante inclui uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em 6I, 6N, 6Q, 6T, 6V, 14T, 16F, 25A, 25C, 25G, 25Q, 27M, 36Q, 36S, 39G, 39V, 50I, 50L, 50M, 50N, 50Q, 52S, 53T, 67N, 67S, 80D, 80I, 90E, 133P, 133V, 137M, 137S, 141E, 141I, 141L, 141M, 141Q, 141R, 141S, 141V, 150E, 151I, 152G, 155S, 155Y, 168W, 173T, 188P, 193F, 193K, 193L, 193Y, 213L, 213M, 213V, 217Q, 220P, 220Q, 220R, 220S, 220V, 221I, 221S, 249E, 250F, 250I, 250M, 252L, 253Y, 254E, 254F, 254T, 254V, 255F, 255K, 255W, 257L, 257M, 257S, 257V, 258D, 258G, 258H, 258K, 258Q, 258T, 258V, 268F, 274W, 283M, 283N, 283V, 285E, 285Q, 293G, 293K, 294W, 301F, 301I, 301P, 301R, 301T, 301W, 309D, 309V, 312H, 312S, 312V, 312Y, 313G, 313H, 313I, 313L, 313S, 313V, 318T, 338A, 338C, 338G, 338M, 338T, 339K, 339T, 339V, 340A, 340M, 340Q, 340T, 343C, 343I, 343P, 343R, 343Y, 345I, 345Q, 369I, 369T, 370G, 375T, 385T, 386K, 394L, 394V, 400A, 400N, 400V, 402H, 402I, 402T, 402V, 402W, 403A, 403E, 403G, 403Q, 403R, 403T, 403V, 404C, 404E, 404G, 404I, 404V, 419A, 419C, 419M, 419T, 422E, 422G, 433A, 433H, 433I, 433K, 433L, 433M, 433V, 433Y, 442A, 442G, 442N, 442R, 442S, 442T, 442V, 442W, 442Y, 445G, 445I, 445N, 445T, 445V, 445W, 447I, 447N, 447Q, 447W, 447Y, 448C, 448F, 448G, 448H, 448I, 448N, 448Y, 450C, 450H, 450M, 450N, 450R, 450S, 450T, 450W, 455G, 455I, 455P, 455V, 463A, 463M, 463S, 463T, 463V, 463W, 465G, 465I, 465K, 465N, 465T, 465V, 469D, 469W, 469Y, 471I, 471V, 473G, 473Y, 476A, 476G, 476L, 476M, 476N e 476T, e a variante melhorou a termoestabilidade em comparação com o polipeptídeo parental.

Em algumas modalidades, a variante inclui uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em 124N, 125A, 125K, 125N, 130A, 130S, 159A, 159D, 159E, 159G, 159H, 159K, 159L, 159N, 159R, 159S, 159T, 166F, 166G, 166H, 166S, 166Y, 169L, 179A, 179P, 180A, 180D, 180H, 180K, 180L,

180N, 180T, 180V, 180Y, 181A, 181D, 181E, 181G, 181P, 181R, 181S, 181V, 187A, 187C, 187K, 187N, 187P, 187Q, 187R, 187S, 242H, 242N, 278H, 278K, 278N, 278R, 281M, 302D, 304M, 304Y, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 432Q, 437Y, 446A, 474Q e 474S, e a variante exibiu atividade ou expressão aumentada em comparação com o polipeptídeo parental.

Em algumas modalidades, a variante inclui uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em 6A, 6D, 6E, 6H, 6I, 6K, 6L, 6M, 6N, 6P, 6Q, 6R, 6S, 6T, 6V, 6W, 6Y, 13K, 14F, 14T, 14Y, 15A, 15D, 15E, 015G, 15H, 15K, 15N, 15P, 15Q, 15R, 15S, 15T, 15W, 16A, 16E, 16G, 16H, 16K, 16N, 16P, 16Q, 16R, 16T, 25C, 39D, 39E, 39N, 39Q, 81Y, 121P, 139D, 139H, 139R, 139Y, 177A, 188D, 191H, 191K, 192A, 192D, 192G, 192N, 192P, 192Q, 192S, 192T, 192V, 192Y, 196A, 196C, 196D, 196E, 196F, 196H, 196I, 196K, 196P, 196R, 196S, 196T, 196V, 201A, 201E, 201G, 201H, 201M, 202H, 216E, 216G, 216H, 216M, 216Q, 216R, 216S, 216T, 216Y, 221A, 221D, 221F, 221I, 221L, 221M, 221N, 221R, 221S, 221V, 221Y, 237G, 240G, 240N, 240P, 240Q, 240R, 240T, 246R, 250A, 250D, 250E, 250F, 250G, 250I, 250K, 250L, 250M, 250N, 250Q, 250R, 250S, 250W, 252K, 268A, 268D, 268E, 268G, 268H, 268K, 268N, 268P, 268Q, 268R, 268S, 274A, 274D, 274G, 274I, 274K, 274L, 274N, 274Q, 274R, 274S, 274T, 275K, 285Q, 285Y, 293K, 293R, 318A, 318F, 318G, 318I, 318K, 318L, 318M, 318R, 318S, 318T, 318V, 318Y, 319C, 319D, 319H, 319I, 319K, 319R, 319Y, 320K, 320R, 320T, 338A, 338G, 338I, 338M, 338P, 338S, 338V, 339G, 339P, 340A, 340D, 340E, 340H, 340K, 340N, 340Q, 345E, 363D, 363E, 363M, 363N, 363Q, 363S, 366Q, 370A, 370D, 370E, 370H, 370K, 370N, 370Q, 370S, 375A, 375D, 375E, 375K, 375N, 375Q, 375R, 375S, 419A, 419I, 419M, 419P, 419S, 419V, 448Y, 452N, 452Q, 452R, 452S, 471R e 471Y, e a variante exibe atividade ou expressão aumentada em comparação com o polipeptídeo parental.

Em algumas modalidades, a variante inclui uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em I181A, I181P, I181C, I181E, I181Y, S242A, S242E,

G132A, N193Y, e E188P, e a variante exibe redução de viscosidade aumentada em um ensaio de liquefação de amido em comparação com o polipeptídeo parental.

Em algumas modalidades, um polipeptídeo α -amilase variante é fornecido, compreendendo uma sequência de aminoácidos derivada de um polipeptídeo α -amilase parental, e tendo uma combinação de três ou mais mutações em posições selecionadas do grupo consistindo em 5, 6, 13, 14, 15, 16, 18, 20, 25, 27, 29, 36, 39, 50, 52, 53, 54, 67, 71, 73, 75, 77, 80, 81, 83, 85, 90, 92, 107, 111, 113, 114, 120, 121, 126, 128, 131, 133, 137, 138, 139, 141, 143, 147, 149, 150, 151, 152, 155, 160, 165, 168, 172, 173, 177, 188, 191, 192, 193, 196, 200, 201, 202, 213, 216, 217, 220, 221, 227, 232, 235, 237, 238, 240, 246, 249, 250, 252, 253, 254, 255, 257, 258, 268, 272, 274, 275, 279, 283, 285, 293, 294, 297, 300, 301, 306, 309, 312, 313, 317, 318, 319, 320, 338, 339, 340, 343, 345, 363, 366, 369, 370, 375, 379, 381, 385, 386, 391, 392, 393, 394, 400, 402, 403, 404, 406, 407, 410, 413, 414, 416, 419, 422, 427, 433, 436, 439, 442, 445, 447, 448, 450, 452, 455, 463, 465, 469, 471, 473 e 476, em que os polipeptídeos têm atividade de α -amilase, e onde cada uma de pelo menos três ou mais mutações introduz um resíduo de aminoácido que se diferencia daquele no polipeptídeo parental. Em modalidades particulares, o número de mutações é 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ou mais.

Em algumas modalidades, onde a mutação não estiver na posição 242, a mutação está presente em combinação com as substituições S242A, S242E, S242Q, S242F, S242H ou S242N. Em modalidades particulares, a substituição é S242Q. Em algumas modalidades, onde a mutação não estiver na posição 179 ou 180, a mutação está presente em combinação com uma deleção nas posições 179 e 180. Em algumas modalidades, onde a mutação não estiver na posição 349 ou 428, a mutação está presente em combinação com uma substituição de uma cisteína em um ou mais destes aminoácidos.

Em algumas modalidades, onde a mutação não estiver em uma das seguintes posições, a mutação está presente em combinação com uma

substituição na posição P17, D19, T21, N28, S51, G72, V74, A82, Q86, Q89, A93, G95, Q97, W115, D117, P123, S124, D125, N127, I130, G132, Q135, P145, G146, G148, S153, Y159, W166, S169, K171, W187, P209, N224, S242, G256, D269, N271, T278, N281, G302, A304, R308, T321, Q358,
 5 P378, S382, K383, T398, H405, T417, E418, P420, G421, P432, W437, G446, G454, S457, T459, T461, S464, G474 ou R483.

Em algumas modalidades, onde a mutação não estiver em uma das seguintes posições, a mutação está presente em combinação com uma substituição na posição M8, M9, M15, M96, V128, A111, H133, W138, T149,
 10 M197, N188, M200, M206, A209, A210, M284, M307, M311, M316, H405, T412, M438, N193F e V416G.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo parental tem identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou até pelo menos 95% ao polipeptídeo da SEQ ID NO: 1.

15 Em algumas modalidades, o polipeptídeo parental tem identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, ou até pelo menos 95% ao polipeptídeo da SEQ ID NO: 2.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo parental tem identidade de sequência de aminoácidos de pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo
 20 menos 90%, ou até pelo menos 95% a um polipeptídeo selecionado a partir do grupo consistindo da SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 e SEQ ID NO: 16. Em algumas modalidades, o polipeptídeo parental inclui
 25 um truncamento dos resíduos de aminoácidos C-terminais. Em modalidades particulares, o truncamento é nos 29 resíduos de aminoácidos do C-terminal.

Em algumas modalidades, o polipeptídeo variante não inclui mutações na posição 106 ou 199, ou ambas.

Em algumas modalidades, uma ou mais mutações podem ser
 30 adicionadas ou deletadas de uma lista de mutações sem se afastar da descrição. De um modo semelhante, qualquer uma ou mais mutações que apareçam no contexto de uma lista de mutações podem ser combinadas como

um subconjunto de mutações.

Em outro aspecto, uma composição compreendendo uma ou mais das α -amilases variantes acima mencionadas é fornecida. Em modalidades particulares, a composição é uma composição de limpeza, tal como
5 um detergente para lavagem de roupa, um detergente para lavagem de louças, uma composição de limpeza de superfície dura, ou similares. A composição pode incluir um detergente.

Em outro aspecto, um método para hidrólise de um substrato de amido solúvel usando uma variante de α -amilase é fornecido. Em algumas
10 modalidades, a variante inclui uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em I181A, I181P, I181C, I181E, I181Y, S242A, S242E, S242Q, G132A, N193Y e E188P.

Em algumas modalidades, a α -amilase variante é usada em
15 combinação com uma enzima de hidrólise de ácido fítico, em que a proporção da atividade de α -amilase (em unidades de α -amilase) para a atividade de ácido fítico (em unidades de fitase), isto é, AAU:FTU, é de aproximadamente 1:15 a aproximadamente 15:1, e preferencialmente de 1:10 a aproximadamente 10:1. Em modalidades particulares, a proporção de AAU:FTU é
20 de 1:4 a 3:1, ou até 1:1.

Em um aspecto adicional, um método para liquefação do amido em uma pasta fluida é fornecido, envolvendo um substrato que inclui material vegetal, tal como amido granular a partir de um processo de moagem seca ou úmida, o método compreendendo uma etapa de liquefação primária
25 e/ou secundária, envolvendo adição à pasta fluida na etapa de liquefação primária e/ou secundária, em qualquer ordem, de uma combinação de pelo menos uma enzima de hidrólise de ácido fítico e pelo menos uma α -amilase variante, simultaneamente ou separadamente. O método pode compreender ainda sacarificação do amido liquefeito para obtenção de açúcares fermentáveis; e recuperação dos açúcares fermentáveis. Em algumas modalidades,
30 o método compreende ainda a fermentação dos açúcares fermentáveis sob condições de fermentação adequadas para obtenção de produtos finais, tais

como álcool. Em algumas modalidades, a composição enzimática contém pelo menos uma α -amilase variante e uma fitase. Em algumas modalidades, a composição enzimática está na forma mista.

5 Em um aspecto adicional, um método para fermentação de um substrato de amido é fornecido, o método compreendendo a adição em qualquer ordem de uma combinação de uma α -amilase variante e uma fitase em uma dose única ou dose dividida. Em outro aspecto, o substrato de amido tratado é fermentado a etanol.

10 Em um aspecto adicional, um processo de conversão de amido e/ou um processo de fermentação de etanol é fornecido não requerendo a adição de ácido ou álcali para ajuste do pH. Uma modalidade relaciona-se a um ajuste de pH na etapa de liquefação livre, em que o pH de liquefação está na faixa de pH 4,5 a 5,4 e os produtos químicos de neutralização ácida não são adicionados à etapa de processo de liquefação. Em outra modalidade,
15 de, o pH de liquefação está na faixa de pH 4,8 a 5,8 e os produtos químicos de neutralização ácida não são adicionados à etapa de processo de liquefação.

Em outro aspecto, um método de obtenção de um substrato fermentável é fornecido, envolvendo contato de uma pasta fluida de grão moído
20 contendo amido granular com uma enzima de hidrólise de ácido fítico em uma temperatura de 0 a 30°C menor que a temperatura de gelatinização do amido, contato da pasta fluida com uma α -amilase variante, aumento da temperatura acima da temperatura de gelatinização do amido granular para permitir gelatinização do amido, e hidrólise do amido gelatinizado pelo conta-
25 to do amido gelatinizado com a α -amilase por um tempo suficiente para hidrolisar o amido, e obtenção de um substrato fermentável. A enzima de hidrólise de ácido fítico pode ser uma fitase bacteriana ou fúngica. A fitase fúngica pode ser uma fitase de *Aspergillus* ou uma fitase de *Buttiauxella*. Em algumas modalidades, a fitase bacteriana é de *Escherichia coli*.

30 Em outro aspecto, um processo para produção de um açúcar fermentável é fornecido, compreendendo (a) mistura de material moído contendo amido com água e vinhaça diluída, em que a vinhaça diluída está na

faixa de 10 a 70% v/v e obtenção de uma pasta fluida compreendendo amido e tendo conteúdo de sólidos secos (ds) de 20 a 50%, (b) tratamento da pasta fluida com uma fitase antes ou simultaneamente à liquefação do amido, (c) liquefação do amido, (d) adição de uma α -amilase variante ao amido durante a etapa (b) e/ou simultaneamente com a etapa de liquefação, e (e) sacarificação do amido liquefeito para obtenção de açúcares fermentáveis, em que o pH não é ajustado durante nenhuma das etapas (a), (b), (c), (d) ou (e). Em algumas modalidades, o açúcar fermentável é recuperado e purificado ou isomerizado. Em outras modalidades, a fitase é adicionada antes da etapa de liquefação. Em algumas modalidades, a α -amilase é adicionada com a fitase. Ainda em modalidades adicionais, uma segunda dose de α -amilase é adicionada durante a etapa de liquefação.

Em um aspecto adicional, o processo de produção de álcool a partir do material contendo amido, é fornecido, compreendendo liquefação e sacarificação do amido liquefeito como revelado acima para obtenção de açúcares fermentáveis e fermentação adicional dos açúcares fermentáveis sob as condições de fermentação adequadas usando um micro-organismo fermentador para obtenção do álcool. Em algumas modalidades, as etapas de sacarificação e de fermentação são simultâneas. Em algumas modalidades, o álcool é etanol.

Em outro aspecto, construtos de DNA, incluindo vetores de expressão, que codificam α -amilases variantes são fornecidos, junto com métodos de expressão e uso das α -amilases variantes, sozinhas ou em combinação com outras enzimas α -amilolíticas, *por exemplo*, em vários processos industriais, tais como liquefação de amido e limpeza.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A figura 1 mostra um alinhamento das sequências de aminoácidos de várias α -amilases AmyS-relacionadas.

A figura 2 mostra o plasmídeo pHPLT-AmyS.

A figura 3 mostra atividade residual percentual de variantes da biblioteca S242 após estresse térmico a 95°C por 30 minutos. As posições das variantes P, S, W e Y estão faltando e são substituídas por AmyS selva-

gem (SPEZYME® Xtra – rotulado como "Z"). As linhas indicam 2x e 3x acima do desvio padrão da atividade residual percentual da enzima selvagem. S242A e S242Q claramente mostram atividades residuais mais altas que as selvagens.

5 As figuras 4A a 4I mostram alinhamentos aos pares das sequências de aminoácidos mostradas na figura 1.

 A figura 5 mostra as curvas de fusão térmica e os pontos de fusão de amilase selvagem e variantes sem cálcio adicionado.

 A figura 6 mostra as curvas de fusão térmica e os pontos de fusão de amilase selvagem e variantes com cálcio 2 mM.

 A figura 7 mostra o perfil de atividade de SPEZYME® Xtra e duas variantes e relação a Liquozyme SC em três pontos de tempo.

 A figura 8 mostra o perfil de atividade de quatro variantes em relação à variante S242Q em três pontos de tempo.

15 A figura 9 mostra a redução de viscosidade da farinha de milho devido à ação das α -amilases LIQUOZYME® SC ou SPEZYME® Xtra em uma dose de 30 μ g.

 A figura 10 mostra a redução de viscosidade da farinha de milho devido à ação das α -amilases LIQUOZYME® SC ou SPEZYME® Xtra, ou uma das duas variantes (S242A e S242Q) em uma dose de 30 μ g.

 A figura 11 mostra a redução de viscosidade da farinha de milho devido à ação da α -amilase LIQUOZYME® SC ou SPEZYME® Xtra, ou uma das duas variantes (S242A e S242Q) em uma dose de 20 μ g.

 A figura 12 mostra que a progressão de DE do milho completo triturado tratado com LIQUOZYME® SC, SPEZYME® Xtra, ou uma das duas variantes (S242A e S242Q) ao longo do tempo (0, 30, 60 e 90 minutos).

 A figura 13 mostra viscosidade pós-jato de vapor do milho completo triturado tratado com LIQUOZYME® SC, SPEZYME® Xtra, ou uma das duas variantes (S242A e S242Q) ao longo do tempo (0, 30, 60, e 90 minutos).

 A figura 14 mostra que a progressão de DE do milho completo triturado tratado com fitase e uma amilase (SPEZYME® Xtra ou variante

S242Q) ao longo do tempo (0, 30, 60 e 90 minutos). MAXALIQ[®] é uma mistura de fitase/amilase disponível em Genencor, uma Divisão Danisco. Referência é feita ao Exemplo 8.

5 A figura 15 mostra viscosidade pós-jato de vapor do milho completo triturado tratado com fitase e uma amilase (SPEZYME[®] Xtra ou variante S242Q) ao longo do tempo (0, 30, 60, e 90 minutos).

A figura 16 mostra a progressão de DE do milho completo triturado tratado com a variante S242Q e fitase. Referência é feita ao Exemplo 9.

10 A figura 17 mostra viscosidade pós-jato de vapor do milho completo triturado tratado com a variante S242Q e fitase. Referência é feita ao Exemplo 9.

A figura 18 mostra o efeito do tratamento do milho completo triturado com fitase sobre o aumento na termoestabilidade e estabilidade a pH baixo da variante S242Q e referência é feita ao Exemplo 9.

15 A figura 19 mostra o efeito da adição de fitase durante liquefação primária do milho completo triturado sobre a redução da viscosidade no cozimento a vapor e referência é feita ao Exemplo 9.

20 A figura 20 mostra uma comparação do conteúdo de sulfato e ácido fítico em DDGS: 1) a partir de um processo convencional, e 2) a partir do processo sem ajuste de pH. Referência é feita ao Exemplo 10.

A figura 21 é um gráfico mostrando a taxa da progressão de DE e a redução percentual de ácido fítico como IP6.

25 A figura 22 é um gráfico mostrando o efeito da α -amilase variante S242Q na progressão de DE sob as condições de processamento convencionais. Referência é feita ao Exemplo 8.

30 A figura 23 é um gráfico representando o desempenho de S242Q e suas variantes no ensaio de microamostra de amido de arroz como uma função da carga sob as condições de lavagem de roupas norte-americanas. As condições foram TIDE[®] 2x a 20°C. Referência é feita ao Exemplo 16.

A figura 24 é um gráfico representando o desempenho de outra α -amilase (isto é, *Bacillus sp.* truncada) A amilase TS-23 com as mutações

de carga no arroz no ensaio de microamostra de amido de arroz sob as condições de lavagem de roupas da Europa Ocidental. As condições foram PERSIL® a 40°C. Referência é feita ao Exemplo 16.

5 A figura 25 é um gráfico representando o desempenho de S242Q e suas variantes no ensaio de BODIPY-amido como uma função da carga. Referência é feita ao Exemplo 16.

A figura 26 A é um gráfico representando a hidrólise de BODIPY-amido relativa como uma função da expressão de tubo de agitação relativa (*isto é*, hidrólise de BODIPY-amido relativa vs. expressão de tubo de agitação relativa). A figura 26B é um gráfico representando a hidrólise de amido da microamostra relativa como uma função da expressão de tubo de agitação relativa (*isto é*, hidrólise de amido da microamostra relativa vs. expressão de tubo de agitação relativa). Referência é feita ao Exemplo 19.

15 A figura 27A é um gráfico representando a expressão de tubo de agitação relativa como uma função da carga. A figura 27B é um gráfico representando a hidrólise de BODIPY-amido relativa como uma função da carga. Referência é feita ao Exemplo 19.

A figura 28A é um gráfico representando a expressão de tubo de agitação relativa como uma função da carga. A figura 28B é um gráfico representando a atividade de limpeza de microamostra relativa como uma função da carga. Referência é feita ao Exemplo 19.

25 A figura 29 é um gráfico representando a viscosidade final após liquefação de amido de milho usando 1º gráfico de escada AmyS DS 30%, pH 5,8, dose de enzima 30 mg. A viscosidade final variante +6 é tão alta e não pode ser medida (sobrecarga do instrumento). Referência é feita ao Exemplo 16.

30 A figura 30 é um gráfico representando a estabilidade térmica da primeira escala de carga de AmyS como uma função da modificação de carga em relação à selvagem. Experimento realizado usando ensaio de estabilidade térmica de amilase padrão. Referência é feita ao Exemplo 17.

A figura 31A é um gráfico representando a atividade de limpeza de amido de arroz da primeira escala de carga de AmyS como uma função

do pH. pH 3,0 a 4,25 é formato de Na 200 mM + Tween-80 0,01%. pH 4,25 a 5,5 é acetato de Na 200 mM + Tween-80 0,01%. Os dados são próprios a curvas de titulação, cada um com um valor de pKa único. Referência é feita ao Exemplo 21.

5 A figura 31B é um gráfico representando o efeito de mutações de carga no pKa aparente da catálise de AmyS (primeira escala de carga). Referência é feita ao Exemplo 21.

A figura 32A mostra a redução de viscosidade de farinha de milho por variantes de AmyS em comparação com SPEZYME® Xtra.

10 A figura 32B mostra a redução de viscosidade da farinha de milho por AmyS N193Y.

A figura 32C mostra o efeito da adição de fitase sobre a redução de viscosidade por AmyS N193Y.

BREVE DESCRIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS

15 As seguintes sequências de aminoácidos e nucleotídicas são mencionadas neste pedido.

SEQ ID NO: 1 (AmyS selvagem completa)

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANE A NNLSSLGITA LWLP-
 PAYKGT SRSDVG YGVY DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA
 20 AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE VNPSDRNQEI SGTYQI-
 QAWT KFD FPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG IG-
 KAWDWEVD TENGNYDYLM YADLDMDHPE VTELKNW GK WYVNTT-
 NIDG FRLDAVKHIK FSFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NK-
 LHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP
 25 TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WDPWFKPLA YAFILTRQEG
 YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG
 WTREGVTEKP GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKV FY DLTGN-
 RSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSW VPRKTTVSTI ARPITTRPWT GEF-
 VRWTEPR LV AWP

30 SEQ ID NO: 2 (AmyS selvagem truncada; SPEZYME® Xtra)

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANE A NNLSSLGITA LWLP-
 PAYKGT SRSDVG YGVY DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA

AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE VNPSDRNQEI SGTYQI-
 QAWT KDFDPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG IG-
 KAWDWEVD TENGNYDYLM YADLDMDHPE VVTELKNWGK WYVNTT-
 NIDG FRLDAVKHIK FSFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NK-
 5 LHNITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP
 TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WWDWPKPLA YAFILTRQEG
 YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG
 WTREGVTEKP GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVYF DLTGN-
 RSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW VPRKTT

10 SEQ ID NO: 3 (AmyS S242A completa)

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEANLSSLGITA LWLP-
 PAYKGT SRSDVGYGVY DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA
 AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE VNPSDRNQEI SGTYQI-
 QAWT KDFDPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG IG-
 15 KAWDWEVD TENGNYDYLM YADLDMDHPE VVTELKNWGK WYVNTT-
 NIDG FRLDAVKHIK FAFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NK-
 LHNITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP
 TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WWDWPKPLA YAFILTRQEG
 YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG
 20 WTREGVTEKP GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVYF DLTGN-
 RSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW VPRKTTVSTI ARPITTRPWT GEF-
 VRWTEPR LVAWP

SEQ ID NO: 4 (AmyS S242Q completa)

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEANLSSLGITA LWLP-
 25 PAYKGT SRSDVGYGVY DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA
 AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE VNPSDRNQEI SGTYQI-
 QAWT KDFDPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG IG-
 KAWDWEVD TENGNYDYLM YADLDMDHPE VVTELKNWGK WYVNTT-
 NIDG FRLDAVKHIK FQFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NK-
 30 LHNITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP
 TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WWDWPKPLA YAFILTRQEG
 YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG

WTREGVTEKP GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVIFY DLTGN-
 RSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSW VPRKTTVSTI ARPITTRPWT GEF-
 VRWTEPR LVAWP

SEQ ID NO: 5 (AmyS S242E completa)

5 AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANE A NNLSSLGITA LWLP-
 PAYKGT SRSDVGYGVY DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA
 AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE VNPSDRNQEI SGTYQI-
 QAWT KFD FPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG IG-
 KAWDWEVD TENGNYDYL M YADLMDHPE VTELKNWGK WYVNTT-
 10 NIDG FRLDAVKHIK FEFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NK-
 LHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK SGA FDMRTL MTNTLMKDQP
 TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WWD PWFKPLA YAFILTRQEG
 YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG
 WTREGVTEKP GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVIFY DLTGN-
 15 RSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSW VPRKTTVSTI ARPITTRPWT GEF-
 VRWTEPR LVAWP

SEQ ID NO: 6 (Yamane 707)

HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLKSKGITAVWIPPAWK
 GASQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRSQLQAAVTS LKNNGIQV
 20 YGDVVMNHKGGADATEMVR AVEVNPNNRNQEVTGEYTIEAWTRFD FPGR
 GNTHSSFKWRWYHFDGVDWDQSRRLNNRIYKFRGHGKAWDWEVD TENG
 NYDYL MYADIDMDHPEVVNELRNWGWYTN TLGLDGFRIDAVKHIKYSFTR
 DWINHVR SATGKNMFAVAEFWKNDLGAIENYLQKT NWNH SVFDVPLHYNL
 YNASKSGGNYDMRNIFNGTVVQRHPSHAVTFVDNHDSQP EEAL ESFVEE
 25 WFKPLAYALT LTREQGYPSVFYGDYYGIP THGVPAMRSKIDPILEARQKYAY
 GKQNDYLDHHNIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGAGGSKWMFVGRNKA
 GQVWSDITGNRTGTVTINADGWGNFSVNGGSVSIWVNK

SEQ ID NO: 7 (AmyL selvagem; LAT)

ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWKRLQND SAYLA EHGITAVWIPPAYKGT
 30 SQADVGYGAYDLYDLGEFHQKGTVRTKYGTKGELQSAIKSLHSRDIN VYGD
 VVINHKGGADATEDVTAVEVDPADRNRVISGEHLIKAWTHFHFPGRGSTYS
 DFKWHWYHFDGTDWDESRKLNRIYKFQ GKAWDWEVSNENGNYDYL MYA

DIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWWNHVRE
 KTGKEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFNHVSFVDVPLHYQFHAASSTQGG
 GYDMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTQPGQSLESTVQTWFKPLAYAFI
 LTRESGYPQVFYGD MYGTGDSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYGAQHDY
 5 FDHHDIVGWTREGDSSVANSGLAALITDGP GGAKRMYVGRQNAGETWWDI
 TGNRSEPWINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR

SEQ ID NO: 8 (AmyL selvagem; Termamyl)

ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWRLQNDSAYLAEHGITAWWIPPAYKGT
 SQADVGYGAYDLYDLGEFHQKGTVRTKYGTGKELQSAIKSLHSRDINVYGD
 10 VVINHKGGADATEDVTAVEVDPADRNRVISGEHLIKAWTHFHFPGRGSTYS
 DFKWHWHYHFDGTDWDESRKLNRIYKFQGKAWDWEVSNENGN DYLYMYA
 DIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWWNHVRE
 KTGKEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFNHVSFVDVPLHYQFHAASSTQGG
 GYDMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTQPGQSLESTVQTWFKPLAYAFI
 15 LTRESGYPQVFYGD MYGTGDSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYGAQHDY
 FDHHDIVGWTREGDSSVANSGLAALITDGP GGAKRMYVGRQNAGETWWDI
 TGNRSEPWINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR

SEQ ID NO: 9 (amilase de *B. amyloliquefaciens*)

VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWKRLQNDAEHLSDIGITAWWIPPAYKGLSQS
 20 DNGYGPYDLYDLGEFQQKGTVRTKYGTKSELQDAIGSLHSRNVQVYGDVW
 LNHKAGADATEDVTAVEVN PANRNQETSEEYQIKAWTDFRFPGRGNTYSD
 FKWHWHYHFDGADWDESRKISRIFKFRGEGKAWDWEVSSENGNYDYLYMYA
 DVDYDHPDVVAETKKWGIWYANELSLDGFRIDA AKHIKFSFLRDWWQAVR
 QATGKEMFTVAEYWQNNAGKLENYLNKTSFNQSVFVDVPLHFNLQAASSQ
 25 GGGYDMRRLLDGTVVSRHPEKAVTFVENHDTQPGQSLESTVQTWFKPLA
 YAFILTRESGYPQVFYGD MYGTGKTSPKEIPSLKDNIEPILKARKEYAYGPQ
 HDYIDHPDVIGWTREGDSSAAKSGLAALITDGP GGSKRMYAGLKNAGETW
 YDITGNRSDTVKIGSDGWGEFHVNDGSVSIYVQK

SEQ ID NO: 10 (STAINZYME™)

30 HHNGTNGTMM QYFEWYLPND GNHWNRLRSD ASNLKDKGIS AWWIP-
 PAWKG ASQNDVGYGA YDLYDLGEFN QKGTIRTKYG TRNQLQA AVN
 ALKSNGIQVY GDVVMNHKGG ADATEMVRV EVNPNNRNQE VSGEYTI-

EAW TKFDFPGRGN THSNFKWRWY HFDGVDWDQS RKLNNRIYKF
 RGDGKGWDWE VDTENGNYDY LMYADIDMDH PEVVNELRNW
 GWYTNLGL DGFRIDAVKH IKYSFTRDWI NHVRSATGKN MFAVA-
 EFWKN DLGAIENYLN KTNWNHVSFD VPLHYNLYNA SKSGGNYDMR
 5 QIFNGTVVQR HPMHAVTFVD NHDSQPEEAL ESFVEEWFKP LAYALTL-
 TRE QGYPSVFYGD YYGIPTHGVP AMKSKIDPIL EARQKYAYGR QNDYL-
 DHNI IGWTREGNTA HPNSGLATIM SDGAGGNKWM FVGRNKAGQV
 WTDITGNRAG TVTINADGWG NFSVNGGSVS IWWNK

SEQ ID NO: 11 (NATALASE™)

10 HHNGTNGTMMQYFEWHL PNDGNHWNRLRDDASNLNRGITA WIPPAWK
 GTSQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRS QLESIAHALKNNGVQV
 YGDVVMNHKGGADATENVLAVEVNPNNRNQEISGDYTIEAWTKFDFPGRG
 NTYSDFKWRWYHFDGVDWDQSRQFQNRIYKFRGDGKAWDWEVDSNG
 NYDYLMYADVDMDHPEVVNELRRWGEWYTNLNL DGFRIDAVKHIKYSFT
 15 RDWLTHVRNATGKEMFAVAEFWKNDLGALENYLNKTNWNHVSFDVPLHY
 NLYNASNSGGNYDMAKLLNGTVVQKHPMHAVTFVDNHDSQPGESESVF
 QEWFKPLAYALILTREQGYPSVFYGDYYGIPTHSVPAMKAKIDPILEARQNF
 AYGQTQHDYFDHHNIIGWTREGNTTHPNSGLATIMSDGPGGEKWMYVGQN
 KAGQWWHDITGNKPGTVTINADGWANFSVNGGSVSIWVKR

20 SEQ ID NO: 12 (KAO KSM 1378)

HHNGTNGTMMQYFEWHL PNDGNHWNRLRDDAANLKSKGITAWWIPPAWK
 GTSQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRS QLQGAVTSLKNNGIQV
 YGDVVMNHKGGADGTEMVNAVEVNRSNRNQEISGEYTIEAWTKFDFPGR
 GNTHSNFKWRWYHFDGTDWDQSRQLQNKIYKFRGTGKAWDWEVDIENG
 25 NYDYLMYADIDMDHPEVINELRNWGWYTNLNL DGFRIDAVKHIKYSYTR
 DWLTHVRNTTGKPMFAVAEFWKNDLAAIENYLNKTSWNHVSFDVPLHYNL
 YNASNSGGYFDMRNILNGSVVQKHPIHAVTFVDNHDSQPGEALESFVQSW
 FKPLAYALILTREQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPSMKSKIDPLLQARQTYAYG
 TQHDYFDHHDIIIGWTREGDSSH PNSGLATIMSDGPGGNKWMYVGKHKAG
 30 QWWRDITGNRSGTVTINADGWGNFTVNGGAVSVWVKQ

SEQ ID NO: 13 (KAO KSM K38)

DGLNGTMMQYYEWHLENDGQHWNRLHDDAAALSDAGITAIWIPPAYKGN

SQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQLERAIGSLKSNDINVYGD
 VVMNHKMGADFTAVQAVQVNPTNRWQDISGAYTIDAWTGFDGFSGRNNA
 YSDFKWRWFHFNGVDWDQRYQENHIFRFANTNWNWRVDEENGNYDYLL
 GSNIDFSHPEVQDELKDWGSWFTDELDDGYRLDAIKHIPFWYTSDWVRH
 5 QRNEADQDLFWVGEYWKDDVGALEFYLDENMWEMSLFDVPLNYNFYRAS
 QQGGSYDMRNILRGSLVEAHPMAVTFVDNHDTQPGESLESWWADWFKP
 LAYATILTREGGYPNVFGDYDGIPNDNISAKKDMIDELLDARQNYAYGTQH
 DYFDHWDVVGWWTREGSSSRPNGLATIMSNGPGGSKWMYVGRQNAGQT
 WTDLTGNNGASVTINGDGWGEFFTNNGGSVSVYVNQ

10 SEQ ID NO: 14 (KAO KSM K36)

DGLNGTMMQYYEWHLENDGQHWNRHLHDDAEALSNAGITAIWIPPAYKGN
 SQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQLERAIGSLKSNDINVYGD
 VVMNHKLKMGADFTAVQAVQVNPSNRWQDISGVYTIDAWTGFDGFPGRNNA
 YSDFKWRWFHFNGVDWDQRYQENHLFRFANTNWNWRVDEENGNYDYLL
 15 GSNIDFSHPEVQEELKDWGSWFTDELDDGYRLDAIKHIPFWYTSDWVRH
 QRSEADQDLFWVGEYWKDDVGALEFYLDENMWEMSLFDVPLNYNFYRAS
 KQGGSYDMRNILRGSLVEAHPMAVTFVDNHDTQPGESLESWWADWFKPL
 AYATILTREGGYPNVFGDYDGIPNDNISAKKDMIDELLDARQNYAYGTQHD
 YFDHWDIVGWWTREGTSSSRPNGLATIMSNGPGGSKWMYVGQQHAGQTW
 20 TDLTGNHAASVTINGDGWGEFFTNNGGSVSVYVNQ

SEQ ID NO: 15 (LIQUIZYME® SC)

AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT
 SRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVYA
 DVVFDHKGGADGTEWVDAVEVNPSPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
 25 TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGKAWDWEVDTEFGNYDYL
 MYADLDMDHPEVVTELKNWGKWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWLS
 YVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTASK
 SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTQPGQALQSWVDPWFKPL
 AYAFILTRQEGYPCVFGDYDGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQHDY
 30 LDHSDIIGWWTREGGTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHAGKVFYDL
 TGNRSDTVTINSBGWGEFKVNGGSVSVWWPRKTTVS

SEQ ID NO: 16 (Etil SPEZYME®)

- AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT
 SRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKAYLQAIQAAHAAGMQVYA
 DVVFDHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
 TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFIGKAWDWEVDTENGNYDYLM
 5 YADLDMDHPEVTELKNWGKWYVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWLSY
 VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTASKS
 GGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWWDPWFKPLA
 YAFILTRQEGYPCVIFYGDYYGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQHDYL
 DHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHAGKVFYDLT
 10 GNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVWVPRKTT
SEQ ID NO: 17 (iniciador S242 F)
 5'-[Fos]GTCAAGCATATTAAGTTCNNSTTTTTTCCTGATTGGTTG-3'
SEQ ID NO: 18 (iniciador S242 R)
 5'-[Fos]CAACCAATCAGGAAAAAASNNGAACTTAATATGCTTGAC-3'
 15 SEQ ID NO: 19 (fitase BP17)
 NDTPASGYQV EKVILSRHG VRAPTKMTQT MRDVTPTNPWP EWPVKLG-
 YIT PRGEHLISLM GGFYRQKFQQ QGILSQGSCP TPNSIYVWAD VDQR-
 TLKTGE AFLAGLAPQC GLTIHHQQNL EKADPLFHPV KAGTCSMDKT
 QVQQAVEKEA QTPIDNLNQH YIPFLALMNT TLNFSTSAWC QKH-
 20 SADKSCD LGLSMPSKLS IKDNGNKVAL DGAIGLSSTL AEIFLLEYAQ
 GMPQAAWGN I HSEQEWASLL KLHNVQFDLM ARTPYIARHN GTPLL-
 QAISN ALNPNATESK LPDISPDNKI LFIAGHDTNI ANIAGMLNMR W-
 TLPGQPDNT PPGGALVFER LADKSGKQYV SVSMVYQTL QLRSTPLSL
 NQPAGSVQLK IPGCNDQTAE GYCPLSTFTR VVSQSVEPGC QLQ
 25 SEQ ID NO: 20 (sequência de codificação do peptídeo sinal de LAT)
 atgaaacaac aaaaacggct ttacgccga ttgctgacgc tgtatttgc gctcatcttc ttgctgcctc
 attctgcagc ttcagca
SEQ ID NO: 21 (peptídeo sinal de LAT)
 MKQQKRLYAR LLTLLFALIF LLPHSAASA
 30 SEQ ID NO: 22 (AmyS S242Q truncada)
 AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANE ANNLSL GITA LWLP-
 PAYKGT SRSDVGYGVY DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAYLQAIQA

AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE VNPSDRNQEI SGTYQI-
 QAWT KDFDPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG IG-
 KAWDWEVD TENGNIDYLM YADLDMDHPE VVTELKNWVGK WYVNTT-
 NIDG FRLDAVKHIK FQFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NK-
 5 LHNITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK SGGAFFDMRTL MTNTLMKDQP
 TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WWDWPKPLA YAFILTRQEG
 YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG
 WTREGVTEKP GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVFY DLTGN-
 RSDTV TINSBGWGEF KVNGGSVSVW VPRKTT

10 SEQ ID NO: 23 (sequência de codificação da AmyS madura)

gccgcaccgt ttaacggtac catgatgcag tttttgaat ggtacttgcc ggatgatggc acgttatgga
 ccaaagtggc caatgaagcc aacaacttat ccagccttgg catcaccgct ctttggtcgc
 cgcccgttta caaaggaaca agccgcagcg acgtagggtta cggagtatac gacttgtatg
 acctcggcga attcaatcaa aaagggaccg tccgcacaaa atatggaaca aaagctcaat atctt-
 15 caagc cattcaagcc gccacgccc ctggaatgca agtgtacgcc gatgtcgtgt tcgaccataa
 aggcggcgct gacggcacgg aatgggtgga cgccgtcgaa gtcaatccgt ccgaccgcaa cca-
 agaaatc tcgggcacct atcaaataca agcatggacg aaatttgatt ttccggggcg gggcaa-
 cacc tactccagct ttaagtggcg ctggtacat tttgacggcg ttgactggga cgaaagccga aa-
 attaagcc gcatttaca attccgcggc atcggaag cgtgggattg ggaagtagac acggaa-
 20 aacg gaaactatga ctacttaatg tatgccgacc ttgatatgga tcatcccgaa gtcgtgaccg
 agctgaaaaa ctgggggaaa tggatgtca acacaacgaa cattgatggg ttccggcttg
 atgccgtcaa gcatattaag ttcatgttt ttctgattg gttgtcgtat gtgcgttctc agactggcaa
 gccgctattt accgtcgggg aatattggag ctatgacatc aacaagttgc acaattacat tacgaaa-
 aca aacggaacga tgtcttgg ttgatccccg ttacacaaca aattttatac cgcttccaaa
 25 tcagggggcg catttgatat gcgcacgtta atgaccaata ctctcatgaa agatcaaccg a-
 cattggccg tcaccttctg tgataatcat gacaccgaac ccggccaagc gctgcagtca tgggtc-
 gacc catggttcaa accgttggct tacgccttta ttctaactcg gcaggaagga taccgtgcg tctt-
 tatgg tgactattat ggcatccac aatataacat tcttctgctg aaaagcaaaa tcgatccgct cct-
 catcgcg cgcagggatt atgcttacgg aacgcaacat gattatcttg atcactccga catcatcggg
 30 tggacaaggg aaggggtcac tgaaaaacca ggatccgggc tggccgcact gatcaccgat
 gggccgggag gaagcaaatg gatgtacgtt ggcaacaac acgctggaaa agtgttctat gacct-
 taccg gcaaccggag tgacaccgtc accatcaaca gtgatggatg gggggaattc aaagtcaatg

gcgggttcggt ttcggtttgg gttcctagaa aaacgaccgt ttctaccatc gtcgggccga tcaca-
acccg accgtggact ggtgaattcg tccgttgac cgaaccacgg ttggtggcat ggcct

SEQ ID NO:24 (Satori F)

5'-CTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGCAGCTTC-3'

5 SEQ ID NO:25 (Satori R)

5'-TTATCCTTTACCTTGTCTCCAAGC-3'

DESCRIÇÃO DETALHADA

I. Introdução

A presente composição e métodos relacionam-se a variantes de
10 uma α -amilase parental que exibem uma alteração em pelo menos uma das
seguintes propriedades em relação à dita α -amilase parental: atividade es-
pecífica, especificidade por substrato, ligação de substrato, clivagem de
substrato, estabilidade térmica, atividade dependente de pH, estabilidade
dependente de pH, estabilidade oxidativa, dependência de Ca^{2+} , pI e de-
15 sempenho de lavagem. As variantes são adequadas para conversão de a-
mido, produção de etanol, lavagem de roupas, lavagem de louças, limpeza
de superfície dura, e outros usos industriais.

Embora numerosas mutações sejam descritas, elas têm em co-
mum a capacidade de melhorar o desempenho de α -amilases parentais que
20 compartilham atributos estruturais em termos da identidade de sequência de
aminoácidos e estrutura tridimensional. Foi encontrado que várias destas
mutações são combináveis com outras mutações, que as tornam de valor
particular no desenho de α -amilases variantes com propriedades pré-
selecionadas. Também são descritas posições que não são acessíveis à
25 mutação, em geral, ou não acessíveis à mutação e combinação com outras
mutações. A identificação destas posições é também importante no desenho
de α -amilases variantes com propriedades pré-selecionadas.

Embora estudos realizados em suporte às presentes composi-
ções e métodos fossem realizados principalmente usando uma α -amilase
30 parental particular de *Geobacillus stearothermophilus*, α -amilases estrutu-
ralmente relacionadas são suscetíveis a se beneficiar de mutações equiva-
lentes. Consequentemente, a presente descrição fornece um roteiro para

modificar qualquer de uma grande quantidade de α -amilases para produzir modificações benéficas em características de desempenho e para identificação de novas α -amilases provavelmente tendo característica de desempenho desejável com base na presença de certos resíduos de aminoácidos em posições especificadas.

Estes e outros aspectos e modalidades das composições e métodos são descritos em mais detalhes, abaixo.

II. Definições e nomenclatura

Antes da descrição das presentes composições e métodos mais detalhes, terminologia, nomenclatura e princípios gerais variados são apresentados abaixo.

A. Definições

Os seguintes termos e frases são definidos para clareza. A termos e frases que não são definidos devem ser dados o seu significado usual como usado na técnica. Referência é feita a referências padrão de biologia molecular, tais como Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2nd Ed., 1989); Kreigler, GENE TRANSFER AND EXPRESSION; A LABORATORY MANUAL (1990); Ausubel *et al.* (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (1994); Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 2nd ED., John Wiley and Sons, New York (1994); e Hale and Markham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY, Harper Perennial, NY (1991).

Como usado neste pedido, o termo "amido" refere-se a qualquer material compreendido dos carboidratos polissacarídicos complexos de plantas, compreendidos de amilose e amilopectina com a fórmula $(C_6H_{10}O_5)_x$, em que X pode ser qualquer número. Fontes exemplares de amido incluem, mas não são limitadas a grãos, gramíneas, tubérculos e raízes, e mais especificamente trigo, cevada, milho, centeio, arroz, sorgo, farelos de trigo, mandioca, painço, batata, batata doce e tapioca.

Como usado neste pedido, o termo "alfa (α)-amilase" refere-se a enzimas que catalisam a hidrólise de ligações α -1,4 glicosídicas, *por exemplo*, E.C. classe 3.2.1.1. Estas enzimas também foram descritas como afe-

tando a exo ou endohidrólise de ligações 1,4- α -D-glicosídicas em polissacarídeos contendo unidades D-glicose 1,4- α ligadas. Outro termo usado para descrever estas enzimas é "glicogenases". Enzimas exemplares incluem α -1,4-glican 4-glicanohidrase glicanohidrolase.

5 Como usado neste pedido, o termo "recombinante", quando usado em referência a uma célula, ácido nucleico, proteína ou vetor, indica que a célula, ácido nucleico, proteína ou vetor, foram modificados pela introdução de um ácido nucleico ou proteína heterólogos ou alteração de um ácido nucleico ou proteína nativos, ou que a célula é derivada de uma célula
10 assim modificada. Dessa forma, por exemplo, células recombinantes expressam genes que não são encontrados na forma nativa (não recombinante) da célula ou expressam genes nativos que são de outra maneira anormalmente expressos, subexpressos ou não expressos de modo algum.

 Como usado neste pedido, os termos "proteína" e "polipeptídeo"
15 são usados intercambiavelmente para referir-se a uma cadeia contígua de resíduos de aminoácidos ligados por ligações peptídicas. O código de uma letra ou de três letras convencional para resíduos de aminoácidos é usado.

 Como usado neste pedido, "uma sequência sinal" refere-se a uma sequência de resíduos de aminoácidos no N-terminal de um polipeptídeo, que facilita a secreção de um polipeptídeo extracelular para fora da célula. A forma madura da proteína extracelular perde a sequência sinal, que é clivada durante o processo de secreção.
20

 Como usado neste pedido, um "gene" refere-se a um segmento de DNA que está envolvido na produção de um polipeptídeo e inclui regiões
25 precedentes e regiões seguintes de codificação bem como sequências intervenientes (introns) entre segmentos de codificação individuais (éxons). O nome de um gene é geralmente escrito em itálico, enquanto o nome de uma proteína correspondente é geralmente não escrito em itálico e a primeira letra é maiúscula.

30 Como usados neste pedido, os termos "ácido nucleico" e "polinucleotídeo" são usados intercambiavelmente para referir-se a uma cadeia contígua de nucleosídeos ligada por ligações fosfodiéster ou similares, e en-

globam DNA, RNA, se fita simples, fita dupla ou parcialmente fita dupla, bem como DNA ou RNA quimicamente modificado ou derivados sintéticos dos mesmos. A menos que de outra maneira especificada, as sequências de ácidos nucleicos estão presentes na direção 5' a 3'. O versado apreciará que, porque o código genético é degenerado, mais de um códon pode codificar um aminoácido particular.

Como usado neste pedido, um "vetor" refere-se a uma sequência polinucleotídica projetada para introduzir ácidos nucleicos em um ou mais tipos celulares. Vetores incluem vetores de clonagem, vetores de expressão, vetores ponte, plasmídeos, partículas de fago, cassetes e similares.

Como usado neste pedido, um "vetor de expressão" refere-se a um construto de DNA compreendendo uma sequência de DNA que é operacionalmente ligada a uma sequência controle adequada capaz de efetuar expressão do DNA em um hospedeiro adequado. Tais sequências controle podem incluir um promotor para efetuar a transcrição, uma sequência operadora opcional para controlar a transcrição, uma sequência adequada que codifica sítios de ligação a ribossomo no mRNA, potencializadores e sequências que controlam a terminação de transcrição e tradução.

Como usado neste pedido, um "promotor" é uma sequência regulatória que está envolvida na ligação da RNA polimerase para iniciar a transcrição de um gene. Um promotor pode ser um promotor induzível ou um promotor constitutivo. Um promotor exemplar está no gene *cbh1* de *Trichoderma reesei*, que é um promotor induzível.

Como usado neste pedido, o termo "sob controle transcricional" indica que a transcrição de um polinucleotídeo especificado, normalmente uma sequência de DNA, depende de estar operacionalmente ligada a um promotor especificado e/ou outro elemento(s), que regula sua transcrição.

Como usado neste pedido, o termo "sob controle traducional" indica que a tradução de um polinucleotídeo especificado, normalmente uma sequência de mRNA, depende dela estar operacionalmente ligada a um elemento(s) especificado, que regule sua tradução.

Como usado neste pedido, o termo "derivado" engloba os ter-

mos "originados de", "obtido de", "obtenível de" e "isolado a partir de" e é usado para indicar que um polipeptídeo, polinucleotídeo, vetor de expressão, célula hospedeira especificada, ou similares, é uma variante modificada de um polipeptídeo, polinucleotídeo, vetor de expressão, célula hospedeira pa-
 5 rental ou similares.

Como usado neste pedido, "operacionalmente ligados" significa que os componentes descritos estão em uma relação que os permite funcionar em sua forma pretendida. Por exemplo, uma sequência regulatória pode estar "operacionalmente ligada" a uma sequência de codificação de tal modo
 10 que a expressão da sequência de codificação seja alcançada sob condições compatíveis com a sequência regulatória.

O termo "marcador seletivo/selecionável" refere-se a um gene capaz de ser expresso em uma célula hospedeira que permite facilidade de seleção daquelas células hospedeiras usando um componente de meio ou
 15 condição de crescimento. Exemplos de marcadores selecionáveis incluem, mas não são limitados ao gene que confere resistência antibiótica/antimicrobiana (*por exemplo*, higromicina, bleomicina ou cloranfenicol) e/ou genes que conferem uma vantagem metabólica ou nutritiva.

Como usado neste pedido, um polinucleotídeo ou polipeptídeo
 20 tem certa "percentual/porcentagem de identidade de sequência" (*por exemplo*, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99%) com outra sequência quando a porcentagem especificada de bases ou resíduos de aminoácidos é a mesma após o alinhamento das sequências. Alinhamento e homologia ou identidade percentual podem ser determinados
 25 usando qualquer programa adequado conhecido na técnica, por exemplo, aqueles descritos em CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel *et al.* (eds) (1987) Supplement 30, section 7.7.18). Programas preferenciais incluem os programas Vector NTI Advance[®] 9.0 (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA), GCG Pileup, FASTA (Pearson *et al.* (1988) *Proc. Natl. Acad.*
 30 *Sci USA* 85:2444-2448), e BLAST (BLAST Manual, Altschul *et al.*, Natl Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, Md., e Altschul *et al.* (1997) *NAR* 25:3389-3402). Outro programa de alinhamento preferencial é

ALIGN plus (Scientific and Educational Software, PA), preferencialmente usando parâmetros pré-configurados. Outro programa de sequência que encontra uso é o Programa de Busca de Dados TFASTA disponível no Sequence Software Package Version 6.0 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI).

Como usado neste pedido, uma "linhagem hospedeira" ou "célula hospedeira" refere-se a um organismo adequado para introdução de um vetor de expressão ou construto de DNA compreendendo um polinucleotídeo que codifica um polipeptídeo objeto. Células hospedeiras são preferencialmente células bacterianas ou fúngicas, mas também podem ser células vegetais (*por exemplo*, protoplastos), células de inseto ou células mamíferas.

Como usado neste pedido, o termo "cultura" refere-se ao crescimento de uma população de células microbianas sob as condições adequadas em meio líquido ou sólido. Cultura inclui bioconversão fermentativa de um substrato de amido contendo amido granular a um produto final (tipicamente em um recipiente ou reator).

Como usado neste pedido, o termo "fermentação" refere-se ao esgotamento enzimático e substancialmente anaeróbico de substâncias orgânicas por micro-organismos para produção de compostos orgânicos mais simples. Embora a fermentação geralmente ocorra sob condições anaeróbicas, não é pretendido que o termo seja limitado somente a condições anaeróbicas estritas, já que fermentação também ocorre na presença de oxigênio.

Como usado neste pedido, o termo "contato", com referência a uma enzima e seu substrato, refere-se ao colocar a enzima em proximidade suficiente ao substrato para permitir à enzima converter o substrato em um produto final (*isto é*, agir sobre substrato). Contato pode ser provocado pela mistura de soluções ou suspensões de enzimas e substratos.

Como usado neste pedido, o termo "conversão enzimática" geralmente se refere à modificação de um substrato pela ação enzimática, por exemplo, a modificação de um substrato de amido pela ação de uma amilase, glicoamilase ou outra enzima.

Como usado neste pedido, o termo "sacarificação" refere-se à conversão enzimática de amido à glicose.

Como usado neste pedido, o termo "gelatinização" refere-se à solubilização de amido (*por exemplo*, amido bruto ou cristalino) pelo cozi-
5 mento para formar uma suspensão viscosa.

Como usado neste pedido, o termo "liquefação" refere-se ao estágio na conversão de amido no qual o amido gelatinizado é hidrolisado a dextrinas solúveis de menor peso molecular.

Como usado neste pedido, o termo "grau da polimerização (DP)"
10 refere-se ao número (n) de unidades anidroglicopirranose em um dado sacarídeo. Exemplos de sacarídeos DP1 são monossacarídeos, tais como glicose e frutose. Exemplos de sacarídeos DP2 são dissacarídeos, tais como maltose e sacarose. Um sacarídeo DP > 3 tem um grau da polimerização maior que 3.

15 Como usado neste pedido, os termos "produto final" ou "produto final desejado" referem-se a uma molécula que é enzimaticamente derivada de um substrato, tal como amido.

Como usado neste pedido, o termo "conteúdo de sólidos secos (ds)" refere-se aos sólidos totais de uma pasta fluida expressa em termos de
20 % em uma base de peso seco (% p/p).

Como usado neste pedido, o termo "pasta fluida" refere-se a uma mistura aquosa contendo sólidos insolúveis.

Como usado neste pedido, o termo "amido residual" refere-se ao amido remanescente (solúvel ou insolúvel) em uma composição de amido
25 após fermentação.

Como usado neste pedido, uma "etapa de reciclagem" refere-se à reciclagem de componentes da massa, que podem incluir amido residual, enzimas, e/ou micro-organismos para afetar ou participar na fermentação de composições de amido adicionais.

30 Como usado neste pedido, o termo "massa" refere-se a uma mistura de moléculas fermentáveis de carbono (*por exemplo*, carboidratos) em água, que podem ser usadas para produzir um produto fermentado, tal

como um álcool. Os termos "cerveja" e "massa" podem ser usados intercambiavelmente.

Como usado neste pedido, o termo "vinhaça" refere-se a uma mistura de sólidos não fermentados e água, que é o resíduo após remoção do álcool de uma massa fermentada.

Como usado neste pedido, os termos "grãos secos de destilaria (DDG)" e "grãos secos de destilaria solúveis (DDGS)" referem-se a um subproduto útil da fermentação de grão.

Como usado neste pedido, "um micro-organismo etanologênico" refere-se a um micro-organismo capaz de converter um açúcar ou oligossacarídeo em etanol. Micro-organismos etanologênicos são genericamente etanologênicos em virtude de sua capacidade de expressar uma ou mais enzimas que convertem individualmente ou em conjunto o açúcar em etanol.

Como usado neste pedido, o termo "produtor de etanol" ou "micro-organismo produtor de etanol" refere-se a qualquer organismo ou célula que seja capaz de produzir etanol a partir de uma hexose ou pentose. Geralmente, células produtoras de etanol contêm uma álcool desidrogenase e uma piruvato decarboxilase. Exemplos de micro-organismos produtores de etanol incluem micro-organismos fúngicos, tais como levedura. Levedura preferencial inclui linhagens de *Sacchromyces*, particularmente, *S. cerevisiae*.

Como usado neste pedido, o termo "heterólogo", com referência a um polinucleotídeo ou polipeptídeo, refere-se a um polinucleotídeo ou polipeptídeo que não ocorre naturalmente em uma célula hospedeira. A proteína pode ser um polipeptídeo industrial comercialmente importante, tal como uma enzima. É pretendido que o termo englobe polinucleotídeos e polipeptídeos que são (ou são codificados por) genes que ocorrem naturalmente, genes mutados e/ou genes sintéticos.

Como usado neste pedido, o termo "endógeno", com referência a um polinucleotídeo ou polipeptídeo, refere-se a um polinucleotídeo ou polipeptídeo que ocorre naturalmente na célula hospedeira.

Como usado neste pedido, os termos "recuperado", "isolado" e

"separado" referem-se a um composto, proteína, célula, ácido nucleico ou aminoácido que é removido de pelo menos um componente com o qual está associado naturalmente.

5 Como usado neste pedido, os termos "transformado", "estavelmente transformado" e "transgênico", usados em referência a uma célula, significam que a célula inclui uma sequência de ácido nucleico não natural (*por exemplo*, heteróloga) integrada em seu genoma ou transportada como um plasmídeo episomal que é mantido por múltiplas gerações.

10 Como usado neste pedido, o termo "expressão" refere-se ao processo pelo qual um polipeptídeo é produzido com base na sequência nucleotídica de um gene. O processo inclui tanto transcrição como tradução.

Como usado neste pedido, o termo "introduzido", no contexto de inserção de uma sequência de ácido nucleico em uma célula, refere-se "transfecção", "transformação" ou "transdução", e inclui referência à incorporação de uma sequência de ácido nucleico em uma célula eucariótica ou procariótica em que a sequência de ácido nucleico pode ser incorporada no genoma da célula (*por exemplo*, cromossomo, plasmídeo, plastídeo ou DNA mitocondrial), convertida em um replicon autônomo, ou transitoriamente expressa (*por exemplo*, mRNA transfectado).

20 Como usado neste pedido, o termo "atividade específica" refere-se ao número de mols do substrato que podem ser convertidos no produto por uma enzima ou preparação enzimática por unidade de tempo sob condições específicas. Atividade específica é geralmente expressa como unidades (U)/mg de proteína.

25 Como usado neste pedido, o termo "rendimento" refere-se à quantidade de produto final produzido usando um método especificado e reagentes especificados (incluindo enzimas). A quantidade do produto final pode ser expressa em termos de massa, volume, concentração ou similares, e pode incluir uma referência à quantidade do material inicial (*por exemplo*, substrato), tempo ou outras condições.

30 Como usado neste pedido, o termo "índice de desempenho (PI)" refere-se à razão de desempenho de uma enzima variante para a enzima de

referência ou parental. Dentro deste contexto, vários termos e frases adicionais são usados para caracterizar o desempenho das variantes: "mutações para cima" têm um $PI > 1$; mutações neutras têm um $PI > 0,5$; as mutações não deletérias têm um $PI > 0,05$; mutações deletérias têm um $PI = 0,05$; mutações combináveis têm um $PI = 0,5$ para pelo menos uma propriedade, e $> 0,05$ para todas as propriedades.

Como usado neste pedido, "mutações combináveis" são mutações que podem ser combinadas para entregar proteínas com índices de desempenho (PI) pré-selecionados para uma ou mais propriedades desejadas (ver acima).

Como usado neste pedido, "ATCC" refere-se à American Type Culture Collection localizado em Manassas, VA, EUA.

Como usado neste pedido, "NRRL" refere-se ao Agricultural Research Service Culture Collection, National Center for Agricultural Utilization Research (anteriormente conhecido como USDA Northern Regional Research Laboratory) em Peoria, Illinois, EUA.

Em geral, faixas numéricas são inclusivas dos números que definem a faixa. Os artigos singulares "a", "o", "um" e "uma" incluem referentes plurais, a menos que o contexto claramente dite de outra maneira. Os títulos são fornecidos para facilitar a leitura e não devem ser interpretados como delimitando o objeto descrito a uma porção do relatório descritivo. Todas as patentes e publicações, incluindo todas as sequências reveladas dentro de tais patentes e publicações, são expressamente incorporadas por referência.

B. Nomenclatura

Os códigos convencionais de uma letra e de três letras de resíduos de aminoácidos são usados a menos que de outra maneira especificado. Polipeptídeos variantes são descritos usando a seguinte nomenclatura: aminoácido(s) original: posição(ões): aminoácido(s) substituído.

De acordo com esta nomenclatura, por exemplo, a substituição de serina por uma alanina na posição 242 é mostrada como:

Ser242Ala ou S242A

Uma deleção de alanina na posição 30 é mostrada como:

Ala30* ou A30* ou ΔA30

E uma inserção de um resíduo de aminoácido adicional, tal como lisina, é mostrada como:

Ala30AlaLys ou A30AK

- 5 Uma deleção de um trecho consecutivo de resíduos de aminoácidos, tais como resíduos de aminoácidos 30 a 33, é indicada como (30 a 33)* ou Δ(A30-N33).

Onde um polipeptídeo contém "uma deleção" em comparação com outros polipeptídeos (ou um polipeptídeo parental) e uma inserção é feita nesta posição é indicado como:

*36Asp ou *36D, onde o exemplo representa para a inserção de um ácido aspártico na posição 36.

Múltiplas mutações são separadas por mais sinais. Por exemplo, mutações nas posições 30 e 34, substituindo alanina e ácido glutâmico por asparagina e serina, respectivamente, são representadas por:

Ala30Asp+Glu34Ser ou A30N+E34S

Quando um ou mais resíduos de aminoácidos alternativos podem ser inseridos em uma dada posição é indicado como

A30N,E ou A30N ou A30E

- 20 Além disso, quando uma posição adequada para modificação é identificada sem qualquer modificação específica ser sugerida, deve ser entendido que qualquer resíduo de aminoácido pode ser substituído pelo resíduo de aminoácido presente na posição. Por exemplo, quando uma modificação de uma alanina na posição 30 é mencionada, mas não especificada, deve ser entendido que a alanina pode ser deletada ou substituída por qualquer outro aminoácido, isto é, qualquer um de:

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

Além disso, "A30X" significa qualquer das seguintes substituições:

- 30 A30R, A30N, A30D, A30C, A30Q, A30E, A30G, A30H, A30I, A30L, A30K, A30M, A30F, A30P, A30S, A30T, A30W, A30Y, ou A30 V; que também podem ser apresentadas como: A30R, N, D, C, Q, E, G, H, I, L, K,

M, F, P, S, T, W, Y, V.

Se a enzima parental usada para a numeração já tiver o resíduo de aminoácido em questão sugerido para substituição naquela posição, a seguinte nomenclatura é usada:

- 5 "X30N" ou "X30N,V" no caso onde, por exemplo, ou um N ou V está presente no selvagem.

Dessa forma, significa que outras enzimas parentais correspondentes são substituídas por um "Asn" ou "Val" na posição 30.

C. Características dos resíduos de aminoácidos

- 10 A seguinte informação geral característica de resíduos de aminoácidos é fornecida para referência.

Aminoácidos carregados:

Asp, Glu, Arg, Lys, His

- 15 Aminoácidos negativamente carregados (com o resíduo mais negativo primeiro):

Asp, Glu

Aminoácidos positivamente carregados (com o resíduo mais positivo primeiro):

Arg, Lys, His

- 20 Aminoácidos neutros:

Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Met, Cys, Asn, Gln, Ser, Thr, Pro

Resíduos de aminoácido hidrofóbicos (com o resíduo mais hidrofóbico listado por último):

- 25 Gly, Ala, Val, Pro, Met, Leu, Ile, Tyr, Phe, Trp,

Aminoácidos hidrofílicos (com o resíduo mais hidrofílico listado por último):

Thr, Ser, Cys, Gln, Asn

III. α -amilases para uso nas presentes composições e métodos

- 30 Os seguintes parágrafos descrevem α -amilases "similares a Spezyme[®] Xtra" ou "similares a AmyS" que podem ser modificadas e usadas de acordo com o descrito neste pedido.

A. Homologia entre α -amilases

Experimentos realizados em suporte às presentes composições e métodos foram realizados usando α -amilase de *Geobacillus* (anteriormente *Bacillus*) *stearothermophilus* (isto é, AmyS), exemplificados pela SEQ ID NO:

- 5 2. Uma variante desta amilase está comercialmente disponível como SPEZYME® Xtra (Danisco US Inc, Genencor Division, Palo Alto, CA, EUA).

Diversas α -amilases produzidas por *Bacillus* spp. são altamente homólogas (idênticas) no nível de aminoácido a AmyS, e é esperado que muitas das mutações descritas neste pedido produzam efeitos similares quando feitas nestas amilases, que são coletivamente referidas como α -amilases "similares a Spezyme® Xtra" ou "similares a AmyS". A identidade de diversas α -amilases de *Bacillus* conhecidas é resumida na Tabela A:

TABELA A. Percentual de identidade

	707	AP1378	BAN	BSG	SP690	SP722	AA560	LAT
707	100,0	86,4	66,9	66,5	87,6	86,2	95,5	68,1
AP1378	86,4	100,0	67,1	68,1	95,1	86,6	86,0	69,4
BAN	66,9	67,1	100,0	65,6	67,1	68,8	66,9	80,7
BSG	66,5	68,1	65,6	100,0	67,9	67,1	66,3	65,4
SP690	87,6	95,1	67,1	67,9	100,0	87,2	87,0	69,2
SP722	86,2	86,6	68,8	67,1	87,2	100,0	86,8	70,8
AA560	95,5	86,0	66,9	66,3	87,0	86,8	100,0	68,3
LAT	68,1	69,4	80,7	65,4	69,2	70,8	68,3	100,0

- A α -amilase de *B. licheniformis* (LAT) que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7 foi encontrada ser aproximadamente 81% homóloga à α -amilase de *B. amyloliquefaciens* tendo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 9, e aproximadamente 65% homóloga com a α -amilase de *Geobacillus* (anteriormente *Bacillus*) *stearothermophilus* (BSG; AmyS) compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1. α -Amilases homólogas adicionais incluem SP690 e SP722 reveladas no WO 95/26397 e a α -amilase #707 derivada de *Bacillus* sp., mostrada na SEQ ID NO: 6 e descrita por Tsukamoto *et al.* (1988) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 151:25-31. A α -amilase KSM AP1378 (SEQ ID NO: 12) é revelada no WO 97/00324 (KAO Corporation).

α -Amilases ainda mais homólogas incluem a α -amilase produzida pela cepa de *B. licheniformis* descrita na EP 0 252666. (ATCC 27811), e as α -amilases identificadas nos WO 91/00353 e WO 94/18314. Outras α -amilases similares a SPEZYME® Xtra comerciais estão compreendidas nos produtos vendidos sob as seguintes marcas: SPEZYME® AA e Ultraphlow (disponível em Danisco US Inc, Genencor Division), e KEISTASE® (disponível em Daiwa) e LIQUEZYME® SC (SEQ ID NO: 15) disponível em Novozymes, DK). Outras α -amilases relacionadas incluem Termamyl® (SEQ ID NO: 8; Novozymes), STAINZYME® (SEQ ID NO: 10; Novozymes), NATALASE™ (SEQ ID NO: 11; Novozymes), KAO KSM K38 (SEQ ID NO: 13), KAO KSM K36 (SEQ ID NO: 14), outras α -amilases mencionadas na Tabela, e outras α -amilases descritas neste pedido.

Por causa da homologia substancial encontrada entre estas α -amilases, considera-se que pertençam à mesma classe de α -amilases e sejam englobadas pelas presentes composições e métodos. Embora α -amilase de *G. stearothermophilus* (SEQ ID NO: 2) seja usada como um ponto de partida, posições correspondentes nestas e outras α -amilases, *por exemplo*, SP722, BLA, BAN, AA560, SP690, KSM AP1378, #707 e outras α -amilases de *Bacillus* são também esperadas se beneficiar das modificações a serem descritas.

Consequentemente, os termos α -amilase similar a SPEZYME® Xtra ou α -amilase similar a AmyS são destinados a incluir uma α -amilase tendo a sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 e 16. Em algumas modalidades, α -amilase similar a SPEZYME® XTRA ou α -amilase similar a AmyS também incluem α -amilases que exibem identidade substancial no nível de aminoácido à SEQ ID NO: 2, por exemplo, homologia de pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos até 99% (identidade). Em modalidades adicionais, α -amilase similar a SPEZYME® XTRA ou α -amilase similar a AmyS também incluem α -amilases que exibem identidade

substancial ao nível de aminoácido a uma ou mais das SEQ ID NOs: 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, e 16, por exemplo, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos homologia de até 99% (identidade).

A homologia de α -amilases conhecidas ou suspeitas a uma α -amilase de referência pode ser determinada por meio de programas de computador conhecidos na técnica. Geralmente, um alinhamento estrutural entre SPEZYME® Xtra (SEQ ID NO: 2) e, *por exemplo*, outra α -amilase pode ser usado para identificar posições equivalentes/correspondentes em outras α -amilases similares a SPEZYME® Xtra, que podem ser mutadas como descrito neste pedido para produzir efeitos similares. Um programa exemplar é GAP, que é fornecido no pacote de programas GCG (descrito acima). Em particular, Gap GCG v8 pode ser usado com a matriz de classificação pré-configurada de identidade e os seguintes parâmetros pré-configurados: penalidade de criação de lacuna de 5,0 e penalidade de extensão de lacuna de 0,3, respectivamente para comparação de sequência de ácidos nucleicos, e penalidade de criação de lacuna de 3,0 e penalidade de extensão de lacuna de 0,1, respectivamente, para comparação de sequência proteica. GAP usa o método de Needleman e Wunsch, (1970), *J.Mol. Biol.* 48:443-453, para fazer alinhamentos e calcular a identidade. Outros programas e métodos são conhecidos na técnica.

Outro método de obtenção de alinhamentos estruturais deve usar o programa Pile Up do pacote GCG usando os valores pré-configurados das penalidades de lacuna, isto é, uma penalidade de criação de lacuna de 3,0 e penalidade de extensão de lacuna de 0,1. Outros métodos de alinhamento estrutural incluem a análise de grupo hidrofóbico (Gaboriaud *et al.*, (1987), *FEBS LETTERS* 224, pp. 149-155) e processo de execução reversa (Huber, T; Torda, AE, *Protein Science* Vol. 7, N. 1 pp. 142-149 (1998).

α -Amilases similares a SPEZYME® Xtra ou α -amilases similares a AmyS incluem ainda polipeptídeos codificados por uma sequência de DNA

que hibridiza a uma sequência de DNA que codifica uma ou mais das α -amilases acima mencionadas, como exemplificado pelas SEQ ID NOs: 9 (BAN), 5 (BSG; AmyS), 3 (SP722), 1 (SP690), 7 (LAT), e 11 (AA560) de WO 06/002643 e polinucleotídeos que codificam as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 e 16. Um ácido nucleico é hibridizável a outra sequência de ácido nucleico quando uma forma de fita única do ácido nucleico pode anelar a outro ácido nucleico sob as condições apropriadas de temperatura e força iônica da solução. Condições de hibridização e de lavagem são bem conhecidas na técnica (ver, *por exemplo*, Sambrook (1989) *supra*, particularmente os capítulos 9 e 11). Uma sonda oligonucleotídica usada na caracterização de uma α -amilase conhecida ou suspeita similar a SPEZYME[®] Xtra acima pode apropriadamente ser preparada com base na sequência nucleotídica ou de aminoácidos completa ou parcial da α -amilase em questão.

Condições adequadas para teste de hibridização envolvem pré-imersão em SSC 5X e pré-hibridização por 1 hora a 40°C em uma solução de formamida 20%, solução de Denhardt 5X, fosfato de sódio 50 mM, pH 6,8, e 50 mg de DNA de timo de bezerro sonificado desnaturado, seguido por hibridização na mesma solução suplementada com ATP 100 mM por 18 horas a 40°C, seguido por lavagem três vezes do filtro em SSC 2X, SDS 0,2% a 40°C por 30 minutos (baixa estringência), preferencialmente a 50°C (estringência média), mais preferencialmente a 65°C (alta estringência), ainda mais preferencialmente a 75°C (estringência muito alta). Mais detalhes sobre o método de hibridização podem ser encontrados em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989. Em algumas modalidades, condições estridentes correspondem a uma T_m de 65°C e SSC 0,1x, SDS 0,1%.

B. α -Amilases parentais

Qualquer uma das α -amilases acima mencionadas similares a SPEZYME[®] Xtra/AmyS pode servir como uma α -amilase parental a ser modificada e usada como descrito neste pedido. A α -amilase parental/parental também pode ser referida como um "esqueleto" ou "molde", e as amilases

variantes podem ser derivadas, destas. Em algumas modalidades, a α -amilase parental é derivada de *G. stearothermophilus*. Em uma modalidade particular, a α -amilase parental tem a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 2. Em outras modalidades, a α -amilase parental tem a sequência de aminoácidos das SEQ ID NOs: 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 e 16, ou mostra identidade substancial no nível de aminoácido a SEQ ID NOs: 1, 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15 e/ou 16, por exemplo, de pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98%, ou pelo menos até 99% de homologia (identidade).

Uma α -amilase parental também pode ser uma α -amilase híbrida, isto é, α -amilase, compreendendo uma combinação de sequências de aminoácidos parciais derivadas de pelo menos duas α -amilases, tais como aquelas descritas acima. Além disso, a α -amilase híbrida pode incluir uma porção de um α -amilase similar a SPEZYME[®] Xtra/AmyS e porção de uma ou mais α -amilases de origem microbiana (bacteriana ou fúngica) e/ou mamífera.

Dessa forma, a α -amilase híbrida parental pode compreender uma combinação de sequências de aminoácidos parciais que derivam de pelo menos duas α -amilases similares a SPEZYME[®] XTRA, ou de pelo menos uma similar a SPEZYME[®] Xtra e pelo menos uma α -amilase não similar a SPEZYME[®] XTRA bacteriana, ou de pelo menos uma similar a SPEZYME[®] Xtra e pelo menos uma α -amilase fúngica e similares. Por exemplo, a α -amilase parental pode compreender uma parte C-terminal de uma α -amilase derivada de uma linhagem de *B. licheniformis*, e uma parte N-terminal de uma α -amilase derivada de uma linhagem de *G. stearothermophilus*.

IV. Propriedades alteradas de variantes de α -amilase

A seguinte seção descreve a relação entre mutações, que estão presentes nos polipeptídeos variantes descritos neste pedido, e alterações desejáveis em propriedades (em relação àquelas de uma α -amilase similar a

SPEZYME[®] Xtra parental), que resultam destas.

Em um primeiro aspecto, uma variante de uma α -amilase parental de *G. stearothermophilus* é fornecida, compreendendo uma alteração em uma ou mais posições (usando a SEQ ID NO: 1 ou a SEQ ID NO: 2 para a numeração de aminoácidos) selecionada a partir do grupo de:

P17, D19, T21, N28, S51, G72, V74, A82, Q86, Q89, A93, G95, Q97, W115, D117, P123, S124, D125, N127, I130, G132, Q135, P145, G146, G148, S153, Y159, W166, S169, K171, W187, P209, N224, S242, G256, D269, N271, T278, N281, G302, A304, R308, T321, Q358, P378, S382, K383, T398, H405, T417, E418, P420, G421, P432, W437, G446, G454, S457, T459, T461, S464, G474, R483.

em que

(a) a alteração(ões) é independentemente

(i) uma inserção de um aminoácido a jusante do aminoácido que ocupa a posição,

(ii) uma deleção do aminoácido que ocupa a posição, ou

(iii) uma substituição do aminoácido que ocupa a posição por um aminoácido diferente,

(b) a variante tem a atividade de α -amilase e (c) cada posição corresponde a uma posição de aminoácido adicionado na sequência da α -amilase parental de *G. stearothermophilus* tendo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 1 ou 2.

Especificamente contempladas neste pedido são S242A, S242Q, S242N e S242E, que podem ser combinadas com mutações em R179, G180, I181, G182 e/ou K183, associadas com a ligação cálcio-sódio, e/ou mutações em P245 no meio de uma α -hélice.

As posições correspondentes em outras α -amilases parentais similares a SPEZYME[®] Xtra podem ser encontradas pelo alinhamento como descrito acima e mostradas no alinhamento na figura 4.

30 Estabilidade

No contexto das variantes descritas neste pedido, mutações (incluindo substituições e deleção de aminoácidos) de importância com relação

à realização de estabilidade alterada, em particular estabilidade melhorada (*isto é*, mais alta ou mais baixa), especialmente em temperaturas altas (*isto é*, 70 a 120°C) e/ou pH extremo (*isto é*, pH baixo ou alto, isto é, pH 4 a 6 ou pH 8 a 11, respectivamente), em particular em concentrações (*isto é*, não ligadas, por isso em solução) de cálcio livre abaixo de 60 ppm, incluem algumas das mutações listadas na seção "Propriedades Alteradas". A estabilidade pode ser determinada como descrito na seção "Métodos" abaixo.

Mutações exemplares em α -amilases SPEZYME® Extra e relacionadas que aumentam a estabilidade incluem:

- 10 (a) uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos: 74A, 115L, 124K, 124R, 132A, 132C, 135A, 145A, 146A, 148A, 148N, 159A, 159C, 159D, 159E, 159F, 159G, 159H, 159K, 159L, 159N, 159R, 159S, 159T, 159V, 169A, 169L, 169M, 169Y, 179A, 181A, 181C, 181D, 181E, 181L, 181P, 181Q, 181V, 181Y, 242A, 242D, 242E, 242Q,
- 15 261L, 271A, 271V, 278A, 278H, 278K, 278N, 278R, 281A, 281L, 281M, 302D, 302M, 304D, 304E, 304M, 321A, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 378D, 378N, 378R, 382D, 398A, 418A, 418M, 418N, 420A, 421R, 432A, 432D, 432L, 432M, 432N, 432Q, 432R, 432Y, 437D, 437G, 437H, 437L, 437M, 437Y, 446A, 446Y, 454A, 464Q, 464Y, 474A, 474E, 474K, 474L, 474M,
- 20 474N, 474P, 474Q, 474R, 474S e 474V, ou
- (b) uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos: 6I, 6N, 6Q, 6T, 6V, 14T, 16F, 25A, 25C, 25G, 25Q, 27M, 36Q, 36S, 39G, 39V, 50I, 50L, 50M, 50N, 50Q, 52S, 53T, 67N, 67S, 80D, 80I, 90E, 133P, 133V, 137M, 137S, 141E, 141I, 141L, 141M, 141Q, 141R, 141S,
- 25 141V, 150E, 151I, 152G, 155S, 155Y, 168W, 173T, 188P, 193F, 193K, 193L, 193Y, 213L, 213M, 213V, 217Q, 220P, 220Q, 220R, 220S, 220V, 221I, 221S, 249E, 250F, 250I, 250M, 252L, 253Y, 254E, 254F, 254T, 254V, 255F, 255K, 255W, 257L, 257M, 257S, 257V, 258D, 258G, 258H, 258K, 258Q, 258T, 258V, 268F, 274W, 283M, 283N, 283V, 285E, 285Q, 293G, 293K,
- 30 294W, 301F, 301I, 301P, 301R, 301T, 301W, 309D, 309V, 312H, 312S, 312V, 312Y, 313G, 313H, 313I, 313L, 313S, 313V, 318T, 338A, 338C, 338G, 338M, 338T, 339K, 339T, 339V, 340A, 340M, 340Q, 340T, 343C, 343I,

343P, 343R, 343Y, 345I, 345Q, 369I, 369T, 370G, 375T, 385T, 386K, 394L, 394V, 400A, 400N, 400V, 402H, 402I, 402T, 402V, 402W, 403A, 403E, 403G, 403Q, 403R, 403T, 403V, 404C, 404E, 404G, 404I, 404V, 419A, 419C, 419M, 419T, 422E, 422G, 433A, 433H, 433I, 433K, 433L, 433M, 5 433V, 433Y, 442A, 442G, 442N, 442R, 442S, 442T, 442V, 442W, 442Y, 445G, 445I, 445N, 445T, 445V, 445W, 447I, 447N, 447Q, 447W, 447Y, 448C, 448F, 448G, 448H, 448I, 448N, 448Y, 450C, 450H, 450M, 450N, 450R, 450S, 450T, 450W, 455G, 455I, 455P, 455V, 463A, 463M, 463S, 463T, 463V, 463W, 465G, 465I, 465K, 465N, 465T, 465V, 469D, 469W, 10 469Y, 471I, 471V, 473G, 473Y, 476A, 476G, 476L, 476M, 476N e 476T

Estabilidade de Ca^{2+}

Estabilidade de Ca^{2+} alterada significa que a estabilidade da enzima sob depleção de Ca^{2+} foi melhorada, isto é, estabilidade mais alta ou mais baixa. No contexto das variantes descritas neste momento, mutações (incluindo substituições e deleções de aminoácidos) de importância com relação ao alcance de estabilidade alterada de Ca^{2+} , em particular estabilidade de Ca^{2+} melhorada, isto é, estabilidade mais alta ou mais baixa, especialmente em pH alto (isto é, pH 8 a 10,5) inclui alguma das mutações listadas na seção "Propriedades Alteradas".

20 Atividade Específica e ou expressão aumentada

Em um aspecto adicional, mutações importantes (incluindo substituições e deleções de aminoácido) com relação à obtenção de variantes que exibem atividade específica alterada, em particular atividade específica aumentada ou reduzida, especialmente a temperaturas de 10 a 60°C, preferencialmente 20 a 50°C, especialmente 30 a 40°C, inclui qualquer uma das mutações listadas na seção "Propriedades Alteradas". A atividade específica pode ser determinada como descrito na seção "Métodos" abaixo. Em alguns casos, as mutações aumentam a expressão em vez de ou além de aumentar a atividade específica. Mutações exemplares são como se segue:

30 (a) uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em 124N, 125A, 125K, 125N, 130A, 130S, 159A, 159D, 159E, 159G, 159H, 159K, 159L,

159N, 159R, 159S, 159T, 166F, 166G, 166H, 166S, 166Y, 169L, 179A, 179P, 180A, 180D, 180H, 180K, 180L, 180N, 180T, 180V, 180Y, 181A, 181D, 181E, 181G, 181P, 181R, 181S, 181V, 187A, 187C, 187K, 187N, 187P, 187Q, 187R, 187S, 242H, 242N, 278H, 278K, 278N, 278R, 281M, 5 302D, 304M, 304Y, 321H, 321Q, 321R, 333Q, 432Q, 437Y, 446A, 474Q e 474S, ou

(b) uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em 6A, 6D, 6E, 6H, 6I, 6K, 6L, 6M, 6N, 6P, 6Q, 6R, 6S, 6T, 6V, 6W, 6Y, 13K, 14F, 14T, 14Y, 10 15A, 15D, 15E, 015G, 15H, 15K, 15N, 15P, 15Q, 15R, 15S, 15T, 15W, 16A, 16E, 16G, 16H, 16K, 16N, 16P, 16Q, 16R, 16T, 25C, 39D, 39E, 39N, 39Q, 81Y, 121P, 139D, 139H, 139R, 139Y, 177A, 188D, 191H, 191K, 192A, 192D, 192G, 192N, 192P, 192Q, 192S, 192T, 192V, 192Y, 196A, 196C, 196D, 196E, 196F, 196H, 196I, 196K, 196P, 196R, 196S, 196T, 196V, 201A, 201E, 15 201G, 201H, 201M, 202H, 216E, 216G, 216H, 216M, 216Q, 216R, 216S, 216T, 216Y, 221A, 221D, 221F, 221I, 221L, 221M, 221N, 221R, 221S, 221V, 221Y, 237G, 240G, 240N, 240P, 240Q, 240R, 240T, 246R, 250A, 250D, 250E, 250F, 250G, 250I, 250K, 250L, 250M, 250N, 250Q, 250R, 250S, 250W, 252K, 268A, 268D, 268E, 268G, 268H, 268K, 268N, 268P, 268Q, 20 268R, 268S, 274A, 274D, 274G, 274I, 274K, 274L, 274N, 274Q, 274R, 274S, 274T, 275K, 285Q, 285Y, 293K, 293R, 318A, 318F, 318G, 318I, 318K, 318L, 318M, 318R, 318S, 318T, 318V, 318Y, 319C, 319D, 319H, 319I, 319K, 319R, 319Y, 320K, 320R, 320T, 338A, 338G, 338I, 338M, 338P, 338S, 338V, 339G, 339P, 340A, 340D, 340E, 340H, 340K, 340N, 340Q, 345E, 25 363D, 363E, 363M, 363N, 363Q, 363S, 366Q, 370A, 370D, 370E, 370H, 370K, 370N, 370Q, 370S, 375A, 375D, 375E, 375K, 375N, 375Q, 375R, 375S, 419A, 419I, 419M, 419P, 419S, 419V, 448Y, 452N, 452Q, 452R, 452S, 471R e 471Y.

Estabilidade à Oxidação

30 As variantes descritas podem ter estabilidade à oxidação alterada, em particular estabilidade à oxidação superior, em comparação com a α -amilase parental. A estabilidade à oxidação aumentada é vantajosa em, *por*

exemplo, composições detergentes, e estabilidade à oxidação reduzida pode ser vantajosa em composição para liquefação de amido. Estabilidade à oxidação pode ser determinada como descrito na seção "Métodos" abaixo.

Perfil de pH Alterado

- 5 Posições e mutações importantes com relação à obtenção de variantes com o perfil de pH alterado, em particular atividade melhorada especialmente em pH alto (*isto é*, pH 8 a 10,5) ou pH baixo (*isto é*, pH 4 a 6) incluem mutações de resíduos de aminoácidos localizados próximos aos resíduos do sítio ativo. Em alguns casos, atividade melhorada é observada,
10 *por exemplo*, em pH<6, em pH <5 ou em pH> 9.

Mutações/substituições específicas preferenciais são aquelas listadas acima na seção "Propriedades Alteradas" das posições em questão. Ensaio adequado são descritos na seção "Métodos" abaixo.

Desempenho de Lavagem

- 15 Posições e mutações importantes com relação à obtenção de variantes com desempenho de lavagem melhorado especialmente em pH alto (*isto é*, pH 8,5 a 11) incluem mutações/substituições específicas listadas acima na seção "Propriedades Alteradas" das posições em questão. O desempenho de lavagem pode ser testado como descrito abaixo na seção
20 "Métodos".

Liquefação de amido

- Algumas mutações têm o efeito de redução da viscosidade de uma composição de amido em comparação àquela observada usando uma α -amilase "selvagem", tal como SPEZYME® Extra. Mutações exemplares
25 incluem uma substituição que introduz um ou mais dos resíduos de aminoácidos selecionados a partir do grupo consistindo em I181A, I181P, I181C, I181E, I181Y, S242A, S242E, S242Q, G132A, N193Y e E188P.

Outras Mutações em Variantes

- Em algumas modalidades, as variantes presentes incluem uma
30 ou mais modificações além daquelas delineadas acima. Por exemplo, pode ser vantajoso que um ou mais resíduos prolina sejam substituídos por um resíduo não prolina. Resíduos não prolina exemplares incluem alanina, glic-

na, serina, treonina, valina e leucina. Similarmente pode ser vantajoso substituir um ou mais resíduos cisteína por um resíduo não cisteína. Resíduos não cisteína exemplares incluem serina, alanina, treonina, glicina, valina e leucina.

5 Além disso, pode ser vantajosa a introdução de mutações em uma ou mais das seguintes posições (usando SEQ ID NO: 7 para numeração): M15, V128, A111, H133, W138, T149, M197, N188, A209, A210, H405, T412, em particular as seguintes mutações únicas, duplas ou triplas ou multi:

10 M15X, em particular M15T,L;
V128X, em particular V128E;
H133X, em particular H133Y;
N188X, em particular N188S,T,P;
M197X, em particular M197T,L;
A209X, em particular A209V;
15 M197T/W138F; M197T/138Y; M15T/H133Y/N188S;
M15N128E/H133Y/N188S; E119C/S130C; D124C/R127C;
H133Y/T149I;
G475R, H133Y/S187D; H133Y/A209V.

20 No caso da α -amilase parental ter a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 7, resíduos de aminoácidos relevantes que podem ser deletados ou substituídos com a intenção de melhorar a estabilidade à oxidação incluem o resíduo cisteína único (C363) e os resíduos de metionina localizados nas posições M8, M9, M96, M200, M206, M284, M307, M311, M316 e M438 na SEQ ID NO: 2.

25 Com relação ao aumento da estabilidade térmica de uma variante de α -amilase em relação a sua α -amilase parental, parece ser particularmente desejável deletar pelo menos um, e preferencialmente dois ou até três, dos seguintes resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 2 são F178, R179, G180, I181, G182 e K183. As
30 deleções aos pares particularmente valiosas deste tipo são R179*+G180*; e I181*+G182* (SEQ ID NO. 16 ou 15, respectivamente) (ou equivalentes destas deleções aos pares em outra α -amilase encontram condições de uma α -

amilase parental no contexto da presente revelação).

Outras mutações de interesse incluem N193F e V416G, como exemplificado com a sequência de aminoácidos mostrada como SEQ ID NO: 2.

5 V. Métodos de preparação de variantes de α -amilase

Vários métodos para introdução de mutações em genes são conhecidos na técnica. Após uma breve discussão sobre a clonagem de sequências de DNA que codificam α -amilase, métodos para geração de mutações em sítios específicos dentro da sequência que codifica α -amilase serão discutidos.

A. Clonagem e Expressão de ácidos nucleicos que codificam uma α -amilase

A sequência de DNA que codifica uma α -amilase parental pode ser isolada a partir de qualquer célula ou micro-organismo que produza a α -amilase em questão, usando vários métodos bem conhecidos na técnica. Em primeiro lugar, uma biblioteca de DNA e/ou cDNA genômico deve ser construída usando DNA cromossômico ou RNA mensageiro do organismo que produz a α -amilase a ser estudada. Então, se a sequência de aminoácidos da α -amilase for conhecida, sondas oligonucleotídicas homólogas, marcadas podem ser sintetizadas e usadas para identificar clones que codificam α -amilase de uma biblioteca genômica preparada a partir do organismo em questão. Alternativamente, uma sonda oligonucleotídica marcada contendo sequências homólogas a um gene de α -amilase conhecido pode ser usada como uma sonda para identificar clones que codificam α -amilase, usando condições de hibridização e lavagem de estringência mais baixa.

Outro método para identificação de clones que codificam α -amilase envolvem a inserção dos fragmentos de DNA genômico em um vetor de expressão, tal como um plasmídeo, transformação bactérias negativas para α -amilase com a biblioteca de DNA genômico resultante, e então plaqueamento das bactérias transformadas sobre ágar contendo um substrato para α -amilase, por meio disso permitindo que clones que expressam α -amilase sejam identificados.

Alternativamente, a sequência de DNA que codifica a enzima

pode ser preparada sinteticamente por métodos padrão estabelecidos, *por exemplo*, o método por fosfoamidita descrito por S. L. Beaucage e M. H. Caruthers (1981) ou o método descrito por Matthes *et al.* (1984). No método por fosfoamidita, os oligonucleotídeos são sintetizados, *por exemplo*, em um sintetizador de DNA automático, purificados, anelados, ligados e clonados em vetores apropriados.

Finalmente, a sequência de DNA pode ser de origem genômica e sintética mista, de origem sintética e de cDNA mista ou origem genômica e cDNA mista, preparada pela ligação de fragmentos de origem sintética, genômica ou de cDNA (como apropriado, os fragmentos correspondentes a várias partes da sequência de DNA inteira), conforme técnicas padrão. A sequência de DNA também pode ser preparada pela reação de polimerase em cadeia (PCR) usando iniciadores específicos, por exemplo, como descrito na Patente norte-americana No. 4.683.202.

15 B. Mutagênese Sítio-dirigida

Uma vez que uma sequência de DNA que codifica a α -amilase foi isolada, e os sítios desejáveis para mutação identificados, mutações podem ser introduzidas usando oligonucleotídeos sintéticos. Estes oligonucleotídeos contêm sequências nucleotídicas flanqueando os sítios de mutação desejados; nucleotídeos mutantes são inseridos durante a síntese oligonucleotídica. Em um método específico, uma lacuna de fita simples de DNA, preenchendo a sequência que codifica a α -amilase, é criada em um vetor carreando o gene da α -amilase. Então o nucleotídeo sintético, carregando a mutação desejada, é anelado a uma porção homóloga do DNA de fita simples. A lacuna restante então é preenchida com DNA polimerase I (fragmento Klenow) e o construto é ligado usando T4 ligase.

Outro método de introdução de mutações em sequências de DNA que codificam a α -amilase envolve 3 etapas de geração de um fragmento de PCR contendo a mutação desejada introduzida usando uma fita de DNA quimicamente sintetizada como um dos iniciadores nas reações de PCR. A partir do fragmento gerado por PCR, um fragmento de DNA carreando a mutação pode ser isolado pela clivagem com endonucleases de res-

trição e reinserido em um plasmídeo de expressão.

Métodos alternativos para o fornecimento de variantes incluem transposições gênicas, *por exemplo*, como descrito no WO 95/22625 (de Affymax Technologies N.V.) ou no WO 96/00343 (de Novo Nordisk A/S), ou
5 outras técnicas correspondentes que resultam em uma enzima híbrida compreendendo a mutação(ões), *por exemplo*, substituição(ões) e/ou deleção(ões), em questão.

C. Expressão de variantes de α -amilase

Uma sequência de DNA que codifica uma variante produzida por
10 métodos descritos acima, ou por métodos alternativos, pode ser expressa usando um vetor de expressão, que tipicamente inclui sequências controle que codificam um promotor, operador, sítio de ligação a ribossomo, sinal de iniciação de tradução, e, opcionalmente, um gene repressor ou vários genes ativadores.

15 O vetor de expressão recombinante carreando a sequência de DNA que codifica uma variante de α -amilase pode ser qualquer vetor, que possa ser convenientemente submetido a procedimentos de DNA recombinante, e a escolha do vetor muitas vezes dependerá da célula hospedeira na qual será introduzido. Dessa forma, o vetor pode ser um vetor de replicação
20 autônoma, isto é, um vetor que existe como uma entidade extracromossômica, a replicação da qual é independente de replicação cromossômica, *por exemplo*, um plasmídeo, um bacteriófago ou um elemento extracromossômico, minicromossomo ou um cromossomo artificial. Alternativamente, o vetor pode ser aquele que, quando introduzido em uma célula hospedeira, está
25 integrado no genoma da célula hospedeira e replicado em conjunto com o cromossomo(s) no qual foi integrado.

A sequência de DNA deve ser operacionalmente unida a uma sequência promotora adequada. O promotor pode ser qualquer sequência de DNA, que mostre atividade transcricional na célula hospedeira de escolha
30 e possa ser derivado de genes que codificam proteínas homólogas ou heterólogas à célula hospedeira. Exemplos de promotores adequados para direção da transcrição da sequência de DNA que codifica uma variante de α -

amilase, especialmente em um hospedeiro bacteriano, são promotor operon *lac* de *E. coli*, promotores do gene *dagA* de agarase de *Streptomyces coelicolor*, os promotores do gene de α -amilase de *Bacillus licheniformis* (*amyL*), os promotores do gene de amilase maltogênica de *G. stearothermophilus* (*amyM*), os promotores de α -amilase de *B. amyloliquefaciens* (*amyQ*), os promotores dos genes *xylA* e *xylB* de *B. subtilis* etc. Para transcrição em um hospedeiro fúngico, exemplos de promotores úteis são aqueles derivados do gene que codifica TAKA amilase de *A. oryzae*, proteinase aspártica de *Rhizomucor miehei*, α -amilase neutra de *A. niger*, α -amilase estável a ácido de *A. niger*, glicoamilase de *A. niger*, lipase de *Rhizomucor miehei*, protease alcalina de *A. oryzae*, triose fosfato isomerase de *A. oryzae* ou acetamidase de *A. nidulans*.

O vetor de expressão também pode compreender um terminador de transcrição adequado e, em eucariontes, sequências de poliadenilação operacionalmente unidas à sequência de DNA que codifica uma variante de α -amilase. Sequências de terminação e poliadenilação podem ser apropriadamente derivadas das mesmas fontes que o promotor.

O vetor pode compreender ainda uma sequência de DNA que permita ao vetor replicar-se na célula hospedeira em questão. Exemplos de tais sequências são as origens de replicação de plasmídeos pUC19, pACYC177, pUB110, pE194, pAMB1 e pIJ702.

O vetor também pode compreender um marcador selecionável, *por exemplo*, um gene, o produto do qual completa um defeito na célula hospedeira, tal como os genes *dal* de *B. subtilis* ou *B. licheniformis*, ou aquele que confere resistência a antibióticos, tais como resistência a ampicilina, canamicina, cloranfenicol ou tetraciclina. Além disso, o vetor pode compreender marcadores de seleção de *Aspergillus*, tais como *amdS*, *argB*, *niaD* e *sC*, um marcador dando origem à resistência à higromicina, ou a seleção pode ser realizada pela cotransformação, *por exemplo*, como descrito no WO 91/17243.

Embora a expressão intracelular possa ser vantajosa em alguns aspectos, *por exemplo*, usando certas bactérias como células hospedeiras, é

geralmente preferencial que a expressão seja extracelular. Em geral, as α -amilases de *Bacillus* mencionadas neste pedido compreendem uma pré-região que permite a secreção da protease expressa em meio de cultura. Se desejável, esta pré-região pode ser substituída por uma pré-região ou sequência sinal diferente, convenientemente realizada pela substituição das

5 sequências de DNA que codificam as respectivas pré-regiões.

Os procedimentos usados para ligar o construto de DNA que codifica uma variante de α -amilase, o promotor, o terminador e outros elementos, respectivamente, e inseri-los em vetores adequados contendo a informação necessária para replicação, são bem conhecidos pelos versados na

10 técnica (*por exemplo*, Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor, 1989).

A célula compreendendo um construto de DNA ou um vetor de expressão é vantajosamente usada como uma célula hospedeira na produção recombinante de uma variante de α -amilase. A célula pode ser transformada com o construto de DNA que codifica a variante, convenientemente pela integração do construto de DNA (em uma ou mais cópias) no cromossomo hospedeiro. Considera-se geralmente que esta integração é uma vantagem já que a sequência de DNA será provavelmente estavelmente mantida na célula. A integração dos construtos de DNA no cromossomo hospedeiro pode ser realizada de acordo com métodos convencionais, *por exemplo*,

15 por recombinação homóloga ou heteróloga. Alternativamente, a célula pode ser transformada com um vetor de expressão como descrito acima com relação a tipos diferentes de células hospedeiras.

20 A célula pode ser uma célula de um organismo superior, tal como um mamífero ou um inseto, mas é preferencialmente uma célula microbiana, *por exemplo*, uma célula bacteriana ou fúngica (incluindo levedura).

25 Exemplos de bactérias adequadas são bactérias Gram-positivas, tais como *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus lentus*, *Bacillus brevis*, *Geobacillus stearothermophilus*, *Bacillus alkalophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lautus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus thuringiensis* ou *Streptomyces lividans* ou *Streptomy-*

30 *-*

ces murinus, ou bactérias Gram-negativas, tais como *E. coli*. A transformação das bactérias pode ser, por exemplo, efetuada pela transformação de protoplasto ou pelo uso de células competentes de uma maneira conhecida *per se*.

- 5 O organismo levedura pode ser selecionado favoravelmente a partir de uma espécie de *Saccharomyces* ou *Schizosaccharomyces*, por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae*. O fungo filamentoso pode pertencer vantajosamente a uma espécie de *Aspergillus*, por exemplo, *A. oryzae* ou *A. niger*. Células fúngicas podem ser transformadas por um processo que envolve a formação de protoplasto e transformação dos protoplastos seguida
10 pela regeneração da parede celular de uma maneira conhecida *per se*. Um procedimento adequado para transformação de células hospedeiras de *Aspergillus* é descrito na EP 238023.

- Um aspecto das presentes composições e métodos relaciona-se
15 à produção de uma variante de α -amilase pela cultura de uma célula hospedeira sob condições conducentes à produção de amilase variante e recuperação de amilase variante das células e/ou meio de cultura. O meio usado para cultivar as células pode ser qualquer meio convencional adequado para cultivo da célula hospedeira em questão e obtenção da expressão da varian-
20 te de α -amilase. Meios adequados estão disponíveis em fornecedores comerciais ou podem ser preparados de acordo com protocolos publicados (por exemplo, como descrito nos catálogos do ATCC).

- A variante de α -amilase secretada a partir das células hospedeiras pode ser convenientemente recuperada do meio de cultura por procedi-
25 mentos bem conhecidos, incluindo a separação das células do meio por centrifugação ou filtração, e precipitação dos componentes proteicos do meio por meio de um sal, tais como sulfato de amônio, seguido pelo uso de procedimentos cromatográficos, tais como cromatografia de troca iônica, cromatografia por afinidade ou similares.

30 VI. Aplicações Industriais

As presentes α -amilases variantes possuem propriedades valiosas considerando uma variedade de aplicações industriais. Por exemplo, as

variantes podem ser usadas para processamento/conversão de amido, *por exemplo*, para a liquefação de amido (ver, *por exemplo*, Patente norte-americana No. 3.912.590, pedidos de patente europeia nºs 252730 e 63909, WO 99/19467 e WO 96/28567, todas as referências por meio deste incorpo-

5 radas por referência). As variantes podem ser ainda úteis na produção de adoçantes e etanol (ver, *por exemplo*, Patente norte-americana Nº 5.231.017 por meio deste incorporada por referência), tal como combustível, bebidas e etanol industrial, a partir de amido ou grãos inteiros. As variantes podem ainda ser úteis para produção ou fermentação de cerveja. As variantes podem

10 estar na forma de composições, que podem incluir ainda, *por exemplo*, uma glicoamilase, uma pululanase e outra α -amilase, além de tampões, agentes estabilizantes, conservantes adequados e similares.

As variantes de amilase são também úteis em lavagem de roupas e louças e limpeza de superfície dura, como componentes das composi-

15 ções detergentes. As variantes também podem ser úteis para desengomagem de têxteis, tecidos e artigos de vestuário (ver, *por exemplo*, WO 95/21247, Patentes norte-americanas Nºs 4.643.736, EP 119.920 por meio deste incorporadas por referência), e em produção de polpa e papel.

Estes e outros usos das presentes composições e métodos são

20 descritos em mais detalhes, abaixo.

A. Processamento de grão e aplicações de conversão de amido

Processamento de grão e aplicações de conversão de amido são divididos em duas categorias, ou seja, (1) conversão de amido geral, que cobre a conversão do amido em, *por exemplo*, maltodextrinas, xarope

25 de dextrose, e xarope de alta frutose, (2) produção de etanol e (3) produção de cerveja. Embora muitas etapas envolvidas nestes processos sejam similares, são descritas separadamente. Em alguns casos, a α -amilase variante é usada em combinação com uma fitase (4). Composições para realização destas aplicações também são descritas (5).

30 1. Conversão de amido geral

Processos convencionais de conversão do amido, tais como processos de liquefação e sacarificação são descritos, *por exemplo*, na Pa-

tente norte-americana No. 3.912.590 e publicações de patente europeia Nos. 252.730 e 63.909, por meio deste incorporadas por referência. Geralmente, o processo de conversão de amido degrada o amido a componentes de carboidrato de baixo peso molecular. No caso de conversão do amido em um
5 açúcar, o amido é despolimerizado em um processo envolvendo uma etapa de pré-tratamento e duas ou três etapas de processo consecutivas, isto é, um processo de liquefação, um processo de sacarificação, e dependendo do produto final desejado, processo de isomerização opcional.

a. Pré-tratamento de amido nativo/bruto

10 Amido nativo/bruto consiste em grânulos microscópicos, que são insolúveis em água à temperatura ambiente. Quando uma pasta fluida aquosa de amido é aquecida, os grânulos aumentam e consequentemente rompem, dispersando as moléculas de amido na solução. Durante este processo de "gelatinização", há um aumento dramático na viscosidade. Como o nível
15 de sólidos é 30 a 40% em um processo industrial típico, o amido tem que ser diluído ou "liquefeito" para que possa ser tratado. Esta redução da viscosidade é convencionalmente obtida pela degradação enzimática.

b. Liquefação

Durante a etapa de liquefação, as moléculas de amido de cadeia
20 longa são degradadas em moléculas ramificadas e lineares mais curtas (maltodextrinas) por uma α -amilase. O processo de liquefação é geralmente realizado a aproximadamente 105 a 110°C por aproximadamente 5 a 10 minutos seguido por 1 a 2 horas a 95°C. O pH está tipicamente entre aproximadamente 5,5 e 6,2. Para assegurar estabilidade enzimática ótima sob
25 estas condições, 1 mM de cálcio é tipicamente adicionado (40 ppm de íons cálcio livres). Após este tratamento, o amido liquefeito terá uma "dextrose equivalente" (DE) de 10 a 15.

c. Sacarificação

Após processo de liquefação, as maltodextrinas são convertidas
30 em dextrose pela adição de uma glicoamilase (*por exemplo*, OPTIDEX® L-400) e uma enzima desramificante, tal como uma isoamilase (Patente norte-americana Nº 4.335.208) ou uma pululanase. Antes desta etapa, o pH é re-

duzido a um valor abaixo de aproximadamente 4,5, mantendo alta temperatura (acima de 95°C), para inativação da α -amilase liquidificante para reduzir a formação de oligossacarídeos curtos chamados "precursores de panose" que não podem ser hidrolisados apropriadamente pela enzima desramificante. A temperatura é reduzida para 60°C, e glicoamilase e enzima desramificante são adicionadas. O processo de sacarificação prossegue por 24 a 72 horas.

Normalmente, ao desnaturar a α -amilase após etapa de liquefação, aproximadamente 0,2 a 0,5% do produto de sacarificação é trissacárido ramificado Glc α 1-6Glc α 1-4Glc (panose) que não pode ser degradado por uma pululanase. Se a amilase ativa a partir da etapa de liquefação estiver presente durante a sacarificação (*isto é*, não desnaturando), este nível pode ser tão alto como 1 a 2%, que é altamente indesejável já que reduz significativamente o rendimento da sacarificação.

15 d. Isomerização

Quando o produto de açúcar final desejado é, *por exemplo*, xarope de alta frutose, o xarope de dextrose pode ser convertido em frutose. Após processo de sacarificação, o pH é aumentado a um valor na faixa de aproximadamente 6 a 8, preferencialmente pH 7,5, e o cálcio é removido por troca iônica. O xarope de dextrose então é convertido em xarope de alta frutose usando, *por exemplo*, uma glicose isomerase imobilizada (tal como GENSWEET® IGI-HF).

2. Produção de Etanol

Em geral, a produção de álcool (etanol) a partir do grão inteiro pode ser separada em 4 etapas principais, isto é, (a) moagem, (b) liquefação, (c) sacarificação e (d) fermentação. Algumas destas etapas são similares às aquelas descritas, acima.

a. Moagem e produção de pasta fluida

Um substrato contendo amido, tal como grão, milho, milo ou similar, é moído a fim de abrir a estrutura e permitir processamento adicional. Os dois processos usados são geralmente referidos como moagem úmida ou seca. Na moagem seca, o núcleo inteiro é moído e usado na parte rema-

nescente do processo. A moagem úmida fornece uma separação muito boa de germe e farinha (grânulos de amido e proteína) e é com algumas exceções, aplicada em locais onde há uma produção paralela de xaropes.

O material moído contendo amido é combinado com água e vinhaça diluída reciclada resultando em uma pasta fluida aquosa. A pasta fluida compreenderá entre 15 e 55% ds p/p (*por exemplo*, 20 a 50%, 25 a 50%, 25 a 45%, 25 a 40%, 20 a 35% e 30 a 36% ds). A vinhaça diluída reciclada (material de processo anterior) está tipicamente na faixa de 10 a 70% v/v (*por exemplo*, 10 a 60%, 10 a 50%, 10 a 40%, 10 a 30%, 10 a 20%, 20 a 60%, 20 a 50%, 20 a 40% e também 20 a 30%). 25 a 40% ds são regularmente comuns.

Uma vez que o material moído contendo amido é combinado com água e material de processo anterior, o pH geralmente não é ajustado na pasta fluida. Além disso, o pH não é ajustado após adição de fitase (ver abaixo) e α -amilase à pasta fluida. O pH da pasta fluida estará tipicamente na faixa de pH 4,5 a menos de 6,0 (*por exemplo*, pH 4,5 a 5,8, pH 4,5 a 5,6, pH 4,8 a 5,8, pH 5,0 a 5,8, pH 5,0 a 5,4, pH 5,2 a 5,5 e pH 5,2 a 5,9). O pH da pasta fluida pode estar entre o pH 4,5 e 5,2 dependendo da quantidade da vinhaça diluída adicionada à pasta fluida e do tipo de material compreendendo a vinhaça diluída. Por exemplo, o pH da vinhaça diluída pode estar entre pH 3,8 e pH 4,5. A Tabela B ilustra a modificação de pH que ocorre com a adição de quantidades crescentes de vinhaça diluída a uma pasta fluida de milho completo triturado (32% ds) após agitação por 2 horas a 68,3°C.

TABELA B. Modificação de pH que ocorre com a adição de quantidades crescentes de vinhaça diluída

Vinhaça diluída p/p %	pH final
0	5,52
20	5,29
40	5,16
50	5,09
60	5,05
80	4,98
100	4,94

Deve ser mencionado que durante a produção de etanol, ácidos podem ser adicionados para reduzir o pH na cerveja bem como para reduzir o risco de contaminação microbiana antes da destilação.

Em alguns casos, fitase é adicionada à pasta fluida. Fitases são descritas em mais detalhes, abaixo. Em alguns casos, uma α -amilase é adicionada à pasta fluida. Em alguns casos, uma fitase e uma α -amilase são adicionadas à pasta fluida sequencialmente. Em alguns casos, uma fitase e uma α -amilase são adicionadas simultaneamente. Em alguns casos, a pasta fluida compreendendo a fitase e α -amilase é incubada (pré-tratadas) por um período de 5 minutos a 8 horas (*por exemplo*, 5 minutos a 6 horas, 5 minutos a 4 horas, 5 minutos a 2 horas, e 15 minutos a 4 horas). Em outros casos, a pasta fluida é incubada a uma temperatura na faixa de 40 a 115°C, (*por exemplo*, 45 a 80°C, 50 a 70°C, 50 a 75°C, 60 a 110°C, 60 a 95°C, 70 a 110°C, 70 a 85°C e 77 a 86°C).

Em alguns casos, a pasta fluida é incubada a uma temperatura de 0 a 30°C (*por exemplo*, 0 a 25°C, 0 a 20°C, 0 a 15°C, 0 a 10°C e 0 a 5°C) abaixo da temperatura de gelatinização de amido do material contendo amido. Em alguns casos, a temperatura está abaixo de 68°C, abaixo de 65°C, abaixo de 62°C, abaixo de 60°C, ou até abaixo de 55°C. Em algumas modalidades, a temperatura está acima de 45°C, acima de 50°C, acima de 55°C, e até acima de 60°C. A incubação da pasta fluida compreendendo uma fitase e uma α -amilase a uma temperatura abaixo da temperatura de gelatinização de amido pode ser mencionada como uma liquefação primária (1ª).

Atualmente, acredita-se que α -amilases microbianas comercialmente disponíveis usadas no processo de liquefação não são suficientemente estáveis para produzir substrato de amido liquefeito a partir de um processo de moagem seca usando grão completo triturado a uma temperatura acima de aproximadamente 80°C em um pH menor que pH 5,6. Geralmente, a estabilidade de muitas α -amilases comercialmente disponíveis é reduzida em um pH de menos de aproximadamente 4,0.

b. Liquefação

No processo de liquefação, os grânulos de amido são solubiliza-

dos por hidrólise a maltodextrinas na maioria com um DP mais alto que 4. O material bruto pode ser grão inteiro moído ou um fluxo lateral processamento de amido. O grão moído e liquefeito também é conhecido como massa. A hidrólise pode ser realizada pelo tratamento com ácido ou enzimaticamente por α -amilase. Hidrólise ácida é usada em uma base limitada.

A liquefação enzimática é tipicamente realizada como um processo de pasta fluida a quente de três etapas. A pasta fluida é aquecida entre 60 a 95°C (preferencialmente 77 a 86°C, 80 a 85°C e 83 a 85°C) e a enzima(s) é (são) adicionada. Então a pasta fluida é cozida com jato de vapor entre 95 a 140°C, preferencialmente 105 a 125°C, resfriada a 60 a 95°C e mais enzima(s) é (são) adicionada para obtenção da hidrólise final. O processo de liquefação é realizado em pH 4,0 a 6,5, tipicamente em um pH entre 5 e 6.

A pasta fluida pode ser incubada com uma α -amilase e, opcionalmente, uma fitase (discutido neste pedido) e incubada por 5 minutos a 2 horas, em uma faixa de temperatura de 60 a 75°C. Em uma etapa de liquefação adicional, o material incubado ou pré-tratado contendo amido pode ser exposto a um aumento na temperatura tal como 0 a 45°C acima da temperatura de gelatinização de amido do material contendo amido (*por exemplo*, 70°C a 120°C, 70°C a 110°C, e 70°C a 90°C) por um período de tempo de 2 minutos a 6 horas (*por exemplo*, 2 minutos a 4 horas, 90 minutos, 140 minutos e 90 a 140 minutos) em um pH de aproximadamente 4,0 a 5,5 mais preferencialmente entre 1 hora a 2 horas. A temperatura pode ser aumentada por um sistema de cozimento a jato de vapor convencional de alta temperatura por um curto período de tempo, por exemplo, por 1 a 15 minutos. Então o amido pode ser ainda mais hidrolisado a uma temperatura variando de 75°C a 95°C, (*por exemplo*, 80°C a 90°C e 80°C a 85°C) por um período de 15 a 150 minutos (*por exemplo*, 30 a 120 minutos). O pH não pode ser ajustado durante estas etapas do processo e o pH da massa liquefeita está na faixa de pH 4,0 ao pH 5,8 (*por exemplo*, pH 4,5 a 5,8, pH 4,8 a 5,4, e pH 5,0 a 5,2). Em algumas modalidades, uma segunda dose de α -amilase termoes- tável será adicionada à etapa de liquefação secundária, mas em outras mo-

dalidades não haverá uma dosagem adicional de α -amilase.

As etapas de incubação e liquefação de acordo com a invenção podem ser seguidas por etapas de fermentação e sacarificação.

c. Fermentação

5 Os açúcares fermentáveis obtidos durante as etapas de processo de liquefação podem ser usados para produzir álcool, particularmente etanol, através de fermentação microbiana. O organismo usado nas fermentações dependerá do produto final desejado.

Tipicamente se etanol for o produto final desejado, levedura será
 10 usada como o organismo fermentador. Em algumas modalidades preferenciais, o micro-organismo que produz o etanol é uma levedura e especificamente *Saccharomyces*, tal como cepas de *S. cerevisiae* (USP 4.316.956). Uma variedade de *S. cerevisiae* está comercialmente disponível e esta inclui mas não é limitada a FALI (Levedura da Fleischmann), SUPERSTART (Alltech),
 15 FERMIOL (DSM Specialties), RED STAR (Lesaffre) e levedura alcoólica Angel (Angel Yeast Company, China). A quantidade inicial de levedura empregada nos métodos é uma quantidade eficaz para produzir uma quantidade comercialmente significativa de etanol em um período de tempo adequado, (*por exemplo*, para produzir etanol a partir de pelo menos 10% de um substrato tendo entre 25 e 40% DS em menos de 72 horas). As células de levedura são geralmente fornecidas em quantidades de 10^4 a 10^{12} , e preferencialmente de 10^7 a 10^{10} de contagem de levedura viável por ml em caldo de fermentação. A fermentação incluirá além de micro-organismos fermentadores (*por exemplo*, levedura), nutrientes, opcionalmente enzimas adicionais,
 25 incluindo, mas não limitadas a fitases. O uso de leveduras na fermentação é bem conhecido e referência é feita a The Alcohol Textbook, K. Jacques et al., Eds 1999, Nottingham University Press, UK. A fermentação de leveduras é normalmente realizada por 24 a 96 horas, tipicamente 35 a 60 horas. A temperatura de fermentação está normalmente entre 26 e 34°C, *por exemplo*,
 30 *aproximadamente* 32°C, e o pH é *aproximadamente* 3 a 6, preferencialmente *aproximadamente* 4 a 5.

Usando micro-organismos fermentadores apropriados, outros

produtos finais podem ser obtidos, incluindo sem limitação, glicerol, 1,3-propanodiol, gliconato, 2-ceto-D-gliconato, 2,5-diceto-D-gliconato, ácido 2-ceto-L-gulônico, ácido succínico, ácido láctico, aminoácidos e derivados dos mesmos. Por exemplo, quando ácido láctico é o produto final desejado, um

5 *Lactobacillus* sp. (*L. casei*) pode ser usado. Quando glicerol ou 1,3-propanodiol são os produtos finais desejados *E.coli* pode ser usada. Quando 2-ceto-D-gliconato, 2,5-diceto-D-gliconato e ácido 2-ceto-L-gulônico são os produtos finais desejados, *Pantoea citrea* pode ser usada.

d. Sacarificação e SSF

10 O material liquefeito contendo amido é sacarificado na presença de enzimas de sacarificação, tais como glicoamilases. O processo de sacarificação pode durar de 12 horas a 120 horas (*por exemplo*, 12 a 90 horas, 12 a 60 horas e 12 a 48 horas). Entretanto, é comum a realização de uma etapa de pré-sacarificação por aproximadamente 30 minutos a 2 horas (*por exem-*

15 *plo*, 30 a 90 minutos) em uma faixa de temperatura de 30 a 65°C, tipicamente acima de 50°C e muitas vezes em torno de 60°C, que é seguida por uma sacarificação completa durante a fermentação. Esta última etapa pode ser referida como sacarificação e fermentação simultâneas (SSF). SSF é comum na produção de etanol, onde as enzimas de sacarificação e organismos fermentadores (*por exemplo*, levedura) são adicionados em conjunto, e

20 então realizados a uma temperatura de 30°C a 40°C e em um pH entre 4,2 a 4,8, preferencialmente pH 4,5.

Açúcares fermentáveis (*por exemplo*, dextrinas, monossacarídeos, particularmente glicose) são produzidos a partir de sacarificação enzimática. Estes açúcares fermentáveis podem ser ainda purificados e/ou convertidos em produtos de açúcar úteis. Além disso, os açúcares podem ser

25 usados como uma matéria-prima para fermentação em um processo de fermentação microbiano para produção de produtos finais, tais como álcool (*por exemplo*, etanol e butanol), ácidos orgânicos (*por exemplo*, ácido láctico e ácido succínico), alcoóis de açúcar (*por exemplo*, glicerol), intermediários de

30 ácido ascórbico (*por exemplo*, gliconato, 2-ceto-D-gliconato, 2,5-diceto-D-gliconato e ácido 2-ceto-L-gulônico), aminoácidos (*por exemplo*, lisina), pro-

teínas (*por exemplo*, anticorpos e fragmentos dos mesmos).

e. Destilação

Opcionalmente, após fermentação, álcool (*por exemplo*, etanol) pode ser recuperado por destilação. O rendimento de etanol é tipicamente
 5 pelo menos 8%, pelo menos 10%, pelo menos 12%, pelo menos 14%, pelo menos 15%, pelo menos 16%, pelo menos 17%, pelo menos 18% (v/v), e é em alguns casos, pelo menos 19%, pelo menos 20%, pelo menos 21%, pelo menos 22%, e até pelo menos 23% (v/v). O etanol obtido pode ser usado como, por exemplo, etanol combustível, etanol de bebidas, *isto é*, bebidas
 10 destiladas neutras potáveis, ou etanol industrial.

f. Subprodutos

Sobra do processo de fermentação é o grão exaurido, que é tipicamente usado em ração animal na forma líquida ou seca. O grão exaurido pode tomar a forma dos chamados "coprodutos de fermentação", tais como
 15 grãos secos de destilarias (DDG) e grãos secos de destilaria mais solúveis (DDGS), que também podem ser usados em ração animal.

3. Produção de cerveja

As presentes α -amilases variantes podem ser úteis em um processo de produção de cerveja. Tipicamente, as α -amilases são adicionadas
 20 durante o processo de mistura, onde suas vantagens, em termos de estabilidade, atividade específica e similares são realizadas como no caso da conversão de amido.

4. Uso de α -amilases variantes em combinação com outras enzimas

Em todos os aspectos de liquefação, sacarificação, SSF e processamento de carboidrato, geralmente, os presentes polipeptídeos de α -
 25 amilase variante podem ser usados em combinação com uma ou mais enzimas adicionais, por exemplo, uma α -amilase, uma glicoamilase, uma isoamilase, uma β -amilase, uma amilase maltogênica, uma protease, uma lipase, uma peroxidase, uma esterase, uma oxidase, uma pectinase, uma pectina
 30 liase, uma cutinase, uma lacase, e/ou uma fitase adicionais. Muitas destas enzimas são descritas em mais detalhes com relação a aplicações em limpeza.

As fitases são enzimas capazes de decompor ácido fítico (fitato) encontrado em grãos e sementes oleaginosas. Acredita-se que fitato, bem como intermediários de sua degradação, desestabilizam ou de outra maneira afetam adversamente α -amilases, por meio disso reduzindo sua eficiência.

5 Fitases que podem ser usadas em combinação com α -amilases variantes são capazes de hidrólise de ácido fítico sob condições definidas das etapas de liquefação e incubação. Em algumas modalidades, fitase é capaz de liberar pelo menos um fosfato inorgânico de um hexafosfato de inositol (ácido fítico). Fitases podem ser agrupadas de acordo com sua pre-
10 ferência por uma posição específica do grupo fosfato éster da molécula de fitato na qual a hidrólise é iniciada, (*por exemplo*, como 3-fitase (EC 3.1.3.8) ou como 6-fitase (EC 3.1.3.26)). Um exemplo típico de fitase é mio-inositol-hexaquifosfato-3-fosfohidrolase.

Fitases podem ser obtidas de micro-organismos, tais como or-
15 ganismos fúngicos e bacterianos. Alguns destes micro-organismos incluem, *por exemplo*, *Aspergillus* (*por exemplo*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. ficum* e *A. fumigatus*), *Myceliophthora* (*M. thermophila*), *Talaromyces* (*T. thermophilus*) *Trichoderma spp* (*T. reesei*). E *Thermomyces* (WO 99/49740). Fitases também estão disponíveis a partir de espécies *Penicillium*, *por exemplo*, *P. hor-*
20 *dei* (ATCC N. 22053), *P. piceum* (ATCC N. 10519), ou *P. brevi-compactum* (ATCC N. 48944). Ver, *por exemplo*, USP 6.475.762. Além disso, fitases estão disponíveis a partir de *Bacillus* (*por exemplo*, *B. subtilis*, *Pseudomonas*, *Peniophora*, *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterbacter* e *Buttiauxella* (ver WO2006/043178).

25 Fitases comerciais estão disponíveis, tais como NATUPHOS® (BASF), RONOZYME® P (Novozymes A/S), PHZYME® (Danisco A/S, Diversa) e FINASE® (AB Enzymes). O método para determinação da atividade de fitase microbiana e definição de uma unidade de uma fitase for publicado por Engelen *et al.* (1994) *J. AOAC Int.* 77:760-764. A fitase pode ser uma fitase
30 selvagem, variante ou fragmento da mesma.

Fitases exemplares são derivadas de espécies de bactéria *Buttiauxella*. *Buttiauxella spp.* inclui *B. agrestis*, *B. brennerae*, *B. ferragutiase*, *B.*

gaviniae, *B. izardii*, *B. noackiae* e *B. warmboldiae*. Cepas de espécies *Buttiauxella* estão disponíveis no DSMZ, German National Resource Center for Biological Material (Inhoffenstrabe 7B, 38124 Braunschweig, DE). Cepa de *Buttiauxella* sp. P1-29 depositada sob número de acesso NCIMB 41248 é um exemplo de uma cepa particularmente útil da qual uma fitase pode ser obtida. Fitase pode ser BP selvagem, uma variante da mesma (tal como BP-11) descrita no WO 06/043178, ou variante como descrito na Publicação de Patente norte-americana No. US20080220498, depositada em 6 de março de 2007 (ver, *por exemplo*, Tabela 1 e SEQ ID NO: 3).

A fitase também pode ser a variante de fitase de *Buttiauxiella* BP-17, tendo a sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 19, mostrada abaixo, ou uma fitase tendo identidade de sequência de pelo menos 75%, pelo menos 80%, pelo menos 85%, pelo menos 88%, pelo menos 90%, pelo menos 91%, pelo menos 92%, pelo menos 93%, pelo menos 94%, pelo menos 95%, pelo menos 96%, pelo menos 97%, pelo menos 98% e até pelo menos 99% à sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO: 19.

NDTPASGYQV EKVILSRHG VRAPTKMTQT MRDVTPTNPW EWPVKLG-
YIT PRGEHLISLM GGFYRQKFQQ QGILSQGSCP TPNSIYVWAD VDQR-
TLKTGE AFLAGLAPQC GLTIHHQQNL EKADPLFHPV KAGTCSMDKT
QVQQAVEKEA QTPIDNLNQH YIPFLALMNT TLNFSTSAWC QKH-
SADKSCD LGLSMPSKLS IKDNGNKVAL DGAIGLSSTL AEIFLLEYAQ
GMPQAAWGNH HSEQEWASLL KLHNVQFDLM ARTPYIARHN GTPLL-
QAISN ALNPNTATESK LPDISPDNKI LFIAGHDTNI ANIAGMLNMR W-
TLPGQPDNT PPGGALVFER LADKSGKQYV SVSMVYQTLE QLRSQTPLSL
NQPAGSVQLK IPGCNDQTAE GYCPLSTFTR VVSQSVEPGC QLQ (SEQ
ID NO:19)

A quantidade (dosagem) de fitase usada na incubação e/ou processos de liquefação pode estar na faixa de aproximadamente 0,001 a 50 FTU/g de ds, (*por exemplo*, na faixa de aproximadamente 0,01 a 25 FTU/g de ds, aproximadamente 0,01 a 15 FTU/g de ds, aproximadamente 0,01 a 10 FTU/g de ds, aproximadamente 0,05 a 15 FTU/g de ds, e aproximadamente 0,05 a 5,0 FTU/g.

5. Composições para processamento de grão e conversão de amido

Um aspecto das presentes composições e métodos é uma composição compreendendo uma ou mais das α -amilases variantes para uso na conversão de amido, incluindo conversão de amido geral, fermentação de álcool, produção de cerveja e similares. Tais composições podem incluir tampões, sais, minerais, estabilizadores, conservantes, agentes antimicrobianos, corantes, fragrâncias e similares, selecionadas para proteger a α -amilase(s) variante de degradação prematura (incluindo proteólise), para prolongar o armazenamento, melhorar a aparência, classificar por cores a composição e similares.

As composições podem incluir ainda enzimas adicionais que se relacionam à conversão de amido, incluindo, *por exemplo*, glicoamilases e fitases. Glicoamilases particulares são AMG G1 ou G2 de *Aspegillis niger*, que são descritas em Boel *et al.* (1984) *EMBO J.* 3:1097-1102 ou uma variante das mesmas, como descrita no WO 00/04136 ou WO 01/04273), AMG de *Talaromyces emersonii*, como descrita no WO 99/28448, ou glicoamilase de *Trichoderma reesei*, como descrita no WO 06/060062.

B. Produção de polpa e papel

As presentes α -amilases variantes também podem ser usadas na produção de materiais lignocelulósicos, tais como polpa, papel e papelão, reforçada a partir de amido de resíduos de papel e papelão, especialmente onde repolpagem ocorre em pH acima de 7 e onde as amilases facilitam a desintegração de resíduos de papel através da degradação do amido de reforço. As α -amilases variantes são especialmente úteis em um processo para produção de uma polpa para fabricação de papel impresso recoberto com amido. O processo pode ser realizado como descrito no WO 95/14807, compreendendo as etapas de: (a) desintegração do papel para produzir uma polpa, (b) tratamento com uma enzima de degradação de amido antes, durante ou após etapa (a), e (c) separação de partículas de tinta da polpa após etapas (a) e (b).

As α -amilases também podem ser úteis onde amido enzimaticamente modificado é usado na fabricação de papel em conjunto com en-

chedores alcalinos, tais como carbonato de cálcio, caulim e argila. Com as presentes α -amilases variantes, é possível modificar o amido na presença do enchedor dessa forma permitindo um processo integrado mais simples.

C. Desengomagem de têxteis, tecidos e artigos de vestuário

5 As α -amilases variantes presentes também podem ser úteis em desengomagem de têxteis, tecidos e artigos de vestuário. Na indústria de processamento de tecido, as α -amilases são tradicionalmente usadas como auxiliares no processo de desengomagem para facilitar a remoção da peça
10 contendo amido, que serviu como um revestimento protetor em fios de trama durante a tecelagem. A remoção completa do revestimento da peça após tecelagem é importante para assegurar resultados ótimos nos processos subsequentes, nos quais o tecido é esfregado, branqueado e tingido. O esgotamento de amido enzimático é preferencial porque não envolve nenhum efeito prejudicial no material da fibra.

15 Para reduzir o custo de processamento e aumentar o rendimento da moagem, o processamento de desengomagem é às vezes combinado com as etapas de esfregação e branqueamento. Em tais casos, auxiliares não enzimáticos, tais como álcali ou agentes de oxidação são usados para danificar o amido, porque α -amilases tradicionais não são muito compatíveis
20 com altos níveis de pH e agentes de branqueamento. O esgotamento não enzimático da peça de amido leva a um pouco de dano de fibra por causa dos produtos químicos muito agressivos usados. Consequentemente, seria desejável usar α -amilases variantes que ofereçam desempenho melhorado em soluções alcalinas. Tais variantes podem ser usadas sozinhas ou em
25 combinação com uma celulase ao desengomar tecido ou pano contendo celulose.

 Processos de desengomagem e branqueamento são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, tais processos são descritos no WO 95/21247, Patente norte-americana No. 4.643.736, EP 119.920 por meio
30 deste incorporadas por referência. Produtos atuais comercialmente disponíveis para desengomagem incluem OPTISIZE® FLEX da Genencor.

D. Composições de limpeza e detergentes

As α -amilases variantes presentes podem ser adicionadas, e dessa forma tornam-se um componente de uma composição detergente. A composição detergente pode ser formulada como um detergente para lavagem de roupas manualmente ou em lavanderia, incluindo um aditivo adequado para lavagem de roupas para pré-tratamento de tecidos manchados e uma composição amaciante de tecido adicionada ao enxague. A composição detergente também pode ser formulada para operações de lavagem de louças manualmente ou à máquina, ou para uso nas operações de limpeza de superfícies duras domésticas. Em geral as propriedades da α -amilase variante devem ser compatíveis com o detergente selecionado em termos de seu pH e outros ingredientes enzimáticos e não enzimáticos.

A composição ou aditivo de detergente pode compreender uma ou mais enzimas adicionais, tais como uma protease, uma lipase, uma peroxidase, outra enzima amilolítica (*por exemplo*, outra α -amilase), uma glicomilase, uma amilase maltogênica, uma CGTase e/ou uma celulase mananase (tais como MANNASTAR™ de Danisco US Inc, Genencor Division)), uma pectinase, uma pectina liase, uma cutinase e/ou lacase, que são descritas em mais detalhes, abaixo:

Proteases: proteases adequadas podem ser derivadas de qualquer organismo, e incluir variantes quimicamente modificadas ou engendradas. A protease pode ser uma serina protease ou uma metaloprotease, preferencialmente uma protease alcalina microbiana ou uma protease similar à tripsina. Exemplos de proteases alcalinas são subtilisinas, especialmente aquelas derivadas de *Bacillus*, *por exemplo*, subtilisina Novo, subtilisina Carlsberg, subtilisina 309, subtilisina 147 e subtilisina 168 (descrita no WO 89/06279). Exemplos de proteases similares à tripsina são tripsina (*por exemplo*, de origem porcina ou bovina) e protease de *Fusarium* descritas no WO 89/06270 e WO 94/25583.

Exemplos de proteases úteis são as variantes descritas nos WO98/23732, WO99/20770, WO 92/19729, WO 98/20115, WO 98/20116 e WO 98/34946, especialmente as variantes com substituições em uma ou mais das seguintes posições: 27, 36, 57, 76, 87, 97, 101, 104, 120, 123, 167,

170, 194, 206, 218, 222, 224, 235 e 274.

Enzimas protease preferenciais comercialmente disponíveis incluem ALCALASE[®], SAVINASE[®], PRIMASE[®], DURALASE[®], ESPERASE[®] e KANNASE[®] (de Novozymes A/S), MAXATASE[®], MAXACAL, MAXAPEM[®],
 5 PROPERASE[®], PURAFECT[®], PURAFECT OXP[®], FN2[®], FN3[®], FN4[®] (Genencor International Inc).

Lipases: Lipases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica, e incluem variante quimicamente modificada ou engendrada. Exemplos de lipases úteis incluem lipases de *Humicola* (sinônimo *Thermomyces*), por exemplo, de *H. lanuginosa* (*T. lanuginosus*) como descrita em EP 258068 e EP 305216 ou de *H. insolens* como descrita no WO 96/13580, uma lipase de *Pseudomonas*, por exemplo, de *P. alcaligenes* ou *P. pseudoalcaligenes* (EP 218272), *P. cepacia* (EP 331376), *P. stutzeri* (GB 1.372.034), *P. fluorescens*, *Pseudomonas* sp. linhagem SD 705 (WO
 10 95/06720 e WO 96/27002), *P. wisconsinensis* (WO 96/12012), uma lipase de *Bacillus*, por exemplo, de *B. subtilis* (Dartois et al. (1993), *Biochemica e Biophysica Acta*, 1131, 253-360), *B. stearothermophilus* (JP 64/744992) ou *B. pumilus* (WO 91/16422). Outros exemplos são variantes de lipase, tais como aquelas descritas nos WO 92/05249, WO 94/01541, EP 407225, EP 260105,
 15 WO 95/35381, WO 96/00292, WO 95/30744, WO 94/25578, WO 95/14783, WO 95/22615, WO 97/04079 e WO 97/07202. Enzimas lipase preferenciais comercialmente disponíveis incluem LIPOLASE[®] e LIPOLASE ULTRA[®] (Novozymes A/S).

Amilases: Uma ou mais amilases adicionais também podem estar incluídas. Amilases adequadas (α e/ou β) incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica, e incluem variantes quimicamente modificadas ou engendradas. Amilases incluem, por exemplo, α -amilases obtidas de *Bacillus*, por exemplo, uma cepa especial de *B. licheniformis*, descrita em mais detalhes em GB 1.296.839. Exemplos de α -amilases úteis são as variantes
 25 descritas nos WO 94/18314, WO 96/39528, WO 94/02597, WO 94/18314, WO 96/23873 e WO 97/43424, especialmente as variantes com substituições em uma ou mais das seguintes posições: 15, 23, 105, 106, 124, 128,

133, 154, 156, 181, 188, 190, 197, 202, 208, 209, 243, 264, 304, 305, 391, 408 e 444. α -Amilases comercialmente disponíveis são DURAMYL[®], LIQUEZYME[®] TERMAMY[®], NATALASE[®], FUNGAMYL[®] e BAN[®] (Novozymes A/S), RAPIDASE[®] e PURASTAR[®] (da Genencor).

- 5 *Celulases*: Celulases adequadas incluem aquelas de origem bacteriana ou fúngica. Mutantes da proteína quimicamente modificadas ou engendradas estão incluídas. Celulases adequadas incluem celulases dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Trichoderma*, *Humicola*, *Fusarium*, *Thielavia*, *Acremonium*, por exemplo, as celulases fúngicas produzidas a partir de
- 10 *Humicola insolens*, *Myceliophthora thermophila* e *Fusarium oxysporum* reveladas na Patente norte-americana N^o 4.435.307, Patente norte-americana N^o 5.648.263, Patente norte-americana N^o 5.691.178, Patente norte-americana N^o 5.776.757 e WO 89/09259. As celulases de *Trichoderma reesei* são reveladas na Patente norte-americana N^o 4.689.297, Patente norte-americana
- 15 No. 5.814.501, Patente norte-americana N^o 5.324.649, WO 92/06221 e WO 92/06165. As celulases de *bacillus* são reveladas na Patente norte-americana N^o 6.562.612. Celulases comercialmente disponíveis incluem CELLUZYME[®], e CAREZYME[®] (Novozymes A/S), CLAZINASE[®] e PURADAX HA[®] (Genencor International Inc.), e KAC-500 (B)[®] (Kao Corporation).
- 20 *Peroxidases/Oxidases*: Peroxidases/oxidases adequadas incluem aquelas de origem vegetal, bacteriana ou fúngica, e incluem variantes quimicamente modificadas ou engendradas. Exemplos de peroxidases úteis incluem peroxidases de *Coprinus*, por exemplo, de *C. cinereus*, e variantes das mesmas como aquelas descritas nos WO 93/24618, WO 95/10602 e
- 25 WO 98/15257. Peroxidases comercialmente disponíveis incluem GUARDZYME[®] (Novozymes A/S).

- A enzima(s) detergente pode estar incluída em uma composição detergente pela adição de aditivos separados contendo uma ou mais enzimas, ou adição de um aditivo combinado compreendendo todas estas enzi-
- 30 mas. Um aditivo detergente pode ser formulado como um líquido, uma pasta fluida, uma barra, um tablete, um pó, um grânulo, uma pasta, etc. Formulações exemplares de aditivo detergente são granulados sem formação de

poeira e líquidos estabilizados ou pastas fluidas. Um detergente líquido pode ser aquoso, tipicamente contendo até 70% de água e de 0 a 30% de solvente orgânico, ou não aquoso.

Granulados sem formação de poeira podem ser produzidos, *por exemplo*, como revelado nas Patentes norte-americanas N^{os} 4.106.991 e 4.661.452, e podem ser opcionalmente cobertos por métodos conhecidos na técnica. Exemplos de materiais de revestimento em cera são produtos de poli(óxido de etileno) (polietilenoglicol, PEG) com pesos molares médios de 1000 a 20000; nonil-fenóis etoxilados tendo de 16 a 50 unidades de óxido de etileno; alcoóis gordurosos etoxilados nos quais o álcool contém de 12 a 20 átomos de carbono e nos qual há 15 a 80 unidades de óxido de etileno; alcoóis gordurosos; ácidos graxos; e mono- e di- e triglicerídeos de ácidos graxos. Exemplos de materiais de revestimento formadores de filme adequados para aplicação por técnicas em leito fluidizado são dados na GB 1483591. Preparações enzimáticas líquidas podem ser, por exemplo, estabilizadas pela adição de um poliol, tal como propilenoglicol, um açúcar ou álcool de açúcar, ácido lático ou ácido bórico de acordo com os métodos estabelecidos. Enzimas protegidas podem ser preparadas de acordo com o método revelado na EP 238.216.

A composição detergente tipicamente compreende um ou mais tensoativos, que podem ser não iônicos (incluindo semipolar), aniônico, catiônico, e/ou zwitteriônicos. Os tensoativos estão presentes tipicamente em um nível de 0,1% a 60% por peso. Composições detergentes exemplares incluem de aproximadamente 1% a aproximadamente 40% de um tensoativo aniônico, tal como alquilbenzenossulfonato linear, α -olefinassulfonato, sulfato de alquila (sulfato de álcool graxo), álcool etoxissulfato, alcanossulfonato secundário, α -sulfo metil éster de ácido graxo, ácido alquil- ou alquenilsuccínico ou sabão, e/ou de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 40% de um tensoativo não iônico, tal como álcool etoxilato, nonil-fenol etoxilato, alquilpoliglicosídeo, alquildimetilamina-óxido, monoetanolamida de ácido graxo etoxilado, monoetanolamida de ácido graxo, polihidroxiálquilamida de ácido graxo, ou derivados N-alquila N-acila de glicosamina ("glicamidas").

A composição detergente pode incluir o construtor de detergente ou agente complexante de 0 a 65%, tal como zeólita, difosfato, trifosfato, fosfonato, carbonato, citrato, ácido nitrilotriacético, ácido etilenodiaminotetracético, ácido dietilenotriaminopentacético, ácido alquil- ou alquenilsuccínico, silicato solúvel ou silicato em camadas (*por exemplo*, SKS-6 de Hoechst). A composição detergente pode incluir um ou mais polímeros, tais como carboximetilcelulose, poli(vinilpirrolidona), poli(etilenoglicol), poli(vinil álcool), poli(vinilpiridina-N-óxido), poli(vinilimidazol), policarboxilatos, tais como poliacrilatos, copolímeros de ácido maleico/acrílico e copolímeros de lauril metacrilato/ácido acrílico.

O detergente pode conter um sistema de branqueamento, que pode incluir uma fonte de H_2O_2 , tal como perborato ou percarbonato que pode ser combinado com um ativador de branqueamento formador de perácido, tal como tetracetiletlenodiamina ou nonanoiloxibenzenossulfonato. Alternativamente, o sistema de branqueamento pode compreender peroxiácidos, *por exemplo*, de amida, imida ou tipo sulfona.

A enzima(s) da composição detergente pode ser estabilizada usando agentes de estabilização convencionais, *por exemplo*, um poliol, tal como propilenoglicol ou glicerol, um açúcar ou álcool de açúcar, ácido láctico, ácido bórico, ou um derivado de ácido bórico, *por exemplo*, um borato éster aromático, ou um derivado de ácido fenil borônico, tal como ácido 4-formilfenilborônico, e a composição pode ser formulada como descrito em, *por exemplo*, WO 92/19709 e WO 92/19708.

A composição detergente também pode conter outros ingredientes de composições detergentes convencionais, tais como condicionadores de tecido, argilas, intensificador de espuma, supressores de espuma, agentes anticorrosivos, agentes de suspensão de detritos, agentes anti-redeposição de detritos, corantes, bactericidas, branqueador ótico, hidrótropos, inibidores de embaçamento ou perfumes.

A α -amilase variante deve estar presente em uma quantidade eficaz, que possa ser prontamente determinada usando os ensaios descritos neste pedido. Como um ponto de partida, é contemplado que uma (ou mais)

- α -amilase variante seja adicionada em uma quantidade correspondente a 0,01 a 100 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavagem, e preferencialmente aproximadamente 0,1 a 1 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavagem. Uma quantidade exemplar é aproximadamente 0,055 mg de proteína enzimática por litro de licor de lavagem.

Composições detergentes de lavagem de louças exemplares incluem o seguinte:

1) COMPOSIÇÃO EM PÓ PARA LAVAGEM DE LOUÇAS AUTOMÁTICA

	Tensoativo não-iônico	0,4 a 2,5%
10	Metilsilicato de sódio	0 a 20%
	Dissilicato de sódio	3 a 20%
	Trifosfato de sódio	20 a 40%
	Carbonato de sódio	0 a 20%
	Perborato de sódio	2 a 9%
15	Tetraacetil etileno diamina (TAED)	1 a 4%
	Sulfato de sódio	5 a 33%
	Enzimas	0,0001 a 0,1%

2) COMPOSIÇÃO EM PÓ PARA LAVAGEM DE LOUÇAS AUTOMÁTICA

	Tensoativo não-iônico	1 a 2%
20	<i>(por exemplo, etoxilato álcool)</i>	
	Dissilicato de sódio	2 a 30%
	Carbonato de sódio	10 a 50%
	Fosfonato de sódio	0 a 5%
	Citrato trissódico diidratado	9 a 30%
25	Acetato de nitrilotrissódico (NTA)	0 a 20%
	Perborato de sódio monoidratado	5 a 10%
	Tetraacetil etileno diamina (TAED)	1 a 2%
	Polímero poliacrilato	6 a 25%
	<i>(por exemplo, copolímero ácido maleico/ácido acrílico)</i>	
30	Enzimas	0,0001 a 0,1%
	Perfume	0,1 a 0,5%
	Água	5 a 10 %

3) COMPOSIÇÃO EM PÓ PARA LAVAGEM DE LOUÇAS AUTOMÁTICA

	Tensoativo não-iônico	0,5 a 2,0%
	Dissilicato de sódio	25 a 40%
	Citrato de sódio	30 a 55%
5	Carbonato de sódio	0 a 29%
	Bicarbonato de sódio	0 a 20%
	Perborato de sódio monoidratado	0 a 15%
	Tetraacetil etileno diamina (TAED)	0 a 6%
	Copolímero ácido maleico/ácido acrílico	0 a 5%
10	<u>Argila</u>	1 a 3%
	Ácidos poliamino	0 a 20%
	Poliacrilato de sódio	0 a 8%
	Enzimas	0,0001 a 0,1%

4) COMPOSIÇÃO EM PÓ PARA LAVAGEM DE LOUÇAS AUTOMÁTICA

15	Tensoativo não-iônico	1 a 2%
	Zeolito MAP	15 a 42%
	Dissilicato de sódio	30 a 34%
	Citrato de sódio	0 a 12%
	Carbonato de sódio	0 a 20%
20	Perborato de sódio monoidratado	7 a 15%
	Tetraacetil etileno	0 a 3%
	Polímero diamina (TAED)	0 a 4%
	Copolímero ácido maleico/ácido acrílico	0 a 5%
	Fosfonato orgânico	0 a 4%
25	<u>Argila</u>	1 a 2%
	Enzimas	0,001 a 0,1%
	Sulfato de sódio	Equilíbrio

5) COMPOSIÇÃO EM PÓ PARA LAVAGEM DE LOUÇAS AUTOMÁTICA

	Tensoativo não-iônico	1 a 7%
30	Dissilicato de sódio	18 a 30%
	Tricitrato de sódio	10 a 24%
	Carbonato de sódio	12 a 20%

	Monopersulfato (2 KHSO ₅ .KHSO ₄ .K ₂ SO ₄)	15 a 21%
	Estabilizador de branqueamento	0,1 a 2%
	Copolímero ácido maleico/ácido acrílico	0 a 6%
5	Dietileno triamino pentaacetato, sal pentassódico	0 a 2,5%
	Enzimas	0,0001 a 0,1%
	Sulfato de sódio, Água	Equilíbrio
	6) COMPOSIÇÃO EM PÓ E LÍQUIDO PARA LAVAGEM DE LOUÇAS COM	
10	SISTEMA TENSOATIVO DE LIMPEZA	
	Tensoativo não-iônico	0 a 1,5%
	N-óxido octadecil dimetilamino diidratado	0 a 5%
	80:20 p. C18/C16 mistura de N-óxido octadecil dimetilamino diidratado e N-óxido hexadecildimetil amino diidratado	0 a 4%
15	70:30 p. C18/C16 mistura de N-óxido octadecil bis (hidroxietil)amina anidro e N-óxido hexadecil bis (hidroxietil)amina anidro	0 a 5%
	C ₁₃ -C ₁₅ alquil etoxissulfato com um grau médio de etoxilação de 3	0 a 10%
20	C ₁₂ -C ₁₅ alquil etoxissulfato com um grau médio de etoxilação de 3	0 a 5%
	C ₁₃ -C ₁₅ álcool etoxilado com um grau médio de etoxilação de 12	0 a 5%
25	Mistura de C ₁₂ -C ₁₅ álcoois etoxilados com um grau médio de etoxilação de 9	0 a 6,5%
	Mistura de C ₁₃ -C ₁₅ álcoois etoxilados com um grau médio de etoxilação de 30	0 a 4%
	Dissilicato de sódio	0 a 33%
	Tripolifosfato de sódio	0 a 46%
30	Citrato de sódio	0 a 28%
	Ácido cítrico	0 a 29%
	Carbonato de sódio	0 a 20%

	Perborato de sódio monoidratado	0 a 11,5%
	Tetraacetil etileno diamina (TAED)	0 a 4%
	Copolímero ácido maleico/ácido acrílico	0 a 7,5%
	Sulfato de sódio	0 a 12,5%
5	Enzimas	0,0001 a 0,1%
	7) COMPOSIÇÃO LÍQUIDA NÃO AQUOSA PARA LAVAGEM DE LOUÇAS AUTOMÁTICA	
	Tensoativo não-iônico líquido (<i>por exemplo, etoxilato alcóois</i>)	2,0 a 10,0%
	Silicato de álcali metálico	3,0 a 15,0%
10	Fosfato de álcali metálico	20,0 a 40,0%
	Líquido veículo selecionado a partir de glicóis, poliglicóis, polióxidos, glicoléteres superiores	25,0 a 45,0%
	Estabilizador (<i>por exemplo, a partir de éster de ácido fosfórico e um C₁₆-C₁₈ alcanol</i>)	0,5 a 7,0%
15	Supressor de espuma (<i>por exemplo, silicone</i>)	0 a 1,5%
	Enzimas	0,0001 a 0,1%
	8) COMPOSIÇÃO LÍQUIDA PARA LAVAGEM DE LOUÇAS NÃO AQUOSA	
	Tensoativo não-iônico líquido (<i>por exemplo, etoxilato alcóois</i>)	2,0 a 10,0%
	Silicato de sódio	3,0 a 15,0%
20	Carbonato de álcali metálico	7,0 a 20,0%
	Citrato de sódio	0,0 a 1,5%
	Sistema de estabilização (<i>por exemplo, misturas de silicone dialquil poliglicol éteres de baixo peso molecular precisamente divididas</i>)	0,5 a 7,0%
	Polímero poliacrilato de baixo peso molecular	5,0 a 15,0%
25	Gel espessante de argila (<i>por exemplo, bentonita</i>)	0,0 a 10,0%
	Polímero hidroxipropil celulose	0,0 a 0,6%
	Enzimas	0,0001 a 0,1%
	Líquido carreador selecionando a partir de higher licóis, poliglicóis, polióxidos e glicol éteres	Equilíbrio
30	9) COMPOSIÇÃO LÍQUIDA PARA LAVAGEM DE LOUÇAS TIXOTRÓPICA	
	C ₁₂ -C ₁₄ ácido graxo	0 a 0,5%
	Tensoativo de copolímero em bloco	1,5 a 15,0%

	Citrato de sódio	0 a 12%
	Tripolifosfato de sódio	0 a 15%
	Carbonato de sódio	0 a 8%
	Tristerato de alumínio	0 a 0,1%
5	Cumeno sulfato de sódio	0 a 1,7%
	Espessante poliacrilato	1,32 a 2,5%
	Poliacrilato de sódio	2,4 a 6,0%
	Ácido bórico	0 a 4,0%
	Formato de sódio	0 a 0,45%
10	Formato de cálcio	0 a 0,2%
	N-decidil óxido dissulfonato de sódio	0 a 4,0%
	Monoetanol amina (MEA)	0 a 1,86%
	Hidróxido de sódio (50%)	1,9 a 9,3%
	1,2-Propanodiol	0 a 9,4%
15	Enzimas	0,0001 a 0,1%
	Supressor de espuma, corante, perfumes, água	Equilíbrio
10) COMPOSIÇÃO LÍQUIDA PARA LAVAGEM DE LOUÇAS		
	Etoxilato álcool	0 a 20%
	Éster de ácido graxo sulfonato	0 a 30%
20	Dodecil sulfato de sódio	0 a 20%
	Poliglicosídeo de alquila	0 a 21%
	Ácido oleico	0 a 10%
	Dissilicato de sódio monoidratado	18 a 33%
	Citrato de sódio diidratado	18 a 33%
25	Estearato de sódio	0 a 2,5%
	Perborato de sódio monoidratado	0 a 13%
	Tetraacetil etileno diamina (TAED)	0 a 8%
	Copolímero ácido maleico/ácido acrílico	4 a 8%
	Enzimas	0,0001 a 0,1%
30	11) COMPOSIÇÃO LÍQUIDA PARA LAVAGEM DE LOUÇAS AUTOMÁTICA CONTENDO PARTÍCULAS BRANQUEADORAS PROTEGIDAS	
	Silicato de sódio	5 a 10%

- | | | |
|---|--------------------------------------|---------------|
| | Pirofosfato de tetrapotássio | 15 a 25% |
| | Trifosfato de sódio | 0 a 2% |
| | Carbonato de potássio | 4 a 8% |
| | Partículas branqueadoras protegidas, | 5 a 10% |
| 5 | <i>por exemplo</i> , cloro | |
| | Espessante polimérico | 0,7 a 1,5% |
| | Hidróxido de potássio | 0 a 2% |
| | Enzimas | 0,0001 a 0,1% |
| | Água | Equilíbrio |
- 10 12) Composições para Lavagem de louças automática como descritas em 1), 2), 3), 4), 6) e 10), em que perborato é substituído por percarbonato.
- 13) Composições para Lavagem de louças automática como descritas em 1) a 6) contendo adicionalmente um catalisador de manganês. O catalisador de manganês pode ser, *por exemplo*, um dos compostos descritos em "Efficient manganese catalysts for low-temperature bleaching", Nature 369, 1994, pp. 637-639.
- 15

VII. Métodos para medida das propriedades de α -amilase

Esta seção descreve ensaios básicos para medida das propriedades de α -amilases. Ensaios adicionais são descritos na seção de Exemplos.

20

A. Ensaios de rastreamento de filtro

Os seguintes ensaios podem ser usados para rastreamento de variantes de α -amilase similares a SPEZYME[®] Xtra tendo estabilidade alterada em pH alto ou baixo e/ou sob condições depletadas de Ca^{2+} em comparação à enzima parental e α -amilase similar a SPEZYME[®] XTRA.

25

1. Ensaio por filtro de alto pH

As bibliotecas de *bacillus* são plaqueadas em um sanduíche de acetato de celulose (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, DE) e filtros de nitrocelulose (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, DE) em placas de ágar TY com canamicina 10 micro g/ml a 37°C por pelo menos 21 horas.

30

A camada de acetato de celulose é localizada sobre a placa de ágar TY.

Cada sanduíche de filtro é especificamente marcado com uma

agulha após plaqueamento, mas antes da incubação a fim de ser capaz de localizar variantes positivas no filtro e o filtro de nitrocelulose com variantes ligadas é transferido para um recipiente com o tampão glicina-NaOH, pH 8,6 a 10,6 e incubado à temperatura ambiente (pode ser alterada de 10 a 60°C) por 15 minutos. Os filtros de acetato de celulose com colônias são armazenados nas placas TY à temperatura ambiente até o uso. Após incubação, atividade residual é detectada em placas contendo agarose 1%, amido 0,2% no tampão glicina-NaOH, pH 8,6 a 10,6. As placas de ensaio com filtros de nitrocelulose são marcadas da mesma forma que o sanduíche de filtro e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após remoção dos filtros, as placas de ensaio são marcadas com solução de Lugol 10%. Variantes de degradação de amido são detectadas como pontos brancos no fundo azul-escuro e então identificadas nas placas de armazenamento. Variantes positivas são novamente rastreadas duas vezes sob as mesmas condições do primeira rastreamento.

2. Ensaio de filtro de baixo cálcio

Bibliotecas de *bacillus* são plaqueadas em um sanduíche de acetato de celulose (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, DE) e filtros de nitrocelulose (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, DE) em placas de ágar TY com um antibiótico relevante, *por exemplo*, canamicina ou cloranfenicol, a 37°C por pelo menos 21 horas. A camada de acetato de celulose é localizada sobre a placa de ágar TY.

Cada sanduíche de filtro é especificamente marcado com uma agulha após plaqueamento, mas antes da incubação a fim de ser capaz de localizar variantes positivas no filtro e o filtro de nitrocelulose com variantes ligadas é transferido para um recipiente com tampão de carbonato/bicarbonato pH 8,5 a 10 e com concentrações de EDTA diferentes (0,001 mM a 100 mM). Os filtros são incubados à temperatura ambiente por 1 hora. Os filtros de acetato de celulose com colônias são armazenados nas placas TY à temperatura ambiente até o uso. Após incubação, atividade residual é detectada em placas contendo agarose 1%, amido 0,2% em tampão carbonato/bicarbonato pH 8,5 a 10. As placas de ensaio com filtros de nitrocelulo-

se são marcadas da mesma forma que o sanduíche de filtro e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após remoção dos filtros, as placas de ensaio são marcadas com solução de Lugol 10%. Variantes de degradação de amido são detectadas como pontos brancos no fundo azul-escuro e então identificadas nas placas de armazenamento. Variantes positivas são novamente rastreadas duas vezes sob as mesmas condições do primeiro rastreamento.

3. Ensaio de filtro de baixo pH

Bibliotecas de *bacillus* são plaqueadas em um sanduíche de acetato de celulose (OE 67, Schleicher & Schuell, Dassel, DE) e filtros de nitrocelulose (Protran-Ba 85, Schleicher & Schuell, Dassel, DE) em placas de ágar TY com cloranfenicol 10 micro g/ml a 37°C por pelo menos 21 horas. A camada de acetato de celulose é localizada sobre a placa de ágar TY.

Cada sanduíche de filtro é especificamente marcado com uma agulha após plaqueamento, mas antes da incubação a fim de ser capaz de localizar variantes positivas no filtro, e o filtro de nitrocelulose com variantes ligadas é transferido para um recipiente com tampão citrato, pH 4,5 e incubado a 80°C por 20 minutos (no rastreamento de variantes no esqueleto selvagem) ou 85°C por 60 minutos (no rastreamento de variantes da α -amilase parental). Os filtros de acetato de celulose com colônias são armazenados nas placas TY à temperatura ambiente até o uso. Após incubação, a atividade residual é detectada em placas de ensaio contendo agarose 1%, amido 0,2% em tampão citrato, pH 6,0. As placas de ensaio com filtros de nitrocelulose são marcadas da mesma forma que o sanduíche de filtro e incubadas por 2 horas a 50°C. Após remoção dos filtros, as placas de ensaio são marcadas com solução de Lugol 10%. Variantes de degradação de amido são detectadas como pontos brancos no fundo azul-escuro e então identificadas nas placas de armazenamento. Variantes positivas são novamente rastreadas duas vezes sob as mesmas condições do primeiro rastreamento.

3. Rastreamento secundário

Transformantes positivos após novo rastreamento são escolhidos da placa de armazenamento e testados em um ensaio de placa secun-

dário. Transformantes positivos são cultivados por 22 horas a 37°C em 5 ml de LB+cloranfenicol. A cultura de *Bacillus* de cada transformante positivo e como um controle um clone expressando o esqueleto correspondente são incubados em tampão citrato, pH 4,5 a 90°C e amostras são tomadas em 0, 10, 20, 30, 40, 60 e 80 minutos. Uma amostra de 3 µL é semeada em uma placa de ensaio. A placa de ensaio é marcada com solução de Lugol 10%. Variantes melhoradas são vistas como variantes com atividade residual mais alta (detectada como halos na placa de ensaio) do que no esqueleto. As variantes melhoradas são determinadas pelo sequenciamento nucleotídico.

10 B. Ensaio de estabilidade de variantes não purificadas

A estabilidade das variantes pode ser analisada como se segue: culturas de *Bacillus* expressando as variantes a serem analisadas são cultivadas por 21 horas a 37°C em 10 ml de LB+cloranfenicol. 800 µL de cultura são misturados com 200 µL de tampão citrato, pH 4,5. Diversas alíquotas de 70 µL correspondentes ao número de pontos de tempo de amostra são feitas em tubos de PCR e incubadas a 70°C ou 90°C para vários pontos de tempo (tipicamente 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos) em uma máquina de PCR. A amostra de 0 minuto não é incubada em alta temperatura. Atividade na amostra é medida pela transferência de 20 µL a 200 µL de α-amilase MPR3 substrato PNP-G₇ ((Boehringer Mannheim. No. de cat. 1660730) como descrito abaixo sob "Ensaio de Atividade de α-amilase". Os resultados são traçados como porcentagem de atividade (em relação ao ponto de tempo 0) versus tempo, ou afirmados como porcentagem de atividade residual após incubação por um certo período de tempo.

25 C. Fermentação e purificação de variantes de α-amilase

Uma cepa de *B. subtilis* abrigando o plasmídeo de expressão relevante pode ser fermentada e purificada como se segue: a linhagem é riscada em uma placa de ágar LB com canamicina 10 µg/ml do estoque a -80°C, e cultivada durante a noite a 37°C. As colônias são transferidas para 100 ml de meios suplementados PS-1 com cloranfenicol 10 micro g/ml em um frasco de agitação de 500 ml. A cultura é agitada a 37°C em 270 rpm por 5 dias.

Composição do meio PS-1:

	Açúcar cristal	100 g/l
	Farinha de Soja	40 g/l
	Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O	10 g/l
5	Pluronic™ PE 6100	0,1 g/l
	CaCO ₃	5 g/l

Células e fragmentos celulares são removidos do caldo de fermentação por centrifugação a 4500 rpm por 20 a 25 minutos. Posteriormente o sobrenadante é filtrado para obtenção de uma solução completamente límpida. O filtrado é concentrado e lavado em um filtro UF (membrana de corte de PM 10.000) e o tampão é modificado para acetato 20 mM pH 5,5. O filtrado em UF é aplicado em uma coluna de FF S-sefarose e a eluição é realizada pela etapa de eluição com NaCl 0,2 M no mesmo tampão. O eluato é dialisado contra Tris 10 mM, pH 9,0 e aplicado em uma coluna de FF Q-sefarose e eluído com um gradiente linear de NaCl 0 a 0,3 M em mais de 6 volumes coluna. As frações contendo atividade (medida pelo ensaio de Phadebas) são agrupadas, o pH foi ajustado para pH 7.5 e cor remanescente foi removida por um tratamento com 0,5% p/vol. de carvão vegetal ativado por 5 minutos.

20 D. Determinação de atividade específica

A atividade específica é determinada usando o ensaio PHADEBAS® (Pharmacia) como atividade/mg de enzima. As instruções do fabricante são seguidas (ver também abaixo "Ensaio de Atividade para α -Amilase").

E. Determinação de ponto isoelétrico

25 O pI é determinado por focagem isoelétrica (*por exemplo*, Pharmacia, Ampholine, pH 3,5 a 9,3).

F. Determinação de estabilidade

A estabilidade de amilase pode ser medida usando o método como se segue:

30 A enzima é incubada sob condições relevantes. Amostras são tomadas em vários pontos de tempo, *por exemplo*, após 0, 5, 10, 15 e 30 minutos e diluídas 25 vezes (a mesma diluição para todas as amostras to-

madras) em tampão de ensaio (tampão Britton 50 mM pH 7,3) e a atividade é medida usando o ensaio Phadebas (Pharmacia) sob condições padrão pH 7,3, 37°C.

5 A atividade medida antes da incubação (0 minuto) é usada como referência (100%). O declínio em percentual é calculado como uma função do tempo de incubação. A tabela mostra a atividade residual depois, *por exemplo*, 30 minutos da incubação.

G. Ensaio para atividade de α -amilase

1. Ensaio PHADEBAS®

10 A atividade de α -amilase é determinada por um método que emprega comprimidos de PHADEBAS® como substrato. Os comprimidos de Phadebas (Teste de Amilase PHADEBAS®, fornecido por Pharmacia Diagnostic) contêm um polímero de amido reticulado de cor azul insolúvel, que foi misturado com albumina sérica bovina e uma substância tamponada e prensado.

15 Para cada medida simples, um comprimido é suspenso em um tubo contendo 5 ml de tampão Britton-Robinson 50 mM (ácido acético 50 mM, ácido fosfórico 50 mM, ácido bórico 50 mM, CaCl_2 0,1 mM, pH ajustado ao valor de interesse com NaOH). O teste é realizado em um banho de água
20 à temperatura de interesse. A α -amilase a ser testada é diluída em x ml de tampão Britton-Robinson 50 mM. 1 ml desta solução de α -amilase é adicionado aos 5 ml de tampão Britton-Robinson 50 mM. O amido é hidrolisado pela α -amilase fornecendo fragmentos azuis solúveis. A absorvância da solução azul resultante, medida espectrofotometricamente em 620 nm, é uma
25 função da atividade de α -amilase.

É importante que a medida de absorvância em 620 nm após 10 ou 15 minutos de incubação (tempo de teste) esteja na faixa de 0,2 a 2,0 unidades de absorvância em 620 nm. Nesta faixa de absorvância há linearidade entre atividade e absorvância (lei de Lambert-Beer). A diluição da en-
30 zima, por isso, deve ser ajustada para se adequar a este critério. Sob um conjunto especificado de condições (temp., pH, tempo de reação, condições de tamponamento) 1 mg de uma dada α -amilase hidrolisará certa quantida-

de do substrato e uma cor azul será produzida. A intensidade da cor é medida em 620 nm. A absorvância medida é diretamente proporcional à atividade específica (atividade/mg de proteína α -amilase pura) da α -amilase em questão sob o dado conjunto de condições.

5 2. Método alternativo

Atividade de α -amilase é determinada por um método que emprega o substrato PNP-G₇. PNP-G₇ que é uma abreviatura de p-nitrofenil- α , D-maltoheptaosídeo é um oligossacarídeo bloqueado que pode ser clivado por uma endo-amilase. Após clivagem, a α -Glicosidase incluída no conjunto digere o substrato para liberar uma molécula de PNP livre que tem uma cor amarela e dessa forma pode ser medida por espectrofotometria visível em $\lambda=405$ nm (400 a 420 nm). Conjuntos contendo substrato PNP-G₇ e α -Glicosidase são produzidos por Boehringer-Mannheim (No. de cat. 1054635).

Para preparar a solução, 10 ml de reagente da solução de substrato/tampão são adicionados a 50 ml de solução de enzima/tampão como recomendado pelo fabricante. O ensaio é realizado pela transferência de 20 μ L de amostra para uma placa de microtítulo de 96 poços e incubação a 25°C. 200 μ L de solução de reagente pré-equilibrada a 25°C são adicionados. A solução é misturada e pré-incubada 1 minuto e a absorção é medida a cada 30 segundos mais de 4 minutos em DO 405 nm em um leitor de ELISA.

A inclinação da curva de absorção dependente do tempo é diretamente proporcional à atividade da α -amilase em questão sob o dado conjunto de condições.

H. Determinação de sensibilidade de LAS

A variante é incubada com diferentes concentrações de LAS (alquilsulfonato de benzeno linear; Nansa 1169/P) por 10 minutos a 40°C. A atividade residual é determinada usando o método de ensaio PHADEBAS® ou o método alternativo empregando o substrato PNP-G₇. LAS é diluído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,5. As seguintes concentrações são usadas: 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 50 ppm, 25 ppm e 10 ppm em nenhum LAS.

A variante é diluída em diferentes tampões de LAS à concentração de 0,01 a 5 mg/l em um volume total de 10 ml e incubada por 10 minutos em banho de água a uma temperatura controlada. A incubação é parada pela transferência de uma pequena alíquota no tampão de ensaio frio. É importante que durante a medida de atividade, a concentração de LAS esteja abaixo de 1 ppm, para não afetar a medida de atividade.

Então a atividade residual é determinada em duplicata usando o ensaio PHADEBAS® acima mencionado ou o método alternativo. A atividade é medida após subtração do branco. A atividade sem LAS é 100%.

10 G. Determinação da atividade de fitase (FTU)

A atividade de fitase (FTU) é medida pela liberação de fosfato inorgânico. O fosfato inorgânico forma um complexo amarelo com o reagente molibdato/vanadato ácido e o complexo amarelo é medido em um comprimento de onda de 415 nm em um espectrofotômetro e o fosfato inorgânico liberado é quantificado com uma curva padrão de fosfato. Uma unidade de fitase (FTU) é a quantidade de enzima que libera 1 micromol de fosfato inorgânico de fitato por minuto sob dadas condições de reação no Padrão Europeu (CEN/TC 003270XX 327.2005-TC327WI).

H. Determinação de conteúdo de ácido fítico

20 Para determinar o conteúdo de ácido fítico, ácido fítico foi extraído da amostra pelo ajuste do pH da pasta fluida 5% (se é amostra seca) ao pH 10 e então determinado por um método de HPLC usando uma coluna de troca iônica. O ácido fítico foi eluído da coluna usando um sistema de gradiente de NaOH. O conteúdo de ácido fítico no líquido então foi calculado por
25 comparação a um padrão de ácido fítico.

As presentes composições e métodos são descritos em detalhes adicionais nos seguintes exemplos que não são de nenhum modo destinados a limitar o escopo. Todas as referências citadas são neste pedido especificamente incorporadas por referência para tudo que é descrito nele.

30 EXEMPLOS

Na revelação e seção experimental que se segue, as seguintes abreviaturas aplicam-se: % em peso (percentual em peso); °C (graus Centí-

grados); H₂O (água); dH₂O (água deionizada); dH₂O (água deionizada, filtração em Milli-Q); g ou gm (gramas); µg (microgramas); mg (miligramas); kg (quilogramas); µL e µl (microlitros); mL e ml (mililitros); mm (milímetros); µm (micrômetro); M (molar); mM (millimolar); µM (micromolar); U (unidades); PM (peso molecular); s (segundos); min(s) (minuto/minutos); h(s) (hora/horas); OD (oxigênio dissolvido); P/V (peso por volume); P/P (peso por peso); V/V (volume por volume); IKA (IKA Works Inc 2635 North Chase Parkway SE, Wilmington, NC); Genencor (Danisco US Inc, Genencor Division, Palo Alto, CA); Ncm (Newton por centímetro) e ETOH (etanol). eq (equivalentes); N (Normal); ds ou DS (conteúdo de sólidos secos), SAPU (unidade de protease ácida espectrofotométrica, em que em 1 SAPU é a quantidade de atividade de enzima protease que libera um micromol de tirosina por minuto a partir de um substrato de caseína sob condições de ensaio) e GAU (unidade de glicoamilase, que é definida como a quantidade de enzima que produzirá 1 g de açúcar reduzido calculado como glicose por hora a partir de um substrato de amido solúvel em pH 4,2 e 60°C).

Exemplo 1. Construção de Variantes

Variantes na sequência madura de AmyS foram construídas usando a abordagem sítio-dirigida. Por exemplo, variantes da posição S242 foram construídas como se segues:

O molde para mutagênese foi pHPLT-AmyS metilada (ver figura 2) usando dam-Metilase de New England Biolabs (Massachusetts). Iniciadores degenerados (S242F (sentido direto) e S242R (reverso), dados abaixo) foram sintetizados e diluídos a 10 µM em Operon (Huntsville, AL) com sequências de senso direto e reverso complementares ambas contendo um fosfato 5' para ligação na reação. A sequência da α-amilase parental é mostrada como SEQ ID NO: 2. As bibliotecas foram criadas com o conjunto Stratagene QUIK-CHANGE™ Multi-site (Stratagene, La Jolla CA) usando iniciadores oligonucleotídicos randomizados com NN (G/C) na posição alvo. O aminoácido selecionado (*por exemplo*, S242) foi randomicamente substituído com as 19 alternativas possíveis.

Iniciadores S242 para mutagênese:

S242 F: 5'-[Fos]GTCAAGCATATTAAGTTCNNSTTTTTTCCTGATTGGTTG-3' SEQ ID NO: 17

S242 R: 5'-[Fos]CAACCAATCAGGAAAAAASNNGAACTTAATATGCTTGAC-3' SEQ ID NO: 18

5 A reação foi realizada como se segue:

Reação de Quik-Change:

A reação consistiu em 18 µL de H₂O destilada estéril, 2,5 µL de tampão 10x do conjunto, 1 µL de dNTPs do conjunto, 1,25 µL dos iniciadores de sentido direto (de estoque 10 uM), 1,25 µL dos iniciadores de sentido re-
10 verso (de estoque 10 uM), 1 µL de DNA plasmidial pHPLT-AmyS como molde (~70 ng), e 1 µL da mistura de enzima do conjunto em um total de 26,5 µL.

Condições de ciclagem:

As condições de ciclagem foram 95°C por 1 minuto uma vez, en-
15 tão 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 65°C por 10 minutos por 25 ciclos. Um µL de Dpn I (10 U/µL) foi adicionado à mistura de reação de Quik-Change Multi-site e incubado a 37°C por 18 horas e em seguida outros 0,5 µl foram adicionados por 3 horas adicionais.

Um µL da reação digerida de DpnI foi usado como molde para
20 amplificação de ciclo rolante com o conjunto de amplificação Templiphi (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) e a reação foi realizada de acordo com o protocolo da Amersham. Um µL de DNA de ciclo rolante foi transformado em 100 µL de células competentes do *Bacillus subtilis* (duas proteases deletadas na cepas de *B. subtilis* ($\Delta aprE$, $\Delta nprE$, $amyE::xylRPxylAcomK-phleo$)) e agitadas a 37°C por 1 hora. A transformação completa foi depois
25 plaqueada em placas de LA + 10 ppm de Neo + amido insolúvel 1% (25 µL uma placa, 75 µL em outra placa) e incubados durante a noite a 37°C. 96 transformantes foram escolhidos em 150 µL de LB + 10ppm de Neo em uma placa de microtítulo e cultivados durante a noite a 37°C. A placa noturna foi
30 prensada sobre uma grande placa de LA + 10ppm de Neo + amido insolúvel 1% com um instrumento de replicação de 96 pinos e submetida à Quintara Biosciences (Berkeley, CA, EUA) para PCR e sequenciamento da colônia.

Após as sequências de variantes serem determinadas, as variantes foram escolhidas em placas de microtítulo de 96 poços contendo 125 µL de LB + 10 ppm de Neo, ordenando as variantes em um formato de quadrado com controles. A placa de microtítulo ordenada foi cultivada por 6 horas a 37°C e 250 rpm. Usando um instrumento de replicação (Enzyscreen, Leiden, Holanda), a placa de microtítulo de cultura foi usada para inocular uma nova placa de microtítulo (placa de microtitulação e tampas de placa da Enzyscreen, Leiden, Holanda) contendo 150 µL do meio MBD para expressão proteica (G. Vogtentanz et al, A *Bacillus subtilis* fusion protein system to produce soybean Bowman-Birk protease inhibitor, Prot. Expr. & Purif., 55 (2007) 40-52) e suplementados com CaCl₂ 5 mM para expressão proteica. As placas de expressão foram cultivadas por 64 horas a 37°C, 250 rpm, e umidade 70%. As culturas de expressão foram a seguir filtradas por uma placa de microfiltro (0,22 µm, Millipore, Billerica, MA) e rastreadas para termoestabilidade melhorada (ver Exemplo 3).

Bibliotecas de AmyS

Bibliotecas de avaliação de sítio foram produzidas para as seguintes variantes de AmyS:

P17, D19, T21, N28, S51, G72, V74, A82, Q86, Q89, A93, W115, D117, P123, S124, D125, N127, I130, G132, Q135, P145, G146, G148A, S153A, Y159, W166, S169, K171, R179, G180, I181, G182, K183, W187, G194, P209, N224, S242, P245, G256, D269, N271, T278, N281, G302, A304, R308, T321, Q358, P378, S382, K383, T398, H405, T417, E418, P420, G421, P432, W437, Q443, G446, G454, S457, T459, T461, S464, G474, R483.

Exemplo 2. Expressão, purificação e caracterização de variantes

As colônias foram riscadas a partir das placas de microtítulo do Exemplo 1 e postas sobre placas de amido com 10 ppm de Neomicina. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C e colônias únicas foram escolhidas e usadas para inocular frascos de agitação (250 mL com 25 mL de meios) contendo meios (ver abaixo) e 20 ppm de Neomicina. Estas foram crescidas a 37°C, 275 rpm, por aproximadamente 8 h (até uma DO (600 nm)

de 2,0 ser alcançada). Imediatamente após, os caldos de cultura foram misturados com glicerol 50% na razão 2:1, colocados em frascos de cultura individualmente marcados e congelados a -80°C. Foi a partir destes estoques de glicerol que a produção subsequente das amilases selecionadas foi feita.

5 Fermentações de amilases foram realizadas em frascos de agitação de 500 mL cultivados a 37°C por 60 horas em meio de cultura MOPS mínimo (Neidhardt *et al.*, *J. Bacteriol.* (1974) 119 (3):736-747) com Soytone 1% (p/v). As enzimas foram purificadas do caldo de fermentação usando cromatografia de interação hidrofóbica. Em resumo, o caldo foi concentrado
10 10 vezes então diluído novamente com MES 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 6,8 com sulfato de amônio 1M e filtrado esterilmente usando filtro de fibra de vidro. As amostras foram então carregadas na coluna FF de alta densidade de fenil sefarose (20 x 95 mm; Amersham, GE Healthcare Bio-Sciences, Suécia) pré-equilibrada com o mesmo tampão. As proteínas não amilase foram
15 lavadas com 10 volumes coluna do mesmo tampão sem sulfato de amônio seguido por 5 volumes coluna de água. Finalmente, as enzimas de interesse foram eluídas com MES 50 mM, CaCl₂ 2 mM, pH 6,8 contendo propilenoglicol 40%.

As concentrações proteicas foram determinadas por um método
20 de densitometria em gel de SDS Page quantitativo padrão ou por um ensaio de atividade usando um conjunto de ensaio de amilase padrão da Megazyme (Wicklow, Irlanda). Os ensaios foram convertidos usando uma curva padrão gerada usando amilase purificada (amilase de *Bacillus* 707; SEQ ID NO: 6).

25 Exemplo 3. Determinação de Propriedades Alteradas: estresse térmico

Este exemplo mostra que as variantes descritas neste pedido podem ter uma propriedade alterada em relação à α -amilase parental. Um rastreamento de alto rendimento para estabilidade térmica de variantes de α -amilase de *G. stearothermophilus* (AmyS) foi realizado.

30 Condições de estresse térmico foram investigadas e escolhidas tal que após estresse térmico, a enzima selvagem inicial mostrou aproximadamente 40% de sua atividade sem estresse (*isto é*, atividade após estresse

térmico/atividade antes de estresse térmico era aproximadamente 0,4). As bibliotecas de mutantes foram rastreadas em quadruplicata e os ganhadores favorecidos foram identificados como aqueles que mostraram atividade residual após estresse térmico que foi pelo menos dois desvios padrão maior que a atividade residual média da enzima selvagem inicial.

A expressão de amilase foi aproximadamente 100 ppm nos sobrenadantes de cultura das placas de expressão. Após 60 a 65 horas de crescimento a 37°C em um agitador umidificado (250 rpm e umidade relativa 70%), os sobrenadantes de cultura foram clarificados para remoção de materiais celulares usando placas de filtro. Os sobrenadantes clarificados foram diluídos 10 vezes em tampão contendo NaOAc 50 mM/CaCl₂ 2,6 mM/Tween-20 0,002%, pH 5,8, a uma concentração final de aproximadamente 10 ppm. Uma alíquota do sobrenadante foi ainda diluída a 0,02 ppm, e a atividade das variantes de enzima foi determinada como descrito abaixo usando um substrato de amido de milho fluorescentemente marcado. Uma segunda alíquota do sobrenadante foi submetida a estresse térmico por 30 minutos a 95°C em um termociclador antes de ser diluída a 0,02 ppm em NaOAc 50 mM/CaCl₂ 2,6 mM/Tween-20 0,002%, pH 5,8 e analisada para atividade residual usando o mesmo substrato fluorescente e ensaio descrito abaixo.

A atividade de amilase foi determinada usando o ensaio de amilase EnzCheck essencialmente como descrito pelo fabricante (Invitrogen, San Diego CA). A concentração final da amilase no ensaio foi aproximadamente 0,02 ppm. O tampão de ensaio foi NaOAc 50 mM/CaCl₂ 2,6 mM/Tween-20 0,002%, pH 5,8. O substrato foi o corante de fluorescência BODIPY conjugado ao amido de milho DQ™ 100 µg/mL (Invitrogen - Eugene, OR). Fluorescência aumentada, indicando atividade de amilase, foi medida usando um Spectomax M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A reação foi monitorada à temperatura ambiente por 5 minutos com o registro de instrumento no modo cinético. O comprimento de onda de excitação foi 485 nm; a emissão foi monitorada em 520 nm com um filtro de corte em 515 nm.

AmyS selvagem (SPEZYME® Xtra) mostrou atividade residual de 33 a 43% após ser submetida a estresse térmico por 30 minutos a 95°C. As

variantes de AmyS, S242A e S242Q, conservaram atividades residuais de 55 a 65% e de 70 a 80%, respectivamente, após as mesmas condições de estresse térmico. Ver figura 3 e Tabela 3-1. Estas medidas de atividade residual indicam que as duas variantes são mais termoestáveis que α -amilase selvagem. Algumas variantes estavam faltando nas bibliotecas e são indicadas pela letra de posição tachada. Em seu lugar, a selvagem (SPEZYME® Xtra) foi colocada em lugar; (WT) indica que a selvagem foi colocada em vez destas. Cada placa inclui SPEZYME® Xtra (marcada como Z) como um controle.

10 TABELA 3-1. Atividades residuais percentuais de cada amostra das variantes.

Variantes	% Atividade residual				Média	Desv pad	%CV
A	60,6	59,8	56,5	64,6	60,4	3,3	5
C	38,1	35,6	28,3	34,5	34,1	4,2	12
D	50,6	42,9	45,0	48,7	46,8	3,5	7
E (WT)	45,3	38,6	39,5	40,7	41,0	3,0	7
F (WT)	40,5	40,2	41,2	38,9	40,2	1,0	2
G	36,4	35,7	44,8	36,7	38,4	4,3	11
H (WT)	34,9	36,9	37,0	42,1	37,7	3,0	8
I	20,9	26,7	27,5	17,2	23,1	4,9	21
K	22,6	21,5	19,3	24,5	22,0	2,2	10
L	34,9	30,7	34,5	30,7	32,7	2,3	7
M	35,3	37,3	38,3	41,3	38,1	2,5	7
N (WT)	43,9	43,2	46,0	42,2	43,8	1,6	4
P (WT)	33,8	35,6	40,2	37,4	36,8	2,7	7
Q	80,6	71,0	75,9	71,5	74,8	4,5	6
R	9,6	4,5	6,1	5,4	6,4	2,2	35
S (WT)	38,6	39,9	37,2	37,3	38,3	1,3	3
T	36,8	31,5	35,1	27,8	32,8	4,0	12
V	25,0	24,7	25,0	22,9	24,4	1,0	4
W (WT)	32,7	37,5	36,3	38,8	36,3	2,6	7
Y (WT)	37,1	42,6	46,0	38,6	41,1	4,0	10
Z (Xtra)	38,8	41,5	42,5	32,7	38,9	4,4	11

Exemplo 4. Determinação das propriedades alteradas por DSC

SPEZYME® Xtra, S242A e S242Q foram purificadas do caldo de

fermentação do frasco de agitação (ver Exemplo 2) usando cromatografia de interação hidrofóbica. A proteína foi eluída da coluna na forma purificada usando MES 50 mM, pH 6,8, contendo propilenoglicol 40% e CaCl_2 2 mM.

Curvas de capacidade térmica excessiva foram medidas usando o microcalorímetro de varredura ultrassensível de alto rendimento, DSC VP-Cap (MicroCal, Inc, Northampton, MA). O procedimento padrão de medidas de DSC e a teoria da técnica são anteriormente publicados (Freire, E. (1995) *Differential Scanning Calorimetry Methods. Mol. Biol.* 41, 191-218). Aproximadamente 500 μL de α -amilase de *Bacillus stearothermophilus* selvagem 0,5 mg/ml ou das variantes S242S e S242Q (na ausência e presença de cloreto de cálcio 2 mM) foram varridos ao longo da faixa de temperatura de 30 a 120°C. A mesma amostra então foi revarrida para verificar a reversibilidade do processo. Para α -amilase, o processo de desdobramento térmico foi irreversível. O tampão usado foi acetato de sódio 10 mM, pH 5,5. Uma taxa de varredura de 200°C/h foi usada para minimizar qualquer artefato que possa resultar da agregação. O valor médio térmico (T_m) das curvas de DSC foi usado como um indicador da estabilidade térmica. A tabela 4-1 mostra os pontos de fusão térmica das proteínas de amilase testadas. As curvas de fusão térmica e os pontos de fusão da amilase selvagem e variantes são mostradas na figura 5.

O desdobramento térmico das variantes de amilase S242A e S242Q na ausência e na presença de cloreto de cálcio 2 mM mostra aumento considerável nos pontos de fusão das variantes em comparação com aqueles da selvagem. Na ausência de cloreto de cálcio adicionado, a amilase selvagem tem um ponto de fusão térmica de 100,8°C enquanto a T_m de S242A e S242Q é 106,5°C e 110,1°C, respectivamente. Dessa forma, a substituição de S242 por A resulta em um aumento na T_m de 5,7°C, e a substituição de S242 por Q resulta em um aumento na T_m de 9,3°C.

Na presença de cloreto de cálcio 2 mM, a amilase selvagem caracterizada tem um ponto de fusão térmica de 106,8°C enquanto a T_m de S242A e S242Q é 111,8°C e 113,8°C, respectivamente. Dessa forma, na presença de cloreto de cálcio 2 mM as três proteínas exibiram valores de T_m

aumentados. O aumento no T_m da selvagem e das variantes S242A foi 6°C e 5,3°C, respectivamente. O aumento no T_m das variantes S242Q foi 3,7°C. Isto sugere que as variantes S242Q sejam menos estabilizadas por cálcio ou sejam menos dependentes de cálcio para estabilidade. O aumento no T_m de S242A e S242Q em relação à selvagem na presença de cloreto de cálcio foi 5°C e 3°C, respectivamente. Isto sugere que as propriedades termodinâmicas das variantes se diferenciem daquelas de SPEZYME® Xtra, e são compatíveis com seu desempenho aumentado em estudos aplicados (ver Exemplo 5).

10 Tabela 4-1

	T_m (sem Ca_2^+)	T_m (c/2 mM Ca_2^+)
SPEZYME® Xtra	100,8	106,8
S242A	106,5	111,8
S242Q	110,1	113,8

Exemplo 5. Perfis de Atividade

Este exemplo mostra que as variantes testadas têm perfis de atividade alterados em relação não somente à α -amilase parental, mas também a um padrão da indústria. Determinações proteicas foram feitas em amostras purificadas ou de placa. Todas as variantes experimentais e α -amilases padrão foram dosadas em concentrações proteicas iguais.

As variantes da placa ou purificadas foram diluídas em aproximadamente 20 ppm usando pH 5,6 tampão ácido málico. O substrato consistiu de amido de milho 15% no mesmo tampão ácido málico 50 mM, pH 5,6. 400 μL da suspensão de amido foram equilibrados a 70°C por 2,5 minutos. Então 7 μL de enzima diluída foram rapidamente adicionados ao amido equilibrado (concentração proteica final de aproximadamente 0,36 ppm). A mistura de reação então foi posta em um bloco de aquecimento de agitação preaquecido a 85°C e misturado a 300 rpm. Em intervalos de tempo predeterminados, as reações foram extintas com 50 μL de NaOH 125 mM. Os tubos de reação então foram centrifugados e o sobrenadante foi diluído 10 vezes em NaOH 10 mM, para ser analisado para o perfil de DP por HPAEC-PAD.

As reações foram configuradas para 4, 10 e 20 minutos. A área

total de DP2 ao fim do HPLC dirigido foi integrada e a área foi dividida pela proteína total e tempo de reação.

A reação de 4 minutos fornece uma indicação do quão rapidamente a enzima começa a decompor o substrato; a reação de 10 minutos fornece uma indicação da atividade térmica da enzima, e a reação de 20 minutos fornece uma indicação da estabilidade térmica da enzima. Os resultados são fornecidos nas figuras 7 e 8.

Exemplo 6. Liquefação no Viscômetro

Este exemplo mostra que as variantes S242A e S242Q do Exemplo 3 que tinham atividade residual alterada em relação à parental selvagem também têm desempenho alterado em relação à α -amilase parental. As α -amilases variantes do Exemplo 2 foram purificadas e caracterizadas para atividade proteica e específica total antes de seu teste na aplicação.

A redução da viscosidade da farinha de milho devido à ação da α -amilase foi monitorada usando um instrumento HAAKE Viscotester 550. A pasta fluida de substrato é feita fresca diariamente em modo de batelada com farinha de milho com 30% de sólidos secos. O pH foi ajustado a 5.8 usando ácido sulfúrico. 50 g da pasta fluida (15 g de sólidos secos) são pesados e pré-incubados, com agitação, por 10 minutos para aquecer até 70°C. Com a adição de α -amilase, a temperatura é imediatamente aumentada de 70°C para 85°C com uma velocidade de rotação de 75. Uma vez que a temperatura da mistura de pasta fluida e enzima alcança 85°C, sua temperatura é considerada constante e a viscosidade é monitorada por 30 minutos adicionais. A viscosidade foi medida ao longo da corrida e é relatada em μ Nm. AmyS Selvagem, S242A e S242Q foram todas dosadas em concentrações proteicas iguais (20 ou 30 μ g/50 g de pasta fluida de farinha de milho).

O teste de viscosímetro aplicado resultou em ambas variantes de AmyS, S242A e S242Q, tendo melhor desempenho do que as marcas de referência de α -amilases - LIQUOZYME® SC e SPEZYME® Xtra. Ambas as variantes exibem a menor viscosidade de pico característica de SPEZYME® Xtra e menor viscosidade final de LIQUOZYME® SC. Quando carregadas em concentração menor que 20 μ g de proteína total, as diferenças de menor

viscosidade de pico das variantes em comparação com aquela de LI-QUOZYME® SC são ainda aumentadas. Ver figuras 9, 10 e 11.

Exemplo 7. Liquefação em um Forno de Jato de Vapor

O milho completo triturado foi transformado em pasta fluida a 32% (sólidos seco de milho) pasta fluida usando uma razão 70:30 de água para vinhaça diluída. O pH da pasta fluida foi ajustado ao pH 5,8 com NaOH 10 N. A pasta fluida foi aquecida a 70°C (158°F) usando água e vapor em uma caldeira revestida. As enzimas de liquefação (SPEZYME® Xtra, LI-QUOZYME® SC ou S242Q) foram adicionadas e a pasta fluida foi aquecida a 85°C (185°F) por aproximadamente 10 minutos. Após 10 minutos adicionais de incubação a 85°C, a pasta fluida foi passada pelo forno de jato de vapor mantido a 107°C (225°F) com um tempo de retenção 3 minutos usando um grande jato de vapor de planta piloto (equipado de um hidroaquecedor M103 de Hidro-Thermal Corp., Waukesha, Wisconsin). O liquefeito foi coletado do jato e colocado em um banho de água a 85°C. Uma segunda dose de enzima de liquefação foi adicionada pós-jato. O liquefeito foi continuamente agitado e mantido a 85°C por 90 minutos. As amostras foram coletadas em 0, 30, 60 e 90 minutos. Todas as amostras foram testadas pós-jato para DE (usando o método de Schoorls; método disponível no pedido), e para viscosidade (viscômetro tipo Brookfield (Lab-line Instruments Inc de Melrose Park, Illinois) girando de 3 a 20 rpm). A dosagem de enzimas de liquefação pré- e pós-jato é indicada nas seguintes figuras como "X + Y" onde X representa o número de unidades da enzima adicionada antes do jato, e Y representa o número de unidades adicionadas ao liquefeito após passar pelo forno de jato. Os resultados são mostrados nas figuras 12 e 13.

Exemplo 8. Efeito da remoção da inibição de ácido fítico na termoestabilidade da α -amilase

Neste exemplo, o efeito da remoção da inibição de ácido fítico na termoestabilidade das α amilases termoestáveis liquidificantes foi examinado.

A. Nenhum forno de jato de vapor (dose enzimática única)

Uma pasta fluida de milho completo triturado (obtido de Badger

State Ethanol, Monroe, WI, EUA) foi feita com água contendo vinhaça diluída 30% v/v a uma concentração final de aproximadamente 32% ds. Os sólidos de milho foram preparados em uma caldeira elevada. A pasta fluida foi bem misturada e o pH da pasta fluida foi medido (pH 5,2) e foi usada sem ajuste adicional de pH. Esta pasta fluida foi misturada em uma caldeira revestida e trazida até a temperatura de pré-tratamento de 70°C. Somente antes de alcançar 70°C, a enzima liquidificante, isto é, uma α -amilase (4 AAU por grama de ds de milho), e fitase (4 FTU por grama de ds de milho) foi adicionada e um cronômetro foi iniciado para começar a etapa de incubação ou liquefação primária. Permitiu-se que a pasta fluida fosse incubada por 30 minutos na presença da amilase com ou sem fitase adicionada. A fitase usada neste experimento foi BP-17 (ver, *supra*). Embora a fitase fosse adicionada ao mesmo tempo que a α -amilase neste exemplo pode ser adicionada antes da amilase.

A pasta fluida tratada então foi colocada em um banho de água mantido a 90°C para começar a etapa de liquefação secundária (2ª liquefação). As amostras foram tomadas para teste da viscosidade (por Brookfield) e DE (por Schoorls) em 0, 30, 60 e 90 minutos. Os resultados são mostrados nas figuras 14 e 15.

B. Com forno de jato de vapor (dose enzimática dividida)

Uma pasta fluida de milho completo triturado (obtido de Badger State Ethanol, Monroe, WI) foi feita com água contendo vinhaça diluída 30% v/v a uma concentração final de aproximadamente 32% ds. Os sólidos de milho foram preparados em uma caldeira elevada. A pasta fluida foi bem misturada e o pH da pasta fluida foi medido (pH 5,2). Esta pasta fluida foi misturada em uma caldeira revestida e trazida até a temperatura de pré-tratamento de 70°C. Somente antes de alcançar 70°C, a enzima liquificante, isto é, uma variante de α -amilase S242Q (3 AAU por grama de ds de milho), foi adicionada e um cronômetro foi iniciado para começar a etapa de incubação ou liquefação primária. Permitiu-se que a pasta fluida fosse incubada por 30 minutos na presença da α -amilase com ou sem fitase adicionada (4 FTU por grama de ds de milho). Embora a fitase fosse adicionada ao mesmo

tempo que a α -amilase neste exemplo pode ser adicionada antes da amilase.

A pasta fluida incubada então foi passada por um forno de jato de vapor (225°F; 107,2°C) que foi pré-aquecido à temperatura desejada usando vapor e água. A pasta fluida foi enviada através do jato à velocidade máxima (configuração 1,5) aproximadamente 4 litros/minuto. Usando os três primeiros ciclos da bobina de conservação resultou em um tempo de retenção de um pouco mais de 3 minutos. Após toda a água ser deslocada e a temperatura desejada mantida constante, uma alíquota da massa de milho solubilizada foi coletada e colocada em um banho secundário (agitação superior) a 85°C para começar a etapa de liquefação secundária (2ª liquefação). Uma segunda dose da S242Q (1 AAU/g de ds) foi adicionada e a liquefação continuada por 90 minutos adicionais. As amostras foram tomadas para teste da viscosidade (por Brookfield) e DE (por Schoorls) em 0, 30, 60 e 90 minutos. Este liquefeito foi usado no Exemplo 10B.

C. Cozimento em jato de vapor, convencional

Uma pasta fluida de milho completo triturado (obtido de Badger State Ethanol, Monroe, Monroe, WI) foi feita com água contendo vinhaça diluída 30% v/v a uma concentração final de aproximadamente 32% ds. Os sólidos de milho foram preparados em uma caldeira elevada. A pasta fluida foi bem misturada e o pH da pasta fluida foi medido (pH 5,2) e ajustado ao pH 5,8 com NaOH diluído. Esta pasta fluida foi misturada em uma caldeira revestida e trazida até a temperatura de pré-tratamento de 70°C. Somente antes de alcançar 70°C, a enzima liquidificante, isto é, uma variante de α -amilase S242Q (3 AAU por grama de ds de milho), foi adicionada e um cronômetro foi iniciado para começar a etapa de incubação ou liquefação primária. Permitiu-se que a pasta fluida fosse incubada por 30 minutos na presença da α -amilase sem fitase adicionada.

A pasta fluida incubada então foi passada por um forno de jato de vapor (225°F; 107,2°C) que foi pré-aquecido à temperatura desejada usando vapor e água. A pasta fluida foi enviada através do jato com velocidade máxima (configuração 1,5) aproximadamente 4 litros/minuto. Usando os

três primeiros ciclos da bobina de conservação resultou em um tempo de retenção de 3 minutos. Após toda a água ser deslocada e a temperatura desejada mantida constante, uma alíquota da massa de milho solubilizada foi coletada e colocada em um banho secundário (agitação superior) a 85°C para começar a etapa de liquefação secundária (2ª liquefação). Uma segunda dose da α -amilase variante S242Q (1 AAU/g de ds) foi adicionada e a liquefação continuada por 90 minutos adicionais. As amostras foram tomadas para teste da viscosidade (por Brookfield) e DE (por Schoorls) em 0, 30, 60 e 90 minutos. O experimento acima em um pH de pasta fluida de 5,5. Ver figura 22. Este liquefeito foi usado no Exemplo 10A.

D. Resultados com e sem forno de jato de vapor

A adição da fitase BP-17 durante a incubação (liquefação primária) reduziu o conteúdo de ácido fítico do milho completo triturado de 0,60% ds de milho a 0,09% ds de milho (redução de >85%) (figura 21). É também muito claro, a partir das figuras 14 e 15, que a α -amilase foi inativada em uma temperatura de forno de jato de vapor de 107°C (225°F) com base no desenvolvimento de DE ou redução de viscosidade. Entretanto, a inclusão da fitase antes do forno de jato de vapor (que se acredita remover a inibição de ácido fítico) resultou em um aumento significativo na termoestabilidade das α -amilases como mostrado por progressão de DE e redução de viscosidade a 90°C durante a etapa de liquefação secundária. Resultados similares foram vistos com forno de jato de vapor (dados não mostrados) como mostrado nas figuras 14 e 15.

Exemplo 9. Efeito da Concentração de Fitase BP-17 sobre a estabilidade da α -amilase em baixo pH

O aumento na termoestabilidade da α -amilase devido à remoção da inibição de ácido fítico da α -amilase foi ainda estudado. O ácido fítico foi hidrolisado usando fitase antes da liquefação secundária do milho completo triturado e a melhora na estabilidade de pH em pH baixo foi determinada.

Em um experimento típico, o milho completo triturado foi transformado em pasta fluida a 32% (ds de milho) usando uma razão 70:30 de vinhaça diluída e água. O pH da pasta fluida foi medido e encontrado ser pH

5,2. A pasta fluida foi aquecida a 70°C usando água e vapor em uma caldeira revestida. A enzima de liquefação, isto é, a α -amilase variante S242Q (4 AAU/g de ds de milho), e concentrações variadas de BP-17 (0 a 12 FTU/g de ds de milho) foram adicionadas e a pasta fluida foi pré-tratada mantendo a temperatura a 70°C por 45 minutos. Após 45 minutos de pré-tratamento, a pasta fluida foi colocada em um banho de água a 90°C. O liquefeito foi continuamente agitado e mantido a 90°C por 90 minutos. As amostras foram coletadas em 0, 30, 60 e 90 minutos. Todas as amostras foram testadas para DE (usando o método de Schoorls), e para viscosidade (viscômetro Brookfield eixo 2 de 20 rpm). Os dados de progressão de DE e de viscosidade estão resumidos nas figuras 16 e 17.

Os resultados nas figuras 16 e 17 mostram que a redução da inibição de ácido fítico da α -amilase variante S242Q resultou em um aumento significativo na estabilidade em pH baixo para atividade como evidenciado por um aumento constante na progressão de DE a 90°C com uma redução concomitante na viscosidade do liquefeito. Os dados claramente mostraram que a α -amilase variante S242Q pode ser usada com sucesso no processo de liquefação do milho completo triturado em um pH 5,2 se a inibição do ácido fítico for eliminada. Na figura 21, pode ser visto que a taxa de progressão de DE aumenta com a remoção crescente de ácido fítico e alcança um máximo em 4 FTU/g de ds indicando que a fitase aumenta a termoestabilidade da α -amilase variante S242Q pela remoção de ácido fítico da pasta fluida.

Exemplo 10. Efeito do pH

Neste exemplo, o efeito do pH sobre a α -amilase variante S242Q foi examinado.

Em um experimento típico, milho completo triturado foi transformado em pasta fluida a 32% (ds milho) usando uma razão 70:30 de vinhaça diluída e água. O pH da pasta fluida foi medido e encontrado ser pH 5,2. O pH foi reduzido a entre 4,2 e 4,8 usando H₂SO₄. A pasta fluida foi aquecida a 70°C usando água e vapor em uma caldeira revestida. A enzima de liquefação, isto é, a variante S242Q (4 AAU/g de ds), e BP-17 (4 FTU/g de ds) foram adicionadas e a pasta fluida foi pré-tratada pela manutenção da tempe-

ratura a 70°C por 45 minutos. Após 45 minutos de pré-tratamento, a pasta fluida foi colocada em um banho de água a 90°C. O liquefeito foi continuamente agitado e mantido a 90°C por 90 minutos. As amostras foram coletadas em 0, 30, 60 e 90 minutos. Todas as amostras foram testadas para DE (usando o método de Schoorls), e para viscosidade (viscômetro Brookfield eixo 2 em 20 rpm). Os dados de progressão de DE e de viscosidade são resumidos nas figuras 18 e 19.

Os resultados mostraram que a progressão de DE diminuída com a redução de pH de 5,2 para 4,5. A enzima foi completamente inativada em pH 4,2.

Exemplo 11. Efeito sobre a produção de etanol

Liquefeitos foram usados como matérias-primas de fermentação na fermentação de etanol para produção de álcool. Uma pasta fluida de milho completo triturado (obtido de Badger State Ethanol, Monroe, WI) foi misturada com água contendo vinhaça diluída 30% v/v a uma concentração final de aproximadamente de 32%.

A. Processo convencional

O liquefeito do Exemplo 8C foi usado (Liquefeito A).

O pH do liquefeito secundário foi ajustado para 4,2 usando H₂SO₄ antes do estágio de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF).

B. Baixo pH, forno de jato de vapor (dose dividida)

O liquefeito do Exemplo 8B foi usado (Liquefeito B). Nenhum ajuste de pH foi feito antes de SSF.

C. Sacarificação e fermentação simultâneas

Em cada experimento, pesos de tara dos recipientes foram obtidos antes da preparação de meios. Um liquefeito de milho DS 32% ds (2 litros) foi tomado em um frasco de 2 L. Os inóculos de levedura Red Star Ethanol Red (RED STAR(Lesaffre)) foram preparados pela adição de 10 gramas da levedura e 1 grama de glicose a 40 gramas de água sob agitação suave por uma hora. Cinco ml de cada inóculo foram adicionados a fermentadores equilibrados, seguido pela adição de G Zyme[®] 480 Ethanol (Danisco US Inc, Genencor Division) em 0,4 GAU/g de ds de milho para iniciar a saca-

rificação e fermentação simultâneas. O peso bruto inicial foi observado e o frasco foi colocado em um banho de água mantido a 32°C. As amostras foram tomadas em intervalos de tempo diferentes e analisadas para o conteúdo de etanol e carboidrato usando HPLC. As fermentações também foram realizadas usando um quilograma de cada liquefeito e a perda de peso durante a fermentação foi medida em intervalos de tempo diferentes. Com base na perda de peso devido à perda de dióxido de carbono, o álcool foi medido. No final da fermentação, um peso bruto final foi obtido. O caldo foi quantitativamente transferido em um vaso de 5 L de fundo redondo. Destilação foi realizada sob vácuo até que aproximadamente 800 ml de etanol fossem coletados em um receptáculo contendo 200 ml de água. O etanol foi diluído para 2L e foi analisado por HPLC. O peso e DS de resíduos de destilação foram obtidos antes da secagem. A análise de amido residual foi realizada em DDGS. Cálculos estequiométricos foram realizados com base na perda de peso, destilação e análise de amido residual.

Cálculo de etanol usando perda em peso de CO₂:

Produção de etanol (mmol) = perda de CO₂ (g) / 88
 Produção de etanol (g) = (perda de CO₂ (g) / 88) * 92 => perda de CO₂ (g) * 1,045
 Produção de etanol (ml) = ((perda de CO₂ (g) / 88) * 92) / 0,789 => perda de CO₂ (g) x 1,325

Os dados na figura 20 mostram a principal diferença no conteúdo de sulfato livre e ácido fítico entre o processo convencional e sem processo de ajuste de pH de acordo com a invenção. A remoção da inibição de ácido fítico da α-amilase termoestável na incubação resultou em DDGS com conteúdo de ácido fítico reduzido, de fosfato disponível livre maior e de sulfato reduzido. Dessa forma, o processo sem ajuste de pH confere estabilidade de pH em baixo pH para α-amilases termoestáveis liquidificantes na liquefação de amido.

30 Exemplo 12. Métodos Adicionais

Os seguintes ensaios foram usados nos Exemplos descritos abaixo. Qualquer desvio dos protocolos fornecidos abaixo é indicado nos E-

xemplos. Nestes experimentos, um espectrofotômetro foi usado para medir a absorvância dos produtos formados após realização das reações.

A. Determinação de Conteúdo Proteico

Ensaio de BCA (ácido bicinconínico)

5 Nestes ensaios, o ensaio de BCA (Pierce) foi usado para determinar a concentração proteica em amostras em escala de placa de microtítulo (MTP). Neste sistema de ensaio, as soluções químicas e reagente usados foram: reagente de análise de proteína BCA, e tampão de diluição Pierce (MES 50 mM, pH 6,5, CaCl_2 2 mM, TWEEN[®]-80 0,005%). O equipamento
10 usado foi um leitor de MTP SpectraMAX (tipo 340; Molecular Devices). As MTPs foram obtidas de Costar (tipo 9017).

 No teste, 200 μL de Reagente BCA foram pipetados em cada um dos poços, seguido por 20 μL de proteína diluída. Após mistura completa, as MTPs foram incubadas por 30 minutos a 37°C. As bolhas de ar foram remo-
15 vidas, e a densidade ótica (DO) da solução dentro dos poços foi lida em 562 nm. Para determinar a concentração proteica, a leitura de fundo foi subtraída das leituras da amostra. A DO_{562} foi traçada para padrões proteicos (enzima purificada), para produzir uma curva padrão. A concentração proteica das amostras foi interpolada a partir da curva padrão.

20 Ensaio de Bradford

 Nestes ensaios, o ensaio de reagente corante de Bradford (Quick Start) foi usado para determinar a concentração proteica em amostras na escala de MTP. Neste sistema de ensaio, as soluções químicas e reagente usados foram: Reagente Corante de Bradford Quick Start (BIO-
25 RAD No. Catálogo 500-0205), tampão de Diluição (NaCl 10 mM, CaCl_2 0,1 mM, TWEEN[®]-80 0,005%). O equipamento usado foi um Biomek FX Robot (Beckman) e um leitor de MTP SpectraMAX (tipo 340). As MTPs foram da Costar (tipo 9017).

 No teste, 200 μL do reagente corante de Bradford foram pipetados em cada um dos poços, seguido por 15 μL de tampão de diluição. Fi-
30 nalmente 10 μL do caldo de cultura filtrado foram adicionados aos poços. Após mistura completa, as MTPs foram incubadas por pelo menos 10 minu-

tos à temperatura ambiente. As bolhas de ar foram retiradas e as DOs dos poços foram lidas em 595 nm. Para determinar a concentração proteica, a leitura de fundo (*isto é*, de poços não inoculados) foi subtraída das leituras da amostra. Os valores de DO₅₉₅ obtidos fornecem uma medida relativa do conteúdo proteico nas amostras.

B. Ensaio de Microamostra para Teste de Desempenho Enzimático

Os detergentes usados neste ensaio não continham enzimas ou as enzimas presentes em detergentes comerciais foram destruídas por desativação térmica como descrito em outro lugar neste documento. O equipamento usado incluiu um Eppendorf Thermomixer e um leitor de MTP SpectraMAX (tipo 340). As MTPs foram obtidas de Costar (tipo 9017).

Preparação detergente (AATCC HDL; condições americanas)

Água Milli-Q foi ajustada para dureza de água de 6 gpg (Ca/Mg=3/1), e 1,5 g/l de detergente de líquido AATCC 2003 de referência padrão sem branqueador foram adicionados. A solução detergente foi energeticamente agitada por pelo menos 15 minutos. Então, HEPES 5 mM (ácido livre) foi adicionado e o pH ajustado a 8,0.

Ensaio de microamostra de amido de arroz para teste do desempenho de amilase

Os detergentes de teste foram preparados como descrito em outro lugar neste documento. O equipamento usado incluiu um agitador/incubador New Brunswick Innova 4230 e um leitor de MTP SpectraMAX (tipo 340). As MTPs foram obtidas de Corning (tipo 3641). Amido de arroz envelhecido com amostras de pigmento laranja (CS-28) foram obtidos do Center for Test Materials (Vlaardingen, Holanda). Antes de cortar microamostras circulares de 0,635 centímetros, o tecido foi lavado com água. Duas microamostras foram colocadas em cada um dos poços de uma placa de microtítulo de 96 poços. O detergente de teste foi equilibrado a 20°C (América do Norte) ou 40°C (Europa Ocidental). 190 µl da solução detergente foram adicionados a cada um dos poços da MTP, contendo as microamostras. A esta mistura, 10 µl da solução de enzima diluída foram adicionados. A MTP foi selada com folha metálica adesiva e colocada na incubadora por 1

hora com agitação a 750 rpm na temperatura de teste desejada (tipicamente 20°C ou 40°C). Após a incubação, 150 µl da solução de cada um dos poços foram transferidos para um MTP fresco. Esta MTP foi lida em 488 nm usando um leitor SpectraMax MTP para quantificar a limpeza. Controles brancos, bem como controles contendo microamostras e detergente, mas sem enzima também foram incluídos.

Cálculo de desempenho enzimático

O valor de absorvância obtido foi corrigido para o valor no branco (*isto é*, obtido após incubação de microamostras na ausência da enzima).

A absorvância resultante foi uma medida da atividade hidrolítica.

C. Determinação da concentração de amilase por titulação de anticorpo

Como descrito neste pedido, concentração de α -amilase e atividade específica foram determinadas por titulação com um anticorpo policlonal inibitório. Os anticorpos policlonais construídos para α -amilase de *Bacillus stearothermophilus* (AmyS) foram encontrados ser fortemente inibitórios de AmyS e da α -amilase TS23 de *Bacillus sp.* (*por exemplo*, a ligação é bastante forte para produzir uma titulação linear da perda de atividade). Por isso, este anticorpo pode ser usado para medida da concentração enzimática, que por sua vez é usada para calcular a atividade específica. Resumidamente, a quantidade da inibição enzimática produzida por várias concentrações conhecidas de anticorpo é medida. Desta informação, a concentração do anticorpo necessário para a inibição completa é extrapolada, que é equivalente à concentração de enzima na amostra. A atividade e inibição de α -amilase foram medidas usando ensaio fluorogênico BODIPY-amido. O tampão foi MOPS 50 mM, pH 7,0, contendo Tween-80 0,005%.

Um anticorpo policlonal direcionado contra AmyS purificada foi construído em coelho e purificado por métodos padrão. Um valor de "concentração aparente" de uma solução estoque de anticorpo foi determinada pela medida da inibição de uma amostra de AmyS de atividade específica conhecida. Então a amostra de anticorpo foi usada para determinar a concentração e atividade específica de AmyS e variantes TS23t. Estes valores foram usados para criar placas de estoque de 96 poços de enzima normali-

zadas, onde todas as variantes foram diluídas em uma concentração comum.

D. Eletroforese em gel de proteína nativa

Mobilidade eletroforética de amostras proteicas de variantes foi medida usando o sistema PhastGel (GE Healthcare) em géis pré-moldados de poliacrilamida nativa (PhastGel Homogeneous) em concentração de 7,5% ou 12,5%. Tiras de tampão (PhastGel Native) foram usadas e consistiram de pH 8,8 em L-alanina 0,88 M, tampão Tris 0,25 M. Condições de corrida típicas consistiram de 400 V por 12,75 minutos com uma distância de anodo ao catodo de 3,7 cm.

Alternativamente, a mobilidade eletroforética de amostras de proteínas variantes foi medida em géis agarose de 1 mm de espessura 0,5 a 1,5% em vários valores de pH (*isto é* 5,8, 8,0 e 10,0) para escolha de um sistema tamponado adequado. A eletroforese é realizada em condições não desnaturantes. O comprimento Catodo-Anodo era 13,9 cm. Uma amostra de proteína de 1 a 2 µg foi misturada com glicerol 5% + azul de bromofenol 0,05% e carregada em cada coluna. Os géis foram corridos tipicamente por 1 hora a 100V.

Em qualquer caso, os géis foram marcados com corante azul Louiseville dissolvido em ácido acético 10% e desmarcados com metanol 10% e ácido acético 10% em água. É possível carregar entre 12 e 20 variantes proteicas simultaneamente dependendo do sistema de gel nativo usado. Por conseguinte a mobilidade eletroforética de uma variante proteica pode ser imediatamente avaliada em relação a padrões de escala carregados no mesmo gel.

E. Inativação do detergente por calor

A inativação por calor de fórmulas detergentes comerciais serve para destruir a atividade enzimática de qualquer componente proteico enquanto conserva as propriedades de componentes não enzimáticos. Dessa forma este método foi adequado para preparar detergentes comercialmente adquiridos para uso no teste das variantes enzimáticas da presente invenção. Para detergentes líquidos (HDL) de lavagem pesada de roupas da A-

mérica do Norte (NA) e da Europa Ocidental (WE), inativação por calor foi realizada pela colocação de detergente líquido pré-pesado (em uma garrafa de vidro) em um banho de água a 95°C por 2 horas. O tempo de incubação para inativação por calor de detergente granulado (HDG) de lavagem pesada de roupas norte-americano (NA) e japonês (JPN) foi 8 horas e para detergente HDG da Europa Ocidental (WE) foi 5 horas. O tempo de incubação de inativação por calor de detergentes de autolavagem de louças NA e WE (ADW) foi 8 horas. Os detergentes foram comprados de supermercados locais. Ambos os detergentes não aquecidos e aquecidos foram analisados em 5 minutos de dissolução do detergente para determinar exatamente a porcentagem desativada. A atividade enzimática foi testada pelo ensaio de suc-AAPF-pNA.

Para teste da atividade enzimática em detergentes inativados por calor, as soluções de trabalho de detergentes foram feitas a partir de estoques inativados por calor. Quantidades apropriadas de dureza de água (6 gpg ou 12 gpg) e tampão foram adicionadas às soluções detergentes para combinar com as condições desejadas (Tabela 12-1). As soluções foram misturadas por turbilhonamento ou inversão das garrafas.

TABELA 12-1. Condições de Lavagem de Roupas e Louças							
Região	Forma	Dose	Detergente*	Tampão	Gpg	pH	T (°C)
Lavagem de roupa (sujeira pesada líquido ou granular)							
NA	HDL	0,78 g/l	P&G TIDE® 2X	5 mM HEPES	6	8,0	20
WE	HDL	5,0 g/L	Henkel Persil	5 mM HEPES	12	8,2	40
WE	HDG	8,0 g/L	P&G Ariel	2 mM Na ₂ CO ₃	12	10,5	40
JPN	HDG	0,7 g/L	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10,0	20
NA	HDG	1,0 g/L	P&G TIDE®	2 mM Na ₂ CO ₃	6	10,0	20
Lavagem de louças automática							
WE	ADW	3,0 g/L	RB Calgonit	2 mM Na ₂ CO ₃	21	10,0	40
NA	ADW	3,0 g/L	P&G Cascade	2 mM Na ₂ CO ₃	9	10,0	40

* Abreviações: Procter & Gamble (P&G); e Reckitt Benckiser (RB).

F. Ensaio de Terg-o-tômetro para determinação do desempenho de limpeza

Um protocolo padrão para avaliar a limpeza de detritos de proteína e carboidrato foi usado pelo qual o nível de detritos em uma amostra de tecido foi medido antes e após limpeza sob condições padrão. As amostras

5 de tecido consistiram em tecidos de algodão sujos com amido de milho, amido de arroz ou com uma mistura de sangue, leite e negro de carbono, e foram adquiridas de Testfabrics, Inc (West Pittiston, PA). Detritos técnicos de Amido de Milho (EMPA 161) e Sangue, Leite, Negro de carbono (EMPA 116) foram produzidos por materiais de Teste EMPA AG (St. Gallen, Suíça). Detri-

10 tos de Amido de Arroz (CFT CS-28) foram produzidos pelo Center for Test-materials BV (Vlaardingen, Holanda). Cada mancha foi medida antes e após tratamento por refletância ótica usando um conjunto Refletômetro Minolta CR-410 a uma iluminação padrão D65 (6500°K). A diferença nos valores de L, a, b foi convertida na diferença de cor total (dE), como definido pelo espaço de cor CIE-LAB. Limpeza das manchas é expressa como o índice de re-

15 moção de mancha percentual (%SRI) pela tomada de uma razão entre a diferença de cor antes e após lavagem e comparação a diferença de detritos não lavados (antes da lavagem) ao tecido não sujo.

Experimentos de limpeza foram conduzidos em um Terg-o-

20 tômetro (United States Testing Co, Hoboken, NJ) equipado com 6 potes de 2 L de aço inoxidável ajustados com agitadores elevados. Cada tratamento foi conduzido em volume total de 1 L consistindo em de 6 grãos por galão 3:1 (cálcio:magnésio) dureza de água ou 12 grãos por galão dureza de água . Detergentes usados nos experimentos de lavagem foram 1,5 g/L de deter-

25 gente líquido AATCC HDL WOB 2003 com tampão HEPES 5 mM em pH 8, 0,7 g/L de detergente granulado AATCC HDD WOB 1993, 8 g/L de detergente granulado IEC A* 60456 com perborato e branqueador TAED, ou 5g/L de detergente líquido Persil Power Gel. A enzima foi adicionada diretamente na solução de lavagem e as reações então foram iniciadas pela adição de 40g/L

30 ou de 200g/L de tecido sujo e lastro. As reações de lavagem foram agitadas a 100 rpm por 10, 15, ou 40 minutos em 20°C, 25°C, 30°C, 40°C, ou 50°C. Após a limpeza, as amostras foram enxaguadas por 3 minutos em água de

torneira, centrifugadas em uma máquina de lavagem de carregamento frontal em 1000 rpm para remover o excesso de água e secas em um secador em baixo calor em um ciclo de prensagem permanente por aproximadamente 45 minutos. A comparação da extensão da remoção de detritos foi avaliada por refletometria e expressa como índice de remoção de detritos percentual (%SRI). A condição controle não continha enzima e o controle positivo consistiu de várias doses de enzimas comerciais de referência.

G. Ensaio de Bodipy-amido para determinação da atividade de amilase

O ensaio de Bodipy-amido foi realizado usando o Conjunto de Ensaio de Amilase EnzChek® Ultra (E33651, Invitrogen). Uma solução estoque 1 mg/mL de substrato de amido DQ foi preparada pela dissolução dos conteúdos dos frascos contendo substrato liofilizado em 100 µL do tampão de acetato de sódio 50 mM em pH 4,0. O frasco foi vortexado por aproximadamente 20 segundos e deixado à temperatura ambiente, no escuro, com mistura ocasional até dissolução. 900 µL de tampão de ensaio (acetato de sódio 50 mM com CaCl₂ 2,6 mM pH 5,8) foram adicionados e o frasco vortexado por aproximadamente 20 segundos. A solução de substrato foi armazenada à temperatura ambiente, no escuro, pronta para uso ou a 4°C. Para o ensaio, uma solução de trabalho 100 µg/mL do substrato DQ foi preparada a partir da solução de substrato 1 mg/mL em tampão de ensaio. 190 µL de solução de substrato 100 µg/mL foram adicionados a cada um dos poços em uma placa de microtítulo de 96 poços de fundo chato. 10 µL das amostras de enzima foram adicionados aos poços, misturados por 30 segundos usando um thermomixer em 800 rpm. Uma amostra branca contendo tampão e substrato somente (branco sem enzima) foi incluída no ensaio. A taxa de modificação da intensidade de fluorescência foi medida (excitação: 485 nm, emissão: 520 nm) em um leitor de placa de microtítulo de fluorescência a 25°C por 5 minutos.

H. Hidrólise de farinha de milho para determinação da atividade de amilase

Ensaio de Hidrólise de Amido de Substrato de Farinha de Milho para Atividade Enzimática. Farinha de milho orgânico (Azure Farms, lote no. 03227) foi exatamente dispersa em microplaca de 96 poços Greiner, polipro-

pileno, poços estreitos de fundo chato, (Cat. No. 655209), usando um dispositivo de distribuição de sólidos (V&P Scientific). 85 µL de acetato de sódio 20 mM pH 5,6 foram adicionados a cada um dos poços e misturados. Um selo de folha metálica foi aplicado no topo da placa e a placa pré-incubada a 70°C no Thermomixer por 20 a 30 minutos. As amostras de enzima foram diluídas na placa de polipropileno Agilent (5042-1385) em tampão acetato de sódio 20 mM. 11 µL de amostras de enzima diluídas foram adicionados à placa de substrato e a placa firmemente selada com outra folha metálica. As placas então foram transferidas para Incubador/Agitador Labnet VorTemp 56 com blocos metálicos, (N. de Cat. S2056A) preaquecido a 95°C e a velocidade de agitação configurada para 500 rpm. A incubação foi continuada por 30 minutos. Ao final da incubação, as placas foram rapidamente resfriadas em um balde de gelo e a reação de hidrólise de amido foi parada pela adição de 100 µL de H₂SO₄ 0,1 N a cada um dos poços. A placa foi misturada rapidamente e os produtos de reação de hidrólise de amido foram analisados pelo ensaio de PAHBAH ou HPLC.

Detecção Colorimétrica de Concentrações de Açúcar Solúvel a partir da Hidrólise Enzimática de Substrato de Farinha de Milho. Aliquotas de 80 µL de NaOH 0,5 N foram adicionadas a todos os poços de uma placa de PCR vazia seguido por 20 µL do reagente PAHBAH (hidrazida de ácido p-hidroxibenzoico 5% p/v (PAHBAH, Sigma # H9882, dissolvida em HCl 0,5 N) e misturados (placa de reação de PAHBAH). 10 µL dos sobrenadantes de reação de hidrólise de amido foram adicionados à placa de reação PAHBAH. Todas as placas foram seladas e colocadas no termociclador (MJ Research Tetrad), programadas por 2 minutos a 95°C, e então resfriadas a 20°C. As amostras de 80 µL das misturas de reação PAHBAH desenvolvidas foram transferidas para um placa de leitura e a absorvância foi medida em 405 nm em um espectrofotômetro.

Determinação por HPLC das Concentrações de Açúcar Solúvel a partir da Hidrólise Enzimática de Substrato de Farinha de Milho. Padrões de açúcar solúvel (DP1-DP7) obtidos de Sigma (Saint Louis, MO) foram todos diluídos em água Milli-Q a 100 mg/mL e usados para converter a área

de pico dos açúcares a concentrações de açúcar reais. A placa extinta do ensaio de hidrólise de amido foi girada em uma Centrífuga Beckman Coulter Allegra 6R por 5 minutos em 3000 rpm a 25°C. O sobrenadante foi pipetado da placa girada e transferido para uma placa de filtro Multiscreen-HV (No. 5 Catálogo MAHVN4550). A placa de filtro foi girada sobre uma placa Agilent HPLC na centrífuga Hettich Rotanta por 10 minutos em 6.000 rpm a 25°C. 50 µL de fase móvel de ácido sulfúrico 0,01 N (ácido sulfúrico 0,1 N diluído 10X com água Milli-Q) foram transferidos para cada um dos poços da outra placa Agilent HPLC limpa. A placa filtrada foi rapidamente misturada e 50 µL 10 do filtrado foram transferidos para os poços correspondentes na placa com 50 µL da fase móvel por poço. Os padrões de açúcar diluídos foram adicionados a poços vazios na placa a ser incluída na calibração. Os conteúdos foram misturados rapidamente em um agitador de plataforma e a placa recoberta com um Nalgene Pre-slit Well Cap. A coluna de HPLC (coluna Bio- 15 Rad Aminex HPX-87H No. Cat 125-0140) foi preparada antes com 2 L de fase móvel correndo em uma taxa de fluxo constante de 0,6 mL/minuto. Todas as amostras na placa foram corridas com 20 µL de volume de injeção e analisadas usando AMINEXH.M e RID (índice refrativo) como detector. Após a corrida ser concluída, a taxa de fluxo em HPLC foi reduzida para 0,05 20 mL/min.

I. Determinação da redução de viscosidade de amido por amilase

Neste ensaio, a redução de viscosidade da solução de substrato de amido de milho foi medida em um viscosímetro. A pasta fluida de substrato de amido de milho foi feita fresca em modo de batelada com farinha de milho 25 de 30% de sólidos secos em água destilada e ajustada ao pH 5,8 usando ácido sulfúrico. Para cada corrida, 50 gramas da pasta fluida (15 gramas de sólidos secos) foram pesados e pré-incubados por 10 minutos para aquecimento até 70°C. Com a adição de amilase, a temperatura foi imediatamente aumentada de 70°C para 85°C com uma velocidade de rotação de 75 30 rpm. Uma vez que a temperatura da pasta fluida e da mistura de amilase alcançaram 85°C, a temperatura foi considerada constante e a viscosidade foi monitorada por 30 minutos adicionais.

J. Medida da ligação de enzima a substratos macromoleculares

Os ensaios de ligação foram feitos para determinar a ligação ao substrato das variantes de escala de carga de Amilase (AmyS) (modificação de carga =-12 a +12 em relação a AmyS selvagem) para forragem e bagaço de milho. Os substratos usados incluíram bagaço (bagaço de cana-de-açúcar do Brasil, pré-tratado com ácido diluído pelo National Renewable Energy Laboratory, lavado e tamponado em pH 5), AFEX (forragem de milho de expansão de fibra por amônia), e PCS (forragem de milho pré-tratada com ácido sulfúrico diluído, lavada e ajustada ao pH 5). Todos os substratos foram trazidos para porcentagem de sólidos desejada antes do uso.

Ligação de Amilase: as variantes de escala de amilase foram purificadas e diluídas a 200 ppm para teste. Uma solução de bagaço de celulose 1% foi preparada em tampão borato (40 mM, pH 8,5, Tween80 0,016%). 150 µL da solução de bagaço foram adicionados em cada um dos poços em uma placa de microtítulo de filtração. 150 µL do tampão borato foram adicionados no grupo de poços separados, que serviram como controles. 10 µL de variantes de escala de amilase foram adicionados na placa de filtração, cada condição estava em duplicata. A placa foi incubada à temperatura ambiente por 2 horas. O filtrado foi coletado e a atividade de amilase no sobrenadante foi medida pelo ensaio de BODIPY-amido.

Medida da Ligação de Enzima a Microamostras: Variantes de amilase foram incubadas com ou sem microamostras de amido de arroz CS-28 sob condições de lavagem padrão por 30 minutos. A quantidade de enzima livre foi medida pelo ensaio de BODIPY-amido. A fração de enzima ligada às microamostras foi calculada como se segue: Fração ligada = (Atividade de enzima na ausência de amostra - Atividade de enzima na presença de amostra) / (Atividade de enzima na ausência de amostra).

K. Quantitação de proteína amilase de *Geobacillus stearothermophilus*

A proteína amilase de *G. stearothermophilus* foi quantificada por imunoenensaio competitivo. Resumidamente, amilase purificada de *G. stearothermophilus* foi marcada com um corante fluorescente (fluoresceína) e o anticorpo para amilase de *G. stearothermophilus* foi marcado com um coran-

te de extinção (tetrametilrodamina). O sinal de fluorescência do conjugado amilase-fluoresceína é extinto com a ligação do anticorpo marcado com o extintor. A presença de amilase livre na amostra compete pelo anticorpo marcado com o extintor, resultando em um aumento do sinal de fluorescência. Por isso, a força do sinal de fluorescência é proporcional à quantidade de amilase livre na amostra. O ensaio foi calibrado com amilase purificada de *G. stearothermophilus* em concentrações conhecidas.

Marcação de Amilase de G. stearothermophilus com Corante Fluorescente: Amilase purificada de *Geobacillus stearothermophilus* foi marcada com isotiocianato de fluoresceína (Molecular Probes, Eugene, OR) em pH 9,5 em tampão carbonato de sódio 50 mM de acordo com o protocolo do fabricante. No final da reação, a proteína foi separada do corante não ligado por filtração em gel sobre Sefadex G-25 (Sigma, St. Louis, MO, EUA) em salina tamponada em fosfato.

Preparação do Anticorpo e Marcação com Corante de Extinção: Anticorpo para amilase de *Geobacillus stearothermophilus* foi preparado por imunização de coelhos e recuperação do antissoro. O antissoro foi armazenado a -20°C até o uso. A preparação da fração de imunoglobulina por realizada por precipitação em sulfato de amônio; 15 ml de sulfato de amônio 3,75 M foram adicionados a 20 ml de antissoro e permitidos repousar a 4°C por 60 minutos antes da centrifugação a 2.000 g para recuperação do precipitado. O precipitado recuperado foi lavado duas vezes por ressuspensão e sedimentação em 10 ml de sulfato de amônio 1,6 M gelado. O precipitado final foi dissolvido em 4 ml de água e dialisado contra carbonato de sódio 50 mM pH 9,5 a 4°C. Foi estimado que a concentração proteica seja 29,2 mg/ml por A_{280} usando o coeficiente de extinção $\epsilon_{1\%} = 15$. A fração de imunoglobulina foi marcada com isotiocianato de tetrametil rodamina (Sigma, St. Louis, MO) em carbonato de sódio 50 mM pH 9,5. O corante não ligado então foi removido por filtração em gel em uma coluna Sefadex G-25 equilibrada com salina tamponada em fosfato contendo desoxicolato 0,1%.

Procedimento de Ensaio: O imunoensaio foi realizado em placas de microtítulo de 96 poços (Corning #3650). A concentração de fluoresceína-

amilase foi ajustada tal que a concentração final no ensaio estivesse no meio da curva padrão desejada. Similarmente, a concentração de extintor-anticorpo foi ajustada tal que a concentração final permitisse modulação máxima do sinal de fluorescência. Usando um sistema de manejo líquido automatizado, 5 µL de cada uma das amostras, fluoresceína-amilase, e anticorpo extintor foram adicionados a 180 µL de salina tamponada em fosfato contendo polietilenoglicol 8000 2% (p/v) (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Após breve agitação, permitiu-se que as placas fossem incubadas à temperatura ambiente por uma hora, o sinal de fluorescência foi determinado usando um leitor de placa de fluorescência (Molecular Devices) com conjunto de filtros de excitação e emissão de 495 nm e 520 nm, respectivamente.

Exemplo 13. Produção de amilase em *B. subtilis*

Neste Exemplo, a produção de uma forma mutante truncada de α-amilase de *G. stearothermophilus* (tendo uma mutação S242Q e uma deleção do aminoácido 29 do C-terminal; também referida neste pedido como S242Q) e variantes da mesma em *B. subtilis* é descrita. A transformação foi realizada como conhecido na técnica (ver, *por exemplo*, WO 02/14490). Resumidamente, o gene que codifica as amilases parentais foi clonado no vetor de expressão pHPLT, que contém o promotor de LAT (PLAT), uma sequência que codifica o peptídeo sinal de LAT (preLAT), seguida por sítios de restrição PstI e HpaI para clonagem.

A região de codificação do peptídeo sinal de LAT é mostrada abaixo:

atgaaacaac aaaaacggct ttacgcccga ttgctgacgc tgttatttgc gct-
catcttc ttgctgcctc attctgcagc ttcagca (SEQ ID NO: 20).

A sequência de aminoácidos do peptídeo sinal de LAT é mostrada abaixo:

MKQQKRLYAR LLTLLFALIF LLPHSAASA (SEQ ID NO: 21)

A sequência de aminoácidos da amilase S242Q truncada madura com o aminoácido substituído mostrado em *itálico* foi usada como base para construção das bibliotecas variantes descritas neste pedido:

AAPFNGTMMQ YFEWYLPDDG TLWTKVANEA>NNLSSLGITA LWLP-

PAYKGT SRSDVGYGVY DLYDLGEFNQ KGTVRTKYGT KAQYLQAIQA
 AHAAGMQVYA DVVFDHKGGA DGTEWVDAVE VNPSDRNQEI SGTYQI-
 QAWT KDFDPGRGNT YSSFKWRWYH FDGVDWDESR KLSRIYKFRG IG-
 KAWDWEVD TENGNYDYLM YADLDMDHPE VTELKNWGK WYVNTT-
 5 NIDG FRLDAVKHIK FQFFPDWLSY VRSQTGKPLF TVGEYWSYDI NK-
 LHNYITKT NGTMSLFDAP LHNKFYTASK SGGAFDMRTL MTNTLMKDQP
 TLAVTFVDNH DTEPGQALQS WWDWPKPLA YAFILTRQEG
 YPCVFYGDYY GIPQYNIPSL KSKIDPLLIA RRDYAYGTQH DYLDHSDIIG
 WTREGVTEKP GSGLAALITD GPGGSKWMYV GKQHAGKVFY DLTGN-
 10 RSDTV TINS DGWGEF KVNGGSVSVW VPRKTT (SEQ ID NO: 22).

A região de codificação da amilase AmyS madura é mostrada abaixo:

gccgcaccgt ttaacggtac catgatgcag tattttgaat ggtacttgcc ggatgatggc acgttatgga
 ccaaagtggc caatgaagcc aacaacttat ccagccttgg catcaccgct ctttggctgc
 15 cgcccgttta caaaggaaca agccgcagcg acgtagggtta cggagtatac gacttgtatg
 acctcggcga attcaatcaa aaagggaccg tccgcacaaa atatggaaca aaagctcaat atctt-
 caagc cattcaagcc gccacgccc ctggaatgca agtgtacgcc gatgtcgtgt tcgaccataa
 agggcggcgt gacggcacgg aatgggtgga cgccgtcgaa gtcaatccgt ccgaccgcaa cca-
 agaaatc tcgggcacct atcaaatcca agcatggacg aaatttgatt ttccggggcg gggcaa-
 20 cacc tactccagct ttaagtggcg ctggtacat ttgacggcg ttgactggga cgaaagccga aa-
 attaagcc gcatttaca attccgcggc atcggaag cgtgggattg ggaagtagac acggaa-
 aacg gaaactatga ctacttaatg tatgccgacc ttgatatgga tcatcccgaa gtcgtgaccg
 agctgaaaaa ctgggggaaa tggtatgtca acacaacgaa cattgatggg ttccggcttg
 atgccgtcaa gcatattaag ttcagttttt ttctgattg gttgtcgtat gtgcgttctc agactggcaa
 25 gccgctattt accgtcgggg aatattggag ctatgacatc aacaagttgc acaattacat tacgaaa-
 aca aacggaacga tgtctttgtt tgatgccccg ttacacaaca aattttatac cgcttccaaa
 tcagggggcg catttgatat gcgcacgtta atgaccaata ctctcatgaa agatcaaccg a-
 cattggccg tcacctcgt tgataatcat gacaccgaac ccggccaagc gctgcagtca tgggtc-
 gacc catggttcaa accgttggct tacgccttta ttctaactcg gcaggaagga taccgtgcg tcttt-
 30 tatgg tgactattat ggcattccac aatataacat tccttcgctg aaaagcaaaa tcgatccgct cct-
 catcgcg cgcagggatt atgcttacgg aacgcaacat gattatcttg atcactccga catcatcggg
 tggacaaggg aaggggtcac tgaaaaacca ggatccgggc tggccgcact gatcaccgat

gggccgggag gaagcaaatg gatgtacgtt ggcaaacaac acgctggaaa agtgttctat gacct-
taccg gcaaccggag tgacaccgtc accatcaaca gtgatggatg gggggaattc aaagtcaatg
gcgggtcggg ttccggttgg gttcctagaa aaacgaccgt ttctaccatc gtcgggccga tcaca-
acccg accgtggact ggtgaattcg tccgtggac cgaaccacgg ttggtggcat ggcct (SEQ

5 ID NO: 23)

A sequência de aminoácidos da amilase AmyS madura foi usada como base para construção das bibliotecas de variantes de AmyS, e é fornecida como SEQ ID NO:2.

Os produtos de PCR foram purificados usando colunas Qiaquick da Qiagen, e ressuspensos em 50 µL de água deionizada. 50 µL de DNA purificado foram digeridos com HpaI (Roche) e PstI (Roche) e o DNA resultante ressuspenso em 30 µL de água deionizada. 10 a 20 ng/µL de DNA foram clonados no plasmídeo pHPLT usando sítios de clonagem PstI e HpaI. As misturas de ligação foram diretamente transformadas em células competentes de *B. subtilis* (genótipo: Δvpr, ΔwprA, Δmpr-ybfJ, ΔnprB). As células de *B. subtilis* têm um gene de competência (comK) que é colocado sob um promotor induzível de xilose, portanto, xilose foi usada para induzir a competência de ligação e absorção de DNA (ver Hahn *et al.* (1996) *Mol. Microbiol.* 21:763-775).

Os elementos do plasmídeo pHPLT-AmyS incluem: pUB110 = fragmento de DNA plasmidial pUB110 (McKenzie *et al.* (1986) *Plasmid* 15: 93-103). Características plasmidiais incluem: ori-pUB110 = origem de replicação de pUB110, neo = gene de resistência à neomicina de pUB110, Plat = promotor transcricional de amilase de *B. licheniformis*, Pre LAT = peptídeo sinal de amilase de *B. licheniformis*, SAMY 425ss = A região de codificação da sequência gênica AmyS truncada (substituída pelas regiões de codificação de cada variante de AmyS truncada expressa neste estudo), Terminador = terminador transcricional de amilase de *B. licheniformis*.

Exemplo 14. Expressão de Variantes de Enzima

Este Exemplo descreve os métodos usados para expressar várias enzimas recombinantes de *B. subtilis* transformado dos Exemplos precedentes em uma escala de 2 ml.

Clones de *B. subtilis* contendo vetores de expressão de AmyS (ou uma variante da mesma) ou S242Q (ou uma variante da mesma) foram replicados com um replicador de 96 poços de aço a partir dos estoques de glicerol em placas de cultura de 96 poços (BD, 353075) contendo 150 µl de meios LB + neomicina 10 µg/ml, cultivadas durante a noite a 37°C, 220 rpm em um compartimento umidificado. Uma alíquota de 100 µl da cultura noturna foi usada para inocular 2.000 µl de meios definidos + neomicina 10 µg/ml em tubos plásticos de cultura de 5 ml. Os meios de cultura foram meios semidefinidos enriquecidos com base no tampão MOPS, com ureia como a principal fonte de nitrogênio, glicose como principal fonte de carbono, e suplementados com soytone 1% e cálcio 5 mM para crescimento celular robusto. Os tubos de cultura foram incubados a 37°C, 250 rpm, por 72 horas. Após esta incubação, os caldos de cultura foram centrifugados por 10 minutos a 3.000 x g. A solução de sobrenadante foi decantada em tubos cônicos de polipropileno de 15 ml e 80 µL de cada amostra foram aliqotados em placas de 96 poços para quantificação de proteína.

Exemplo 15. Produção de Variantes de Enzima

Este Exemplo descreve a produção de escalas de enzima e bibliotecas de carga combinatória.

20 Escalas de Carga de Enzima

Múltiplas variantes proteicas transpondo uma faixa de propriedades físicas de interesse são selecionadas a partir de bibliotecas existentes ou são geradas por técnicas de mutagênese sítio-dirigida como conhecido na técnica (ver, *por exemplo*, Publicação de Patente norte-americana Nº 25 2008-0293610). Este conjunto definido de proteínas de investigação então é analisado em um teste de interesse.

Variantes de escala de amilase exemplares são mostradas nas seguintes tabelas e analisadas como descrito neste pedido. Nestas tabelas, a modificação de carga é em relação à enzima parental.

30 A sequência do gene AmyS foi fornecida por Gene Oracle (Mountain View, CA) para a síntese das 28 variantes de escala mostradas nas Tabelas 15-1 e 15-2. Gene Oracle sintetizou e clonou as variantes de

AmyS no vetor pGov4 e os transformou em *E. coli*. DNA isolado a partir de minipreps, bem como uma inoculação em ágar por picada foi fornecida para cada variante.

As variantes foram amplificadas por PCR e clonadas em vetor de expressão pHPLT em *B. subtilis*. As variantes foram amplificadas como um fragmento PstI-HindIII do plasmídeo pGov4 usando iniciadores:

Satori F 5'-CTCATCTTCTTGCTGCCTCATTCTGCAGCTTC-3' (SEQ ID NO:24);

e

Satori R 5'-TTATCCTTTACCTTGTCTCCAAGC-3' (SEQ ID NO:25).

Os produtos de PCR foram purificados usando colunas Qiagen Qiaquick, e ressuspensos em 50 µL de água milliQ. 50 µL de DNA purificado foram digeridos com HindIII (Roche) e PstI (Roche) e o DNA resultante res-suspense em 30 µL de água deionizada. 10 a 20 ng/µL de DNA foram clonados no plasmídeo pHPLT usando sítios de clonagem PstI e HpaI. As misturas de ligação foram diretamente transformadas em células competentes de *B. subtilis* (genótipo: amyE::xylRPxylAcomK-phleo). Estas células de *B. subtilis* têm um gene de competência (comK) que é colocado sob um promotor induzível de xilose, então xilose foi usada para induzir a competência de ligação e absorção de DNA.

TABELA 15-1. Primeira Escala de Carga de AmyS

Número	AmyS Variante	ΔCarga
1-6	R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q K471Q N28D N224D N271D N281D Q86E Q89E	-12
1-5	R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q N28D N224D N271D N281D Q86E	-10
1-4	R308Q R483Q K171Q K383Q N28D N224D N271D N281D	-8
1-3	R308Q R483Q K171Q N28D N224D N271D	-6
1-2	R308Q R483Q N28D N224D	-4
1-1	R308Q N28D	-2
AmyS	Parental	0
2-1	D318N N28R	+2
2-2	D318N D306N N28R N224R	+4
2-3	D318N D306N D19N N28R N224R N271R	+6

TABELA 15-1. Primeira Escala de Carga de AmyS		
2-4	D318N D306N D19N D393N N28R N224R N271R N281R	+8
2-5	D318N D306N D19N D393N D458N N28R N224R N271R N281R Q86R	+10
2-6	D318N D306N D19N D393N D458N E29Q N28R N224R N271R N281R Q86R Q89R	+12

TABELA 15-2. Segunda Escala de Carga de AmyS		
3-7	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D N281D Q86E Q89E R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q K471Q	-12
3-6	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D N281D Q86E R308Q R483Q K171Q K383Q K447Q	-10
3-5	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D N281D R308Q R483Q K171Q K383Q	-8
3-4	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D N271D R308Q R483Q K171Q	-6
3-3	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D R308Q R483Q	-4
3-2	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D	-2
3-1	Q97R Q319R Q358E Q443E	0
4-1	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K D318N	+2
4-2	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K D318N D306N	+4
4-3	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K D318N D306N D19N	+6
4-4	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K N281K D318N D306N D19N D393N	+8
4-5	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K N281K Q86R D318N D306N D19N D393N D458N	+10
4-6	Q97R Q319R Q358E Q443E N28K N224K N271K N281K Q86R Q89R D318N D306N D19N D393N D458N E29Q	+12
5-1	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D R308Q S242E	-3
5-2	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D R308Q S242E	-4
5-3	Q97R Q319R Q358E Q443E N28D N224D R308Q S242Q	-3

TABELA 15-3. Escala de Carga AmyS-S242Q	
AmyS-S242Q Variante	Δ Carga
Q97E-Q319E-Q358E-Q443E	-4
Q97E-Q319E-Q358E	-3
Q97E-Q319E	-2
Q97E	-1
Q97R-Q319E	0
AmyS-S242Q Parental	0
Q97R	+1
Q97R-Q319R	+2
Q97R-Q319R-Q358R	+3
Q97R-Q319R-Q358R	+4

Bibliotecas de Carga Combinatória de Enzima (CCL): Geração de AmyS-S242Q CCL de *G. stearothermophilus*

5 DNA plasmidial AmyS-S242Q foi isolado de uma linhagem transformada de *B. subtilis* (genótipo: $\Delta aprE$, $\Delta nprE$, *amyE::xylRPxylAcomK-phleo*) e enviado para DNA2.0 Inc. como o molde para construção de CCL. Um pedido foi feito a DNA2.0 Inc (Mountain View, CA, EUA) para a geração de bibliotecas posicionais em cada um dos quatro sítios na amilase AmyS-S242Q (S242Q) que são mostrados na Tabela 15-4. Variantes foram fornecidas como estoques em glicerol em placas de 96 poços.

10 A biblioteca de carga combinatória de AmyS S242Q foi desenhada pela identificação dos quatro seguintes resíduos: Gln-97, Gln 319, Gln 358 e Gln 443. Um quarto sítio, CCL de 81 membros foi criado pela construção de todas as combinações de três possibilidades em cada sítio: selvagem, arginina ou ácido aspártico.

TABELA 15-4. Variantes S242Q CCL					
Variante #	Q97	Q319	Q358	Q443	Δ Carga
1	Q97E	Q319E	Q358E	Q443E	-4
2	Q97E	Q319E	Q358E	Q443R	-2
3	Q97E	Q319E	Q358E	-	-3
4	Q97E	Q319E	Q358R	Q443E	-2
5	Q97E	Q319E	Q358R	Q443R	0
6	Q97E	Q319E	Q358R	-	-1
7	Q97E	Q319E	-	Q443E	-3

TABELA 15-4. Variantes S242Q CCL					
Variante #	Q97	Q319	Q358	Q443	Δ Carga
8	Q97E	Q319E	-	Q443R	-1
9	Q97E	Q319E	-	-	-2
10	Q97E	Q319R	Q358E	Q443E	-2
11	Q97E	Q319R	Q358E	Q443R	0
12	Q97E	Q319R	Q358E	-	-1
13	Q97E	Q319R	Q358R	Q443E	0
14	Q97E	Q319R	Q358R	Q443R	+2
15	Q97E	Q319R	Q358R	-	+1
16	Q97E	Q319R	-	Q443E	-1
17	Q97E	Q319R	-	Q443R	+1
18	Q97E	Q319R	-	-	0
19	Q97E	-	Q358E	Q443E	-3
20	Q97E	-	Q358E	Q443R	-1
21	Q97E	-	Q358E	-	-2
22	Q97E	-	Q358R	Q443E	-1
23	Q97E	-	Q358R	Q443R	+1
24	Q97E	-	Q358R	-	0
25	Q97E	-	-	Q443E	-2
26	Q97E	-	-	Q443R	0
27	Q97E	-	-	-	-1
28	Q97R	Q319E	Q358E	Q443E	-2
29	Q97R	Q319E	Q358E	Q443R	0
30	Q97R	Q319E	Q358E	-	-1
31	Q97R	Q319E	Q358R	Q443E	0
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	+2
33	Q97R	Q319E	Q358R	-	+1
34	Q97R	Q319E	-	Q443E	-1
35	Q97R	Q319E	-	Q443R	+1
36	Q97R	Q319E	-	-	0
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	0
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	+2
39	Q97R	Q319R	Q358E	-	+1
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	+2
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	+4
42	Q97R	Q319R	Q358R	-	+3

TABELA 15-4. Variantes S242Q CCL					
Variante #	Q97	Q319	Q358	Q443	Δ Carga
43	Q97R	Q319R	-	Q443E	+1
44	Q97R	Q319R	-	Q443R	+3
45	Q97R	Q319R	-	-	+2
46	Q97R	-	Q358E	Q443E	-1
47	Q97R	-	Q358E	Q443R	+1
48	Q97R	-	Q358E	-	0
49	Q97R	-	Q358R	Q443E	+1
50	Q97R	-	Q358R	Q443R	+3
51	Q97R	-	Q358R	-	+2
52	Q97R	-	-	Q443E	0
53	Q97R	-	-	Q443R	+2
54	Q97R	-	-	-	+1
55	-	Q319E	Q358E	Q443E	-3
56	-	Q319E	Q358E	Q443R	-1
57	-	Q319E	Q358E	-	-2
58	-	Q319E	Q358R	Q443E	-1
59	-	Q319E	Q358R	Q443R	+1
60	-	Q319E	Q358R	-	0
61	-	Q319E	-	Q443E	-2
62	-	Q319E	-	Q443R	0
63	-	Q319E	-	-	-1
64	-	Q319R	Q358E	Q443E	-1
65	-	Q319R	Q358E	Q443R	+1
66	-	Q319R	Q358E	-	0
67	-	Q319R	Q358R	Q443E	+1
68	-	Q319R	Q358R	Q443R	+3
69	-	Q319R	Q358R	-	+2
70	-	Q319R	-	Q443E	0
71	-	Q319R	-	Q443R	+2
72	-	Q319R	-	-	+1
73	-	-	Q358E	Q443E	-2
74	-	-	Q358E	Q443R	0
75	-	-	Q358E	-	-1
76	-	-	Q358R	Q443E	0
77	-	-	Q358R	Q443R	+2

TABELA 15-4. Variantes S242Q CCL					
Variante #	Q97	Q319	Q358	Q443	Δ Carga
78	-	-	Q358R	-	+1
79	-	-	-	Q443E	-1
80	-	-	-	Q443R	+1
81 (parental)	Q97	Q319	Q358	Q443	0

Exemplo 16. Desempenho de Lavagem da Enzima

Este Exemplo descreve o teste da variante S242Q em um ensaio de microamostra 1,0 $\mu\text{g/ml}$ em detergente AATCC HDL ou tampão HE-PES 5 mM sob força iônica variada. Os métodos fornecidos no Exemplo 12 foram usados (ver, *por exemplo*, "Ensaio de Microamostra de Amido de Arroz para teste do Desempenho de Amilase").

Há uma alteração ótima de carga líquida para desempenho de limpeza da enzima em detergente AATCC HDL. O desempenho é medido em termos de desempenho de limpeza relativo observado em um ensaio de atividade de microamostra de amido de arroz. Um valor de aproximadamente 1,0 indica o desempenho de limpeza superior neste ensaio. Este é um exemplo de otimização de uma propriedade física da proteína (*por exemplo*, carga líquida) para melhorar um dado resultado ou benefício (*por exemplo*, desempenho de limpeza em um detergente líquido para lavagem de roupas). A carga ótima identificada com este conjunto limitado de proteínas de investigação coincide com a carga ótima observada ao medir a biblioteca combinatória de carga completa. O uso das proteínas de investigação é, por isso, preditivo do comportamento da biblioteca completa.

De acordo com a teoria de Debye-Hückel (Israelachvili, Intermolecular and Surface Forces, Second Edition: With Applications to Colloidal and Biological Systems, Academic Press 2nd Ed. [1992]), interações eletrostáticas são governadas principalmente pela intensidade de forças da dupla camada entre espécies interagindo em potencial constante ou carga constante (enzimas, substratos, tecido e detergente), seu tamanho, e a constante dielétrica do meio circundante. A fim de caracterizar o comportamento eletrostático de partículas em um meio complexo, tal como uma formulação de detergente, sua interação em um ambiente reduzido que possua a mesma dis-

tância de classificação de Debye é suficiente. Isto foi realizado pela escolha de um tampão de combinação de pH e condutividade àquele do detergente sob condições de lavagem. Um tampão apropriado para tal teste é o tampão HEPES 5 mM em pH 8,0 com variação de quantidades de eletrólito indife-

5 rentes, tais como NaCl. Adição de NaCl 2,5 mM a este tampão combina o pH e condutividade das condições de lavagem norte-americanas típicas. Adição de NaCl 100 mM é representativa para condições japonesas e europeias de lavagem, tipicamente maiores em força iônica devido tanto a dureza da água aumentada como devido a concentrações de detergentes.

10 A figura 23 mostra que variantes de S242Q de carga positiva foram superiores na limpeza da microamostra de amido de arroz sob condições norte-americanas de lavagem de roupas. Similarmente, variantes de carga positiva de outra α -amilase (*isto é*, TS23t) foram superiores na limpeza da microamostra de amido de arroz sob condições norte-americanas de la-

15 vagem de roupas (figura 24), demonstrando que as mutações de carga têm um efeito similar em α -amilases diferentes. Variantes de carga positiva S242Q também exibem atividade específica superior para hidrólise de substratos de amido de milho granulado (figura 25).

A liquefação de amido pelas variantes de escala de AmyS foi de-

20 terminada pelo monitoramento da viscosidade final após liquefação de amido de milho. Um baixo valor de viscosidade é indicativo do exaurimento de polissacarídeos de amido. Como mostrado na figura 14, uma condição favorável de carga (*por exemplo*, -4 a -2) foi observada para liquefação. Variantes de AmyS que foram muito negativas (*por exemplo*, -12 a -10) exibiram viscosidade final mais alta, e variantes que foram muito positivas (*por exemplo*,

25 +6 ou maior) exibiram viscosidade final ainda mais alta (*por exemplo*, além dos limites da instrumentação do laboratório devido à sobrecarga de torque).

Exemplo 17. Termoestabilidade

Este Exemplo descreve a determinação da relação entre carga

30 proteica e estabilidade térmica. Ensaios de amilase foram baseados na hidrólise de BODIPY amido antes e após aquecimento do sobrenadante da cultura. As mesmas soluções químicas e reagentes foram usados como

descrito no Exemplo 12.

Ensaio de estabilidade térmica para α -amilases

Os sobrenadantes de cultura filtrados foram diluídos em série em acetato de sódio 50 mM + CaCl_2 2 mM pH 5,8 com Tween 0,002%. 10 μL de cada sobrenadante de cultura diluído foram analisados para determinação da atividade de amilase inicial pelo ensaio de BODIPY-amido. 50 μL de cada sobrenadante de cultura diluído foram colocados em uma PCR de perfil de baixo VWR de placa de 96 poços. 30 μL do óleo mineral foram adicionados a cada um dos poços como um selante. A placa foi incubada em um instrumento de DNA BioRad Peltier Thermal Cycler a 95°C por 30 ou 60 minutos dependendo da estabilidade da enzima parental. Após incubação, a placa foi resfriada a 4°C por 5 minutos e então conservada à temperatura ambiente. 10 μL de cada amostra foram adicionados a uma nova placa e analisados para determinação da atividade final de amilase pelo ensaio de BODIPY-amido como descrito no Exemplo 1.

Cálculo de Termoestabilidade

A atividade residual de uma amostra foi expressa como a razão da absorvância final e absorvância inicial, ambas corrigidas pelos brancos. Um índice mais alto indica uma variante termicamente mais estável. Este é um exemplo de otimização de uma propriedade física da proteína, neste caso, carga líquida, para melhorar a estabilidade térmica da enzima de uma aplicação líquida de lavagem de roupas.

A termoestabilidade das variantes foi avaliada como descrito acima. Os favorecidos em termoestabilidade a partir da S242Q CCL são listados na Tabela 17-1. Os favorecidos foram definidos como aqueles que têm uma razão de atividade residual mutante pela atividade residual parental (*isto é*, S242Q) maior que 1. A figura 30 mostra que a atividade residual da primeira escala de AmyS como uma função da alteração de carga em relação à selvagem. A estabilidade térmica empregada neste ensaio é descrita no exemplo 12. Mais uma vez como evidenciado na figura, o acúmulo de cargas negativas extremas (-12) ou cargas positivas (+4) em relação à enzima selvagem são prejudiciais para a estabilidade térmica. Este é um exemplo de

otimização de uma propriedade física da proteína, neste caso, carga líquida, para melhorar a estabilidade térmica enzimática de uma aplicação líquida para lavagem de roupas.

Tabela 17-1: S242Q CCL - favorecidos por estabilidade térmica

Variante #	97	319	358	443	Ativ. residual Mut/ residual selvagem
2	Q97E	Q319E	Q358E	Q443R	1,12
10	Q97E	Q319R	Q358E	Q443E	1,12
13	Q97E	Q319R	Q358R	Q443E	1,36
14	Q97E	Q319R	Q358R	Q443R	1,16
15	Q97E	Q319R	Q358R		1,37
17	Q97E	Q319R		Q443R	1,29
18	Q97E	Q319R			1,11
27	Q97E				1,16
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	1,18
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	1,29
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	1,22
39	Q97R	Q319R	Q358E		1,21
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	1,20
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	1,26
42	Q97R	Q319R	Q358R		1,48
43	Q97R	Q319R		Q443E	1,21
44	Q97R	Q319R		Q443R	1,21
45	Q97R	Q319R			1,14
50	Q97R		Q358R	Q443R	1,14
62		Q319E		Q443R	1,26
63		Q319E			1,18
64		Q319R	Q358E	Q443E	1,19
65		Q319R	Q358E	Q443R	1,28
68		Q319R	Q358R	Q443R	1,14
70		Q319R		Q443E	1,22
73			Q358E	Q443E	1,15
74			Q358E	Q443R	1,15
75			Q358E		1,18

5 Exemplo 18. Desempenho enzimático

Este Exemplo demonstra que o desempenho enzimático pode

ser afetado pela carga. O desempenho enzimático foi avaliado usando detergentes inativados por calor como descrito acima no Exemplo 12. Os favorecidos foram definidos como aqueles que têm Índice de Desempenho (PI) maior que 1. PI é a razão da atividade residual mutante pela atividade residual parental (*isto é*, S242Q). Os resultados são mostrados nas Tabelas 18-1 e 18-2.

Tabela 18-1: S242Q CCL - favorecidos por microamostra de amido de arroz de CS-28, Tide 2x (condições norte-americanas como descrito no Exemplo 12)

Variante #	97	319	358	443	carga rel	PI
13	Q97E	Q319R	Q358R	Q443E	0	1,44
14	Q97E	Q319R	Q358R	Q443R	2	1,32
15	Q97E	Q319R	Q358R		1	1,40
16	Q97E	Q319R		Q443E	-1	1,33
17	Q97E	Q319R		Q443R	1	1,40
18	Q97E	Q319R			0	1,41
20	Q97E		Q358E	Q443R	-1	1,15
23	Q97E		Q358R	Q443R	1	1,21
25	Q97E			Q443E	-2	1,18
26	Q97E			Q443R	0	1,25
27	Q97E				-1	1,16
28	Q97R	Q319E	Q358E	Q443E	-2	2,32
29	Q97R	Q319E	Q358E	Q443R	0	2,54
30	Q97R	Q319E	Q358E		-1	2,93
31	Q97R	Q319E	Q358R	Q443E	0	2,27
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	2	2,28
33	Q97R	Q319E	Q358R		1	2,34
34	Q97R	Q319E		Q443E	-1	2,31
35	Q97R	Q319E		Q443R	1	2,31
36	Q97R	Q319E			0	2,14
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	0	1,93
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	2	1,85

Variante #	97	319	358	443	carga rel	PI
39	Q97R	Q319R	Q358E		1	2,14
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	2	1,92
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	4	1,37
42	Q97R	Q319R	Q358R		3	1,61
43	Q97R	Q319R		Q443E	1	1,90
44	Q97R	Q319R		Q443R	3	1,64
45	Q97R	Q319R			2	1,99
46	Q97R		Q358E	Q443E	-1	1,40
47	Q97R		Q358E	Q443R	1	1,29
48	Q97R		Q358E		0	1,60
49	Q97R		Q358R	Q443E	1	1,57
50	Q97R		Q358R	Q443R	3	1,38
51	Q97R		Q358R		2	1,37
52	Q97R			Q443E	0	1,51
54	Q97R				1	1,51
55		Q319E	Q358E	Q443E	-3	1,14
56		Q319E	Q358E	Q443R	-1	1,38
57		Q319E	Q358E		-2	1,10
58		Q319E	Q358R	Q443E	-1	1,25
59		Q319E	Q358R	Q443R	1	1,41
60		Q319E	Q358R		0	1,49
61		Q319E		Q443E	-2	1,16
62		Q319E		Q443R	0	1,45
63		Q319E			-1	1,28
64		Q319R	Q358E	Q443E	-1	1,12
65		Q319R	Q358E	Q443R	1	1,19
66		Q319R	Q358E		0	1,36
67		Q319R	Q358R	Q443E	1	1,24
69		Q319R	Q358R		2	1,19
70		Q319R		Q443E	0	1,29
76			Q358R	Q443E	0	1,22

Variante #	97	319	358	443	carga rel	PI
78			Q358R		1	1,25
79				Q443E	-1	1,24
80				Q443R	1	1,17

Tabela 18-2: S242Q CCL - favorecidos por microamostra de amido de arroz de CS-28, Persil (condições da Europa Ocidental)

Variante #	97	319	358	443	carga rel	PI
2	Q97E	Q319E	Q358E	Q443R	-2	1,41
3	Q97E	Q319E	Q358E		-3	1,94
4	Q97E	Q319E	Q358R	Q443E	-2	1,61
5	Q97E	Q319E	Q358R	Q443R	0	1,39
6	Q97E	Q319E	Q358R		-1	2,04
7	Q97E	Q319E		Q443E	-3	2,05
8	Q97E	Q319E		Q443R	-1	1,84
9	Q97E	Q319E			-2	2,27
10	Q97E	Q319R	Q358E	Q443E	-2	1,35
13	Q97E	Q319R	Q358R	Q443E	0	1,45
14	Q97E	Q319R	Q358R	Q443R	2	1,17
15	Q97E	Q319R	Q358R		1	1,22
16	Q97E	Q319R		Q443E	-1	1,26
17	Q97E	Q319R		Q443R	1	1,29
18	Q97E	Q319R			0	1,76
26	Q97E			Q443R	0	1,36
27	Q97E				-1	1,31
28	Q97R	Q319E	Q358E	Q443E	-2	2,21
29	Q97R	Q319E	Q358E	Q443R	0	1,96
30	Q97R	Q319E	Q358E		-1	1,94
31	Q97R	Q319E	Q358R	Q443E	0	2,11
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	2	1,87
33	Q97R	Q319E	Q358R		1	2,41
34	Q97R	Q319E		Q443E	-1	2,20
35	Q97R	Q319E		Q443R	1	2,21
36	Q97R	Q319E			0	2,07
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	0	1,86
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	2	1,83

Variante #	97	319	358	443	carga rel	PI
39	Q97R	Q319R	Q358E		1	1,99
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	2	1,85
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	4	1,36
42	Q97R	Q319R	Q358R		3	1,90
43	Q97R	Q319R		Q443E	1	1,99
44	Q97R	Q319R		Q443R	3	1,94
45	Q97R	Q319R			2	1,75
46	Q97R		Q358E	Q443E	-1	1,71
47	Q97R		Q358E	Q443R	1	1,39
48	Q97R		Q358E		0	1,85
50	Q97R		Q358R	Q443R	3	1,24
51	Q97R		Q358R		2	1,36
52	Q97R			Q443E	0	1,25
54	Q97R				1	1,88
55		Q319E	Q358E	Q443E	-3	1,12
56		Q319E	Q358E	Q443R	-1	1,17
58		Q319E	Q358R	Q443E	-1	1,16
59		Q319E	Q358R	Q443R	1	1,25
60		Q319E	Q358R		0	1,50
63		Q319E			-1	1,36
64		Q319R	Q358E	Q443E	-1	1,10
65		Q319R	Q358E	Q443R	1	1,18
66		Q319R	Q358E		0	1,25
67		Q319R	Q358R	Q443E	1	1,29
70		Q319R		Q443E	0	1,15

A atividade também foi medida usando o ensaio de hidrólise de BODIPY-amido como fornecido neste pedido. Os resultados são mostrados na Tabela 18-3. Uma atividade específica relativa neste substrato de amido (um amido de milho) maior que 1 indica que a variante tem atividade específica mais alta do que a parental S242Q. PPM relativo é o título de expressão da variante em relação a parental, maior que 1 indica títulos mais altos (em tubos de agitação) do que S242Q parental.

Tabela 18-3: Título S242Q CCL e/ou favorecidos por BODIPY-amido

Variante #	97	319	358	443	Carga	ppm rel	Ativ. esp. rel.
1	Q97E	Q319E	Q358E	Q443E	-4	1,27	1,29
2	Q97E	Q319E	Q358E	Q443R	-2	1,19	1,31
3	Q97E	Q319E	Q358E		-3	1,00	1,43
4	Q97E	Q319E	Q358R	Q443E	-2	1,23	1,43
5	Q97E	Q319E	Q358R	Q443R	0	0,94	1,78
6	Q97E	Q319E	Q358R		-1	0,89	1,81
7	Q97E	Q319E		Q443E	-3	1,40	1,41
8	Q97E	Q319E		Q443R	-1	1,12	1,58
9	Q97E	Q319E			-2	1,09	1,56
10	Q97E	Q319R	Q358E	Q443E	-2	1,45	1,32
11	Q97E	Q319R	Q358E	Q443R	0	1,32	1,49
12	Q97E	Q319R	Q358E		-1	1,58	1,27
13	Q97E	Q319R	Q358R	Q443E	0	0,65	1,44
14	Q97E	Q319R	Q358R	Q443R	2	0,66	1,65
15	Q97E	Q319R	Q358R		1	0,80	1,64
16	Q97E	Q319R		Q443E	-1	1,09	1,51
17	Q97E	Q319R		Q443R	1	1,00	1,42
18	Q97E	Q319R			0	0,87	1,78
19	Q97E		Q358E	Q443E	-3	1,22	0,88
21	Q97E		Q358E		-2	1,12	0,88
22	Q97E		Q358R	Q443E	-1	0,91	1,16
23	Q97E		Q358R	Q443R	1	0,78	1,25
24	Q97E		Q358R		0	1,08	1,14
25	Q97E			Q443E	-2	1,12	1,00
28	Q97R	Q319E	Q358E	Q443E	-2	0,78	1,87
29	Q97R	Q319E	Q358E	Q443R	0	0,80	1,81
30	Q97R	Q319E	Q358E		-1	0,68	2,21
31	Q97R	Q319E	Q358R	Q443E	0	0,68	1,96
32	Q97R	Q319E	Q358R	Q443R	2	0,70	2,05
33	Q97R	Q319E	Q358R		1	0,60	2,27
34	Q97R	Q319E		Q443E	-1	0,65	2,25
35	Q97R	Q319E		Q443R	1	0,70	2,15
36	Q97R	Q319E			0	0,73	2,23
37	Q97R	Q319R	Q358E	Q443E	0	0,93	2,11
38	Q97R	Q319R	Q358E	Q443R	2	0,65	2,21
39	Q97R	Q319R	Q358E		1	0,82	2,22
40	Q97R	Q319R	Q358R	Q443E	2	0,74	2,28
41	Q97R	Q319R	Q358R	Q443R	4	0,55	2,09

Variante #	97	319	358	443	Carga	ppm rel	Ativ. esp. rel.
42	Q97R	Q319R	Q358R		3	0,67	2,48
43	Q97R	Q319R		Q443E	1	0,84	2,35
44	Q97R	Q319R		Q443R	3	0,73	2,41
45	Q97R	Q319R			2	0,76	2,45
46	Q97R		Q358E	Q443E	-1	0,79	1,45
47	Q97R		Q358E	Q443R	1	0,75	1,42
48	Q97R		Q358E		0	0,82	1,46
49	Q97R		Q358R	Q443E	1	0,67	1,69
50	Q97R		Q358R	Q443R	3	0,60	1,60
51	Q97R		Q358R		2	0,64	1,29
52	Q97R			Q443E	0	0,83	1,43
54	Q97R				1	0,72	1,49
55		Q319E	Q358E	Q443E	-3	0,99	1,15
56		Q319E	Q358E	Q443R	-1	0,77	1,40
57		Q319E	Q358E		-2	0,83	1,34
58		Q319E	Q358R	Q443E	-1	0,73	1,49
59		Q319E	Q358R	Q443R	1	0,67	1,61
60		Q319E	Q358R		0	0,80	1,67
61		Q319E		Q443E	-2	0,91	1,39
62		Q319E		Q443R	0	0,73	1,45
63		Q319E			-1	0,75	1,41
64		Q319R	Q358E	Q443E	-1	1,05	1,28
65		Q319R	Q358E	Q443R	1	0,94	1,42
66		Q319R	Q358E		0	0,96	1,39
67		Q319R	Q358R	Q443E	1	1,02	1,50
68		Q319R	Q358R	Q443R	3	0,71	1,57
69		Q319R	Q358R		2	0,71	1,58
70		Q319R		Q443E	0	0,91	1,49
72		Q319R			1	0,95	1,56
77			Q358R	Q443R	2	0,67	1,22
78			Q358R		1	0,66	1,15

Exemplo 19. Efeitos de Balanceamento Mutacional sobre a Atividade e Expressão de Amilase

Este Exemplo ilustra que duas propriedades de enzima conflitantes podem ser simultaneamente otimizadas pela introdução de múltiplas substituições de aminoácido.

Como determinado durante o desenvolvimento da presente in-

venção, a expressão mediana de AmyS-242Q diminuiu com o aumento da carga positiva. Entretanto, a hidrólise de BODIPY-amido específica aumentou com o aumento da carga positiva. A expressão de amilase recombinante e a hidrólise de amido aumentadas são desejáveis em uma variante engendrada de AmyS-242Q adequada para a liquefação de amido na indústria de etanol combustível ou limpeza em aplicações detergentes por exemplo. Estas propriedades, entretanto, são propriedades aparentemente conflitantes. Como determinado durante o desenvolvimento da presente invenção, usando os métodos da presente invenção, é possível produzir uma variante de amilase mais altamente expressa sem comprometer severamente a hidrólise de amido pela combinação seletiva de mutações únicas. A estratégia descrita neste pedido foi usada com sucesso para produzir e selecionar variantes de AmyS-242Q múltiplo-substituídas tendo melhora em uma primeira propriedade (*por exemplo*, Expressão como a propriedade primária), ao melhorar ou não sacrificar uma segunda propriedade (*por exemplo*, hidrólise de amido como a propriedade secundária).

Além disso, em oposto à expressão mediana de variantes de AmyS-242Q, a limpeza de microamostra de amido de milho aumentou com o aumento da carga positiva. Expressão de amilase recombinante e desempenho de limpeza aumentados são desejáveis em uma variante de AmyS-242Q engendrada. Estas propriedades, entretanto, são também propriedades aparentemente conflitantes. Como determinado durante o desenvolvimento da presente invenção, usando os métodos da presente invenção, é possível produzir uma variante de amilase mais altamente expressa sem comprometer severamente o desempenho de limpeza pela combinação seletiva de mutações únicas. A estratégia descrita neste pedido foi usada com sucesso para produzir e selecionar variantes de AmyS-242Q múltiplo-substituídas tendo melhoras em uma primeira propriedade (*por exemplo*, expressão como a propriedade primária), ao melhorar ou não sacrificar uma segunda propriedade (*por exemplo*, limpeza de microamostra de amido de arroz como a propriedade secundária).

Em particular, uma biblioteca combinatória de carga (CCL) de

- AmyS-S242Q de oitenta membros compreendendo variantes tendo combinações de uma a quatro substituições de resíduos carregados foi testada para expressão em tubo de agitação, hidrólise de BODIPY-amido e atividade de limpeza de amido de arroz. Os favorecidos de AmyS-S242Q são mostrados nas Tabelas 19-1 e 19-2. Curiosamente, as variantes múltiplo-substituídas da Tabela 19-1 têm expressão igual ou melhorada e hidrólise de BODIPY-amido igual ou melhorada em comparação com a enzima parental. Similarmente, as variantes múltiplo-substituídas da Tabela 19-2 têm expressão igual ou melhorada e atividade de limpeza de amido de arroz igual ou melhorada em comparação com a enzima parental.

TABELA 19-1. Expressão de AmyS-S242Q e Favorecidos de Hidrólise de BODIPY-Amido							
Va-riante	97	319	358	443	Carga	Expressão (PI)	BODIPY (PI)
1	Q97E	Q319E	Q358E	Q443E	-4	1,27	1,29
2	Q97E	Q319E	Q358E	Q443R	-2	1,19	1,31
3	Q97E	Q319E	Q358E		-3	1,00	1,43
4	Q97E	Q319E	Q358R	Q443E	-2	1,23	1,43
7	Q97E	Q319E		Q443E	-3	1,40	1,41
8	Q97E	Q319E		Q443R	-1	1,12	1,58
9	Q97E	Q319E			-2	1,09	1,56
10	Q97E	Q319R	Q358E	Q443E	-2	1,45	1,32
11	Q97E	Q319R	Q358E	Q443R	0	1,32	1,49
12	Q97E	Q319R	Q358E		-1	1,58	1,27
16	Q97E	Q319R		Q443E	-1	1,09	1,51
17	Q97E	Q319R		Q443R	+1	1,00	1,42
24	Q97E		Q358R		0	1,08	1,14
25	Q97E			Q443E	-2	1,12	1,00
64		Q319R	Q358E	Q443E	-1	1,05	1,28
67		Q319R	Q358R	Q443E	+1	1,02	1,50

TABELA 19-2. Expressão de AmyS-S242Q e Favorecidos de Hidrólise de Amido de Arroz							
Va-riante	97	319	358	443	Carga	Expressão	CS-28
1	Q97E	Q319E	Q358E	Q443E	-4	1,27	1,01
11	Q97E	Q319R	Q358E	Q443R	0	1,32	1,18
12	Q97E	Q319R	Q358E		-1	1,58	1,13
16	Q97E	Q319R		Q443E	-1	1,09	1,43
17	Q97E	Q319R		Q443R	+1	1,00	1,55

TABELA 19-2. Expressão de AmyS-S242Q e Favorecidos de Hidrólise de Amido de Arroz							
Va-riante	97	319	358	443	Carga	Expressão	CS-28
24	Q97E		Q358R		0	1,08	1,15
25	Q97E			Q443E	-2	1,12	1,09
64		Q319R	Q358E	Q443E	-1	1,05	1,18
67		Q319R	Q358R	Q443E	+1	1,02	1,15

Em suma, porque atividade enzimática e a produção de enzima têm dependências diferentes de carga (ver figuras 27A, 27B, 28A e 28B) são negativamente correlacionadas (Ver as figuras 26A e 26B). Entretanto, há diversas variantes que são melhoradas tanto em expressão como em atividade, e a análise da biblioteca desta maneira as permite ser identificadas.

Embora demonstrado com amilases, este método é aplicável a outras classes de enzima, tais como proteases, lipases, celulasas, transferases e pectinases. Além disso, qualquer combinação de duas ou mais propriedades pode ser analisada simultaneamente, tal como expressão, atividade, ligação, estabilidade térmica, detergente e estabilidade quelante.

Exemplo 20 - Limpeza de microamostra e hidrólise de amido

O desempenho enzimático foi avaliado usando detergentes inativados por calor como descrito acima. Os ensaios foram realizados como descrito acima no Exemplo 12 (ver Ensaio de Microamostra de Amido de Arroz para teste do Ensaio de Bodipy-amido e Desempenho de Amilase para Determinação da Atividade de Amilase). Os favorecidos são definidos aqueles que têm Índice de Desempenho (PI) maior que 1. PI é a razão da atividade residual mutante pela atividade residual selvagem. A tabela 20-1 mostra os cálculos de variantes de AmyS que são melhores do que as selvagens ($\Delta \Delta G < 0$) em comparação com o grande número de alteração de carga (Δ CARGA). Modificação de carga, Kyte-Doolittle, Eisenberg e ligação de hidrogênio são definidos no WO 2008/153925, depositado em 6 de junho de 2008. Além disso, a Tabela 20-1 mostra os resultados de hidropaticidade de Kyte-Doolittle (Δ K-D) e escalas de hidrofobicidade de Eisenberg (Δ E). A Tabela 20-1 também mostra valores da ligação de hidrogênio (Δ HB), com um escore de -2 significando a perda da capacidade de ligação de hidrogê-

5 nio. A Tabela 20-1 mostra os cálculos de variantes de AmyS que são melho-
res do que a selvagem para hidrólise de farinha de milho em 5, 10 e 60 mi-
nutos (CF5, CF10, CF60), atividade sobre substratos DP7 em pH 4,0 e 5,8
(pH 4, pH 5,8), limpeza de amido de arroz em pH 8,6 e 10 (Limpeza 8 e Lim-
peza 10), e expressão proteica em *B. subtilis* (EXP). O efeito da carga sobre
a atividade tem direção oposta ao efeito da carga sobre a expressão. Liga-
ção de hidrogênio e hidrofobicidade também demonstram efeitos estatisti-
camente relevantes sobre estas propriedades. Claramente, propriedades de
substituições de aminoácido, tais como carga e hidrofobicidade podem afetar
10 os níveis de expressão em *B. subtilis* e *E. coli*, bem como atividade básica e
estabilidade de proteínas.

TABELA 20-1. Quintil de AmyS para Múltiplas Propriedades

AmyS	o/e	AmyS	o/e	AmyS	o/e	AmyS	o/e
CF5 $\Delta\Delta G$		CF5 $\Delta\Delta G$		CF5 $\Delta\Delta G$		CF5 $\Delta\Delta G$	
Δ CARGA -2	1,60	Δ HB -2	0,84	Δ K-D -2	1,12	Δ E -2	1,13
Δ CARGA -1	1,29	Δ HB -1	0,98	Δ K-D -1	1,19	Δ E -1	1,09
Δ CARGA 0	0,97	Δ HB 0	1,02	Δ K-D 0	0,83	Δ E 0	1,05
Δ CARGA +1	0,84	Δ HB +1	0,92	Δ K-D +1	1,15	Δ E +1	0,89
Δ CARGA +2	0,56	Δ HB +2	1,19	Δ K-D +2	0,77	Δ E +2	1,12
CF10 $\Delta\Delta G$		CF10 $\Delta\Delta G$		CF10 $\Delta\Delta G$		CF10 $\Delta\Delta G$	
Δ CARGA -2	1,66	Δ HB -2	0,86	Δ K-D -2	1,10	Δ E -2	1,26
Δ CARGA -1	1,18	Δ HB -1	1,00	Δ K-D -1	1,15	Δ E -1	1,04
Δ CARGA 0	0,97	Δ HB 0	1,02	Δ K-D 0	0,86	Δ E 0	1,08
Δ CARGA +1	0,91	Δ HB +1	0,97	Δ K-D +1	1,12	Δ E +1	0,90
Δ CARGA +2	0,77	Δ HB +2	1,12	Δ K-D +2	0,82	Δ E +2	1,16
CF60 $\Delta\Delta G$		CF60 $\Delta\Delta G$		CF60 $\Delta\Delta G$		CF60 $\Delta\Delta G$	
Δ CARGA -2	1,46	Δ HB -2	1,00	Δ K-D -2	0,94	Δ E -2	0,98
Δ CARGA -1	1,33	Δ HB -1	0,96	Δ K-D -1	1,15	Δ E -1	1,01
Δ CARGA 0	0,96	Δ HB 0	1,01	Δ K-D 0	0,79	Δ E 0	1,05
Δ CARGA +1	0,84	Δ HB +1	0,95	Δ K-D +1	1,16	Δ E +1	0,94
Δ CARGA +2	0,82	Δ HB +2	1,05	Δ K-D +2	0,89	Δ E +2	1,54
pH4 $\Delta\Delta G$		pH4 $\Delta\Delta G$		pH4 $\Delta\Delta G$		pH4 $\Delta\Delta G$	
Δ CARGA -2	1,63	Δ HB -2	0,91	Δ K-D -2	1,29	Δ E -2	1,07
Δ CARGA -1	1,28	Δ HB -1	0,89	Δ K-D -1	1,19	Δ E -1	1,13

TABELA 20-1. Quintil de AmyS para Múltiplas Propriedades							
Δ CARGA 0	0,96	Δ HB 0	0,97	Δ K-D 0	0,72	Δ E 0	1,01
Δ CARGA +1	0,88	Δ HB +1	0,93	Δ K-D +1	1,12	Δ E +1	0,89
Δ CARGA +2	0,19	Δ HB +2	1,26	Δ K-D +2	0,86	Δ E +2	0,95
pH5,8 $\Delta\Delta$ G Δ CARGA -2	1,66	pH5,8 $\Delta\Delta$ G Δ HB -2	0,99	pH5,8 $\Delta\Delta$ G Δ K-D -2	1,00	pH5,8 $\Delta\Delta$ G Δ E -2	1,23
Δ CARGA -1	1,26	Δ HB -1	0,99	Δ K-D -1	1,17	Δ E -1	1,06
Δ CARGA 0	0,95	Δ HB 0	0,95	Δ K-D 0	0,80	Δ E 0	0,99
Δ CARGA +1	0,94	Δ HB +1	0,90	Δ K-D +1	1,08	Δ E +1	0,94
Δ CARGA +2	0,83	Δ HB +2	1,15	Δ K-D +2	0,92	Δ E +2	1,16
Clean8 $\Delta\Delta$ G Δ CARGA -2	1,34	Clean8 $\Delta\Delta$ G Δ HB -2	1,07	Clean8 $\Delta\Delta$ G Δ K-D -2	0,89	Clean8 $\Delta\Delta$ G Δ E -2	0,88
Δ CARGA -1	1,22	Δ HB -1	1,02	Δ K-D -1	1,10	Δ E -1	0,98
Δ CARGA 0	0,96	Δ HB 0	0,96	Δ K-D 0	0,83	Δ E 0	1,00
Δ CARGA +1	0,94	Δ HB +1	0,90	Δ K-D +1	1,07	Δ E +1	1,01
Δ CARGA +2	0,62	Δ HB +2	1,05	Δ K-D +2	1,02	Δ E +2	1,32
Clean10 $\Delta\Delta$ G Δ CARGA -2	1,32	Clean10 $\Delta\Delta$ G Δ HB -2	0,86	Clean10 $\Delta\Delta$ G Δ K-D -2	1,03	Clean10 $\Delta\Delta$ G Δ E -2	0,81
Δ CARGA -1	1,43	Δ HB -1	1,36	Δ K-D -1	1,11	Δ E -1	1,03
Δ CARGA 0	0,92	Δ HB 0	0,72	Δ K-D 0	0,80	Δ E 0	1,00
Δ CARGA +1	0,88	Δ HB +1	1,07	Δ K-D +1	1,16	Δ E +1	0,97
Δ CARGA +2	0,74	Δ HB +2	1,11	Δ K-D +2	0,91	Δ E +2	1,48
EXP $\Delta\Delta$ G Δ CARGA -2	0,00	EXP $\Delta\Delta$ G Δ HB -2	0,63	EXP $\Delta\Delta$ G Δ K-D -2	0,65	EXP $\Delta\Delta$ G Δ E -2	0,71
Δ CARGA -1	0,35	Δ HB -1	0,91	Δ K-D -1	1,11	Δ E -1	1,29
Δ CARGA 0	1,08	Δ HB 0	0,95	Δ K-D 0	1,49	Δ E 0	1,06
Δ CARGA +1	1,35	Δ HB +1	1,39	Δ K-D +1	0,77	Δ E +1	0,79
Δ CARGA +2	1,64	Δ HB +2	1,16	Δ K-D +2	0,72	Δ E +2	0,20

Exemplo 21. Modulação do Perfil da Atividade de pH de uma Enzima

Este Exemplo descreve o uso de mutações de carga de superfície para otimizar o perfil de atividade de pH de uma enzima em uma dada reação. A figura 31A mostra a atividade de limpeza de microamostra de amido de arroz como uma função do pH da primeira escala de AmyS do Exem-

plo 15. A faixa de pH de 3,0 a 4,25 era em formato de Na 200 mM contendo Tween-80 0,01%, enquanto a faixa de pH de 4,25 a 5,5 era em acetato de Na 200 mM contendo Tween-80 0,01%. Os dados são ajustados a curvas de titulação, cada um com um valor de pKa único. A figura 31B mostra um pKa
 5 aparente da catálise de AmyS como uma função alteração de carga para a primeira escala de AmyS do Exemplo 15. Estes dados demonstram que os perfis de atividade de pH de uma α -amilase podem ser significativamente deslocados por mutações de carga superficial, até em tampão 200 mM. Embora isto tivesse sido relatado em força iônica muito baixa para subtilisina
 10 (Russell *et al.* (1987) *J Mol Biol.* 193: 803-13) e para D-xilose isomerase (Cha *et al.* (1998) *Mol. Cell* 8:374-82), acredita-se ser a primeira vez que foi realizado com α -amilase, e, surpreendentemente, até em alta força iônica.

Exemplo 22. Superrastreamento de AmyS

Os seguintes ensaios foram usados nos exemplos descritos abaixo. Qualquer desvio dos protocolos fornecidos abaixo é indicado nos exemplos. Nestes experimentos, um espectrofotômetro de 96 poços foi usado para medir a absorvância dos produtos formados após realização das reações.

Ensaio de Hidrólise de Amido para Determinação da Atividade e Estabilidade Térmica Específicas

O ensaio de atividade de α -amilase em farinha de milho foi realizado para medir a atividade e estabilidade específica de AmyS de *B. subtilis* e variantes de AmyS. As condições que mimetizam estritamente aplicações do mundo real em limpeza e processamento de grão foram usadas. A atividade é definida como extremidades redutoras geradas devido ao exaurimen-
 25 to enzimático da farinha de milho, determinada pelo método PAHBAH (hidrazida de ácido *p*-hidroxibenzoico). A estabilidade é definida como atividade sustentada a 85°C.

Hardware: Inheco Variomag Teleshake 95 com adaptador de
 30 placa de PCR, Thermo Electron Multidrop, placa de PCR de saia inteira Axygen PCR-96-FS-C, Termocicladores - com um mínimo de 4 blocos de 96 poços (MJ Research Tetrad), operadores de líquido Biomek FX.

Hidrólise de Amido: Farinha de Milho Orgânica de Azure Farms, peneirada para fins de manuseio líquido foi usada para obtenção da fração < 600 micron, cozida 4 horas a 80°C, então permitida equilibrar durante a noite à temperatura ambiente. A suspensão 2% p/p foi preparada em lotes de 500 g e 1000 g. A suspensão foi agitada energeticamente e continuamente durante o ajuste de pH, equilíbrio de pH e transferência do béquer para a placa de PCR. Para 1.000 g, 23 g farinha de milho pré-assada e 977 g de água deionizada local foram agitados por 15 minutos, ajustados com H₂SO₄ ao pH 5,8, e permitidos equilibrar por 30 minutos, ponto o qual um ajuste de pH final seria realizado se necessário. Pipetas de 8 canais com ponteiros cortadas para um tamanho inicial de aproximadamente 1,5 mm foram usadas para entregar a suspensão nas placas de poços Axygen PCR.

Os sobrenadantes de cultura de AmyS e variantes de AmyS foram diluídos a aproximadamente 1 µg/mL no tampão de diluição (água + Tween-80 0,005%) e 10 µL de sobrenadante diluído foram transferidos para as placas de reação por 5 minutos, 10 minutos e 60 minutos e misturados uma vez por pipetagem da amostra para cima e para baixo. Uma alíquota de 50 µL de óleo mineral leve foi transferida para cada um dos poços. As placas foram transferidas para as unidades Inheco pré-aquecidas a 85°C. Nos pontos de tempo indicados após incubação (5, 10 e 60 minutos), a reação de hidrólise de amido foi parada pela adição de 10 µL de NaOH 4N a cada um dos poços. Os produtos de reação de hidrólise de amido foram analisados pelo ensaio PAHBAH.

Ensaio de PAHBAH: Alíquotas de 80 µL de NaOH 0,5 N foram adicionadas a todos os poços de uma placa de PCR vazia seguido por 20 µL do reagente PAHBAH (hidrazida de ácido *p*-hidroxibenzoico 5% p/v (PAHBAH, Sigma # H9882, dissolvido em HCl 0,5 N) e misturados por pipetagem para cima e para baixo (placa de reação de PAHBAH). 10 µL dos sobrenadantes de reação de hidrólise de amido foram adicionados à placa de reação PAHBAH. Todas as placas foram seladas e colocadas no termociclador, programadas por 2 minutos a 95°C, e então resfriadas a 20°C. Amostras de 80 µL das misturas de reação PAHBAH desenvolvidas foram transferidas

para uma placa nova (lida) e a absorvância foi medida em 405 nm em um espectrofotômetro.

Ensaio de Limpeza de Amostra para Desempenho de Remoção de Mancha

5 Neste ensaio, o desempenho de remoção de mancha de AmyS de *B. subtilis* e variantes de AmyS foi determinado em uma escala de placa de microtítulo usando microamostras de mancha de amido de arroz CS-28. Microamostras de 6,4 mm de diâmetro circular foram obtidas de CFT Vlaardingen (Holanda). Duas microamostras foram colocadas em cada um dos poços de uma placa de microtitulação de 96 poços.

10 As amostras de caldo de cultura filtradas foram testadas em uma concentração apropriada pela diluição com uma mistura de NaCl 10 mM, CaCl_2 0,1 mM, Tween-80 0,005% a 20x a concentração final desejada no teste de desempenho (conc. final no teste 0,025 a 0,10 ppm).

15 O desempenho de amilase foi medido tanto em pH 8 como em pH 10.

190 μL de solução tamponada, contendo 25 mM HEPES (Sigma, H7523), CaCl_2 2 mM, Tween-80 0,005%, pH 8,0, ou 190 μL de solução tamponada, contendo CAPS 25 mM (Sigma, C2632), CaCl_2 2 mM, Tween-80 0,005%, pH 10,0 foram adicionados a cada um dos poços das placas con-
20 tendo as microamostras. 10 μL de amostras de amilase diluídas foram adicionados a cada poço contendo a microamostra (para fornecer um volume total de 200 μL /poço). A placa foi recoberta com um selo de placa e colocada em uma incubadora por 60 minutos a 40°C, com agitação em 1150 rpm (incubadora iEMS). Seguinte a incubação sob condições apropriadas, 100
25 μL da solução de cada um dos poços foram removidos, colocados em uma placa de microtítulo fresca e a absorvância foi medida em 488 nm em um espectrofotômetro. "Controles brancos", contendo 2 microamostras por poço e detergente, mas nenhuma amostra de amilase também foram incluídos no teste.

30 Cálculo de desempenho de hidrólise de amido de arroz CS-28: O valor de absorvância obtido foi corrigido pelo valor do branco (microamostras incubadas na ausência da enzima). A absorvância resultante - ΔDO_{488}

- foi uma medida da atividade amilolítica. Para cada amostra (AmyS ou variante de AmyS), o índice de desempenho foi calculado pela divisão da atividade da variante pela atividade da enzima selvagem. O índice de desempenho comparou o desempenho da variante (valor real) e da enzima de referência de AmyS padrão (valor teórico) na mesma concentração proteica.

Um índice de desempenho (PI) é maior do que 1 ($PI > 1$) identificou uma variante melhor (em comparação com o padrão, *por exemplo*, selvagem), enquanto um PI de 1 ($PI = 1$) identificou uma variante que atua semelhante ao padrão, e um PI que é menor que 1 ($PI < 1$) identificou uma variante que atua pior do que o padrão. Dessa forma, o PI identificou variantes com diferenças de desempenho em relação à enzima selvagem.

As seguintes variantes de sítio foram avaliadas usando os ensaios descritos neste Exemplo:

- P17A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
- 15 D19A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
- T21A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
- N28A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
- S51A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
- G72A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
- 20 V74A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y
- A82A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
- Q86A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
- Q89A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y
- A93A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
- 25 W115D,E,F,G,K,L,N,P,Q,R,S,V,Y
- D117A,E,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
- P123A,D,E,G,K,L,M,P,Q,R,S,T,V
- S124A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,Y
- D125A,D,E,G,K,M,Q,R,S,T,V
- 30 N127A,C,D,F,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
- I130A,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
- G132A,C,D,E,F,G,H,L,M,N,P,R,S,T,V,W,Y

- Q135A,F,G,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,Y
P145A,D,E,F,H,I,K,L,N,P,R,S,T,V,Y
G146A,C,D,E,G,H,K,L,P,R,S,T,V,W
G148A,C,D,E,F,G,H,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
5 S153A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Y159A,C,D,E,F,G,H,K,L,N,R,S,T,V,W
W166C,E,F,G,H,I,K,L,M,P,R,S,T,V,Y
S169A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,Y
K171C,D,E,G,H,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
10 R179A,G,H,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
G180A,C,D,F,G,H,I,K,L,N,P,R,S,T,V,Y
I181A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,P,R,S,T,V,Y
G182A,C,D,E,F,G,H,K,L,P,R,S,T,V,Y
K183A,C,E,F,G,H,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
15 W187A, C, E,G,I,K,L,N,P,Q,R,S,V,W
G194A,E,G,H,K,L,M,P,R,S,T,V,W
P209A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
N224A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
S242A,C,D,G,I,K,L,M,Q,R,S,T,V
20 P245A,C,D,E,F,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y
G256A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,T,V,W
D269A,C,D,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,Y
N271A,D,F,H,I,K,L,M,N,P,S,T,V,W,Y
T278A,E,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,T,W,Y
25 N281A,D,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y
G302C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
A304A,D,E,F,H,L,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
R308A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
T321A,C,F,H,I,L,P,Q,R,S,T,V,Y
30 Q358A,C,D,E,F,G,H,L,M,N,P,Q,R,S,T,V
P378C,D,F,G,H,I,L,N,P,R,S,T,V,Y
S382A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,T,V,W

- K383A,C,D,E,F,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
 T398A,C,D,E,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V
 H405A,C,D,F,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
 T417A,D,E,H,I,L,M,P,Q,R,S,T,V,W
 5 E418A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y
 P420A,C,D,E,H,I,L,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
 G421A,D,E,F,G,H,I,L,N,P,Q,R,S,T,W,Y
 P432A,D,E,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,Y
 W437C,D,E,F,G,H,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y
 10 Q443A,C,F,G,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
 G446A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
 G454A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,T,V
 S457A,C,D,E,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
 T459A,D,G,I,K,L,Q,R,S,T,V,Y
 15 T461A,D,E,F,G,I,K,L,N,P,R,S,T,V,W,Y
 S464D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,V,W,Y
 G474A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V
 R483A,C,F,G,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y

Exemplo 23. Desempenho de variantes de AmyS

- 20 O desempenho de variantes de AmyS (*por exemplo*, como descrito no Exemplo 22) foi testado para expressão proteica (expressão), hidrólise de farinha de milho por 10 minutos (Farinha de Milho 10) ou hidrólise de farinha de milho por 60 minutos (Farinha de Milho 60), atividade sobre o substrato DP7 em pH 4 (DP7 pH 4) ou atividade sobre o substrato DP7 em
- 25 pH 5,8 (DP7 pH 5,8), e limpeza de microamostra manchada com amido de arroz CS 28 em pH 8 (limpeza pH 8) ou limpeza de microamostra manchada com amido de arroz CS em pH 10 (limpeza 10). Os resultados são mostrados na Tabela 23-1. A expressão proteica foi medida pelo ensaio de Bradford descrito no Exemplo 12. Ensaio de hidrólise de farinha de milho e de
- 30 amostra de limpeza foram realizados como descrito no Exemplo 22. Funcionalidade das variantes de AmyS foi quantificada como um índice de desempenho (*PI*) (*isto é*, a razão de desempenho de uma variante em relação à

AmyS selvagem). Um $PI > 1$ para qualquer propriedade indica que a variante é melhorada (comparada ao controle) para aquela propriedade. ND indica que o valor obtido estava fora da faixa do ensaio.

TABELA 23-1: Desempenho das Variantes de AmyS								
Po- sição	Va- riante	Farin- ha de Milho 10	Farin- ha de Milho 60	DP7 pH 4	DP7 pH 5,8	Limpe- za pH 8	Limpe- za pH 10	Ex- pressão
017	P017A	1,08	1,07	1,13	1,32	1,35	1,04	0,58
017	P017C	1,38	1,46	1,20	1,41	1,47	1,29	0,50
017	P017D	1,30	1,30	1,02	1,24	1,33	1,10	0,58
017	P017E	1,07	1,20	1,03	1,18	1,29	1,04	0,70
017	P017F	0,95	1,10	0,84	0,95	1,37	0,83	0,59
017	P017G	0,90	0,83	0,83	0,90	1,04	0,84	0,88
017	P017H	0,91	0,84	1,03	1,03	1,07	0,86	0,96
017	P017I	0,78	0,83	0,79	0,91	0,83	0,77	0,87
017	P017K	0,88	0,64	0,83	0,96	1,11	0,88	0,90
017	P017L	0,69	0,64	0,44	0,32	0,91	0,92	0,67
017	P017M	1,19	1,46	1,13	1,32	1,58	0,83	0,50
017	P017N	1,05	1,16	1,13	1,30	1,14	0,81	0,70
017	P017Q	1,24	1,31	1,19	1,21	1,09	0,90	0,73
017	P017R	1,21	1,23	0,93	1,13	1,40	1,01	0,71
017	P017S	0,97	0,85	0,78	0,84	1,00	0,87	0,76
017	P017T	0,81	0,91	0,68	0,75	1,12	0,73	0,76
017	P017V	0,79	0,79	0,70	0,75	0,94	0,82	0,81
017	P017W	0,81	0,77	0,70	0,82	0,89	0,77	0,75
017	P017Y	0,75	0,79	0,98	0,97	1,01	0,95	0,96
019	D019A	1,50	1,69	1,29	1,55	2,01	1,42	0,48
019	D019C	1,34	1,49	1,29	1,47	1,59	1,25	0,51
019	D019E	1,39	1,38	1,41	1,48	1,69	1,40	0,67
019	D019F	3,22	3,51	0,75	0,87	6,54	3,43	0,10
019	D019G	1,20	1,29	1,19	1,20	0,98	1,22	0,75

019	D019H	0,93	0,97	0,91	1,05	1,32	0,98	0,93
019	D019I	1,13	0,90	0,93	1,05	1,82	0,96	0,38
019	D019K	0,90	0,81	0,97	1,09	0,93	0,91	0,99
019	D019L	0,84	0,65	-0,65	-0,23	1,79	1,94	0,13
019	D019M	1,60	1,98	1,07	1,40	1,63	1,41	0,35
019	D019N	1,34	1,16	1,69	1,23	1,20	1,06	0,71
019	D019P	0,93	1,14	1,00	1,27	1,56	1,32	0,53
019	D019Q	1,35	1,24	1,94	1,65	1,31	1,20	0,74
019	D019R	1,02	1,05	0,94	1,03	1,44	1,12	0,80
019	D019S	1,03	1,12	1,08	1,12	1,09	0,89	0,95
019	D019T	1,04	1,06	1,07	1,11	1,22	0,89	0,97
019	D019V	1,05	1,28	1,07	1,27	2,16	1,52	0,36
019	D019W	0,64	0,93	0,52	0,71	1,24	0,81	0,56
019	D019Y	0,98	1,10	1,43	1,32	1,34	1,03	0,69
021	T021A	1,25	1,34	1,36	1,50	1,41	1,19	0,75
021	T021C	1,59	1,73	1,42	1,58	1,79	1,26	0,49
021	T021D	1,23	1,39	1,63	1,54	1,48	1,27	0,78
021	T021E	1,32	1,35	1,53	1,59	1,48	1,05	0,72
021	T021F	1,26	1,36	1,66	1,48	1,42	1,11	0,71
021	T021G	1,11	1,14	1,35	1,29	1,24	1,05	0,91
021	T021H	0,87	0,85	0,95	0,98	1,08	0,86	1,10
021	T021I	1,04	1,04	1,31	1,31	1,57	1,14	0,71
021	T021K	0,89	0,88	1,02	1,07	1,02	1,01	1,07
021	T021L	0,80	0,92	1,33	1,20	1,08	0,88	0,89
021	T021M	1,37	1,40	1,34	1,55	1,48	1,34	0,75
021	T021N	1,36	1,42	1,28	1,47	1,23	1,16	0,75
021	T021P	1,13	1,25	1,14	1,27	1,30	1,20	0,82
021	T021Q	1,32	1,42	1,50	1,55	1,33	1,20	0,79
021	T021R	1,17	1,26	1,14	1,21	1,23	1,11	0,86
021	T021S	1,08	1,28	1,09	1,17	1,12	0,97	0,91
021	T021V	1,10	1,19	1,12	1,24	1,35	0,95	0,73

021	T021W	0,98	1,01	0,91	0,95	1,17	1,11	0,75
021	T021Y	0,81	0,89	1,02	1,07	1,03	0,62	0,87
028	N028A	1,28	1,51	1,24	1,42	1,64	1,39	0,74
028	N028C	-0,92	-2,93	1,18	0,31	1,18	2,17	-0,05
028	N028D	1,29	1,39	1,69	1,63	1,37	1,23	0,77
028	N028E	1,26	1,36	1,21	1,38	1,21	1,06	0,79
028	N028F	1,29	1,34	1,16	1,35	1,48	1,26	0,54
028	N028G	0,98	1,05	0,99	1,08	0,98	0,81	1,06
028	N028H	0,98	1,09	1,06	1,18	1,20	1,01	0,94
028	N028I	0,88	1,02	0,86	0,97	1,17	0,87	0,71
028	N028K	0,93	0,95	1,01	1,09	0,84	0,94	0,98
028	N028L	0,79	1,00	0,91	1,02	1,11	0,87	0,74
028	N028M	1,48	1,67	1,62	1,79	2,01	1,57	0,53
028	N028P	1,47	1,60	2,00	2,47	1,89	1,47	0,48
028	N028Q	1,19	1,23	1,01	1,18	1,20	1,24	0,75
028	N028R	1,11	1,07	1,10	1,27	1,38	1,10	0,80
028	N028S	1,11	1,23	0,98	1,08	1,03	0,94	0,91
028	N028T	1,13	1,22	1,07	1,21	1,22	0,99	0,84
028	N028V	0,98	0,97	1,12	1,13	1,35	0,90	0,75
028	N028W	1,00	1,05	0,92	1,08	1,25	0,92	0,65
028	N028Y	0,92	1,00	0,87	0,88	1,13	0,76	0,86
051	S051A	1,01	0,99	1,39	1,21	1,11	1,14	0,97
051	S051C	0,96	1,01	1,06	1,36	0,91	0,51	0,80
051	S051D	0,94	1,00	1,34	1,42	0,95	1,07	0,97
051	S051E	0,71	0,64	1,10	1,25	0,79	1,02	1,11
051	S051F	0,96	0,93	1,04	1,29	1,06	1,06	0,89
051	S051G	0,83	0,77	0,81	0,82	0,80	1,09	1,24
051	S051H	0,74	0,70	0,56	0,86	0,93	0,99	1,20
051	S051I	0,75	0,73	0,80	0,83	0,82	0,74	1,18
051	S051K	0,62	0,58	0,54	0,67	0,68	0,82	1,39
051	S051L	0,71	0,72	0,85	0,88	0,74	0,83	1,41

051	S051M	0,97	1,00	1,24	1,26	1,11	1,01	0,94
051	S051N	1,04	1,05	0,99	1,02	0,64	1,02	0,96
051	S051P	0,81	0,79	0,31	1,23	1,22	0,78	0,75
051	S051Q	1,01	0,96	1,07	1,08	1,07	1,06	1,03
051	S051R	0,88	0,88	0,66	0,89	0,92	1,09	1,02
051	S051T	0,89	0,80	0,76	0,79	0,96	0,91	1,17
051	S051V	0,78	0,70	0,70	0,75	0,86	0,78	1,21
051	S051W	0,81	0,76	0,81	0,94	0,87	0,81	1,17
051	S051Y	0,70	0,76	0,98	0,96	0,83	0,93	1,16
072	G072A	1,53	1,40	1,25	1,36	1,46	1,46	0,65
072	G072C	1,53	1,39	1,52	1,68	1,40	1,20	0,61
072	G072D	1,36	1,38	1,69	1,72	1,36	1,59	0,78
072	G072E	0,13	0,59	0,75	0,39	-0,18	-0,75	-0,19
072	G072F	0,07	0,74	1,79	0,84	0,39	0,30	-0,07
072	G072H	0,97	0,96	0,95	1,09	1,05	1,11	0,98
072	G072I	12,27	-18,04	-7,88	-5,43	-47,34	-40,91	0,00
072	G072K	0,20	-2,21	-4,25	-2,09	3,20	-0,46	0,04
072	G072L	0,21	-1,59	-3,13	-1,59	-0,59	-0,13	0,04
072	G072M	0,09	0,37	0,78	0,27	0,06	0,01	-0,16
072	G072N	-0,09	0,41	0,34	0,12	0,01	0,12	-0,17
072	G072P	-0,20	0,29	1,24	0,48	0,06	-0,23	-0,11
072	G072Q	1,68	1,60	1,60	1,66	1,62	1,60	0,68
072	G072R	1,23	1,19	0,83	1,05	1,06	1,42	0,80
072	G072S	0,77	-1,60	-0,59	2,54	0,70	8,99	-0,01
072	G072T	0,93	0,98	0,88	0,94	1,08	1,05	1,02
072	G072V	1,31	1,27	1,19	1,30	1,48	1,22	0,68
072	G072W	0,10	-0,61	-1,03	-0,54	0,41	-0,49	0,12
072	G072Y	1,11	1,01	1,28	1,31	1,21	1,01	0,84
074	V074A	1,43	1,43	1,55	1,54	1,43	1,38	0,79
074	V074C	0,05	0,20	0,77	0,33	-0,16	0,40	-0,19
074	V074D	-0,22	0,91	2,69	1,24	0,32	-0,58	-0,05

074	V074E	1,65	1,71	1,69	1,69	1,56	1,84	0,65
074	V074F	2,44	2,48	0,48	0,33	3,48	3,18	0,13
074	V074G	1,29	1,28	1,15	1,14	0,98	1,08	0,97
074	V074H	0,79	0,78	0,82	0,89	0,84	0,78	1,19
074	V074I	1,15	1,16	1,26	1,26	1,21	1,01	0,98
074	V074K	0,08	-0,61	-1,67	-0,73	1,78	0,54	0,07
074	V074L	0,77	-0,57	-2,18	-1,10	0,59	-1,43	0,07
074	V074M	-0,14	-0,19	1,02	0,48	0,45	-0,53	-0,13
074	V074N	-0,22	0,25	1,07	0,53	0,05	0,15	-0,13
074	V074Q	1,57	1,60	1,61	1,59	1,30	1,16	0,78
074	V074R	-0,93	-0,49	1,45	0,77	-0,63	-1,66	-0,08
074	V074S	-3,20	-3,28	-0,69	-1,93	-2,28	-5,92	0,05
074	V074T	7,70	-8,69	-7,16	-3,32	-0,73	-6,93	0,02
074	V074W	0,47	-0,38	-3,18	-1,38	0,49	0,72	0,04
074	V074Y	1,12	1,08	0,88	0,91	0,97	1,00	0,93
082	A082C	1,45	1,58	1,16	1,26	1,31	1,25	0,64
082	A082E	1,37	1,32	1,36	1,39	1,12	1,02	0,89
082	A082F	1,36	1,33	1,07	1,14	1,25	1,19	0,84
082	A082G	1,17	1,33	0,79	0,93	1,18	1,07	0,68
082	A082H	1,08	1,04	0,95	0,96	0,90	1,13	1,15
082	A082I	0,96	1,00	1,04	1,03	0,97	0,82	1,15
082	A082K	9,74	1,65	-13,38	-6,33	-9,02	35,95	0,01
082	A082L	1,00	0,96	0,94	0,99	0,82	0,84	1,08
082	A082M	-0,42	0,35	0,64	0,22	0,16	-0,23	-0,20
082	A082N	1,36	1,39	1,35	1,45	1,38	1,31	0,83
082	A082P	1,54	1,45	1,25	1,38	1,44	1,14	0,76
082	A082Q	-0,19	0,28	1,16	0,54	0,15	1,37	-0,12
082	A082R	1,17	1,17	1,29	1,34	1,42	1,45	0,99
082	A082S	1,02	1,07	0,92	1,01	0,90	0,86	1,06
082	A082T	1,08	1,08	0,99	1,06	1,00	1,32	1,02
082	A082V	0,98	1,08	0,97	1,05	1,02	0,90	1,02

082	A082W	1,16	1,16	0,83	0,99	1,08	0,97	0,96
082	A082Y	0,81	0,87	0,95	0,95	0,95	1,06	1,14
086	Q086A	1,00	1,11	1,43	1,46	1,25	1,02	0,83
086	Q086C	1,00	1,11	1,01	1,19	1,09	0,64	0,73
086	Q086D	0,96	1,03	1,22	1,29	1,11	0,99	0,87
086	Q086E	0,92	0,93	1,12	1,15	0,80	0,97	0,97
086	Q086F	0,26	-0,46	-3,07	-1,44	-0,60	-1,61	0,05
086	Q086G	0,21	1,02	-1,18	-0,54	-0,42	-2,55	0,12
086	Q086H	1,34	1,23	-1,23	-0,61	-2,15	-1,84	0,10
086	Q086I	0,84	0,85	0,88	0,95	0,85	0,81	0,99
086	Q086K	0,64	0,66	0,88	0,84	0,71	0,81	1,42
086	Q086L	0,71	0,71	0,78	0,80	0,71	0,70	1,24
086	Q086N	-4,91	-2,76	5,03	2,01	3,01	2,98	-0,02
086	Q086P	1,13	1,17	1,36	1,48	1,31	1,11	0,86
086	Q086R	-7,06	24,56	-23,74	-11,36	-12,19	-55,94	0,00
086	Q086S	0,44	1,09	-1,75	-0,70	-0,40	-2,57	0,08
086	Q086T	0,94	0,91	0,90	0,99	0,78	0,91	1,03
086	Q086V	0,88	0,89	0,85	0,91	0,81	0,71	0,93
086	Q086W	0,78	0,74	0,81	0,85	0,80	0,69	1,24
086	Q086Y	0,72	0,74	0,94	0,91	0,77	0,82	1,13
089	Q089A	0,33	-0,78	0,99	0,42	-0,25	3,87	-0,12
089	Q089C	-0,69	0,00	0,05	-0,23	-0,17	0,59	-0,11
089	Q089D	1,32	1,36	1,41	1,47	1,37	1,07	0,73
089	Q089E	-0,37	-0,82	0,68	0,35	0,65	1,13	-0,12
089	Q089F	1,56	1,48	1,17	1,25	1,54	1,00	0,44
089	Q089G	1,13	1,03	1,21	1,15	1,10	1,02	0,93
089	Q089H	1,82	1,91	0,35	0,65	1,10	1,61	0,17
089	Q089I	1,16	1,01	1,04	1,10	1,15	0,90	0,77
089	Q089K	0,85	0,87	1,20	1,06	1,11	0,87	1,10
089	Q089L	0,95	0,94	0,97	0,98	0,72	0,77	0,86
089	Q089M	1,29	1,21	1,53	1,56	1,40	1,16	0,64

089	Q089N	1,40	1,30	1,64	1,67	1,56	1,26	0,71
089	Q089P	-0,80	0,03	1,23	0,45	0,97	2,98	-0,11
089	Q089R	1,15	1,00	1,27	1,34	1,15	1,13	0,95
089	Q089T	11,41	-3,81	-9,90	-2,46	-5,57	-36,35	0,02
089	Q089V	1,15	0,96	1,24	1,23	1,20	0,84	0,90
089	Q089W	0,84	0,66	0,84	0,84	0,79	0,69	1,11
089	Q089Y	0,97	0,97	1,23	1,19	1,06	0,88	0,95
093	A093C	1,36	1,43	1,51	1,80	1,74	1,33	0,57
093	A093D	1,21	1,41	1,52	1,53	1,26	1,12	0,80
093	A093E	1,53	1,50	1,78	1,75	1,55	1,55	0,71
093	A093F	1,24	1,42	1,20	1,45	1,54	1,13	0,72
093	A093G	1,20	1,15	1,23	1,29	1,35	1,10	0,89
093	A093H	0,98	0,88	1,01	1,03	1,01	0,91	1,11
093	A093I	0,97	1,11	1,11	1,39	1,28	1,16	0,76
093	A093K	0,93	0,92	1,10	1,07	0,87	0,86	1,14
093	A093L	0,90	0,91	1,08	1,09	0,97	1,03	0,96
093	A093M	1,10	1,13	1,45	1,53	1,42	1,34	0,82
093	A093N	1,52	1,46	1,77	1,72	1,46	1,59	0,73
093	A093P	-0,84	-0,82	0,20	-0,65	-0,46	-0,39	-0,09
093	A093Q	1,36	1,45	1,41	1,56	1,41	1,40	0,76
093	A093R	1,15	1,13	1,23	1,32	1,29	1,04	0,91
093	A093S	1,09	1,11	1,30	1,22	1,02	0,93	0,94
093	A093T	0,93	0,90	1,02	1,05	0,89	0,98	1,02
093	A093V	1,02	1,08	1,11	1,16	1,10	0,93	0,87
093	A093W	1,02	0,97	0,98	1,05	0,92	0,82	0,88
093	A093Y	0,93	0,91	1,17	1,22	1,12	1,12	0,83
115	W115D	0,97	1,05	0,95	1,04	1,15	1,05	0,91
115	W115E	0,88	0,90	0,91	0,96	0,69	0,88	1,09
115	W115F	0,87	0,92	0,79	0,85	0,95	0,73	1,11
115	W115G	0,81	0,81	0,93	0,89	0,84	1,10	1,28
115	W115K	0,67	0,64	0,75	0,74	0,73	0,62	1,44

115	W115L	0,58	0,58	0,67	0,65	0,62	0,69	1,63
115	W115N	0,87	0,94	1,13	1,07	1,08	0,98	1,02
115	W115P	1,12	1,12	1,18	1,20	1,22	1,29	0,87
115	W115Q	0,96	0,96	1,01	1,04	0,99	0,85	1,00
115	W115R	0,79	0,83	0,92	0,94	0,95	0,65	1,07
115	W115S	0,92	0,87	1,02	0,98	0,96	1,00	1,14
115	W115V	0,77	0,81	0,83	0,79	0,89	0,82	1,27
115	W115Y	0,56	0,63	0,74	0,73	0,77	0,69	1,41
117	D117A	1,29	1,21	1,20	1,32	1,83	1,39	0,45
117	D117E	1,40	1,34	1,30	1,21	1,65	1,33	0,65
117	D117G	1,10	1,02	1,08	1,08	1,19	1,33	0,78
117	D117H	0,92	0,82	0,84	0,89	1,21	1,08	0,87
117	D117I	0,98	0,70	0,65	0,79	1,49	1,26	0,50
117	D117K	0,68	0,57	0,93	0,89	0,82	0,86	1,30
117	D117L	0,81	0,77	0,94	0,86	1,09	0,86	0,64
117	D117M	1,21	1,13	1,23	1,32	1,44	0,97	0,53
117	D117N	1,30	1,26	1,63	1,48	1,48	1,23	0,71
117	D117P	1,07	1,04	1,27	1,17	1,29	1,10	0,88
117	D117Q	1,63	1,62	1,46	1,51	2,08	1,57	0,56
117	D117R	1,06	1,12	1,12	1,05	1,25	0,83	0,95
117	D117S	0,89	0,90	0,92	0,98	1,09	0,94	0,81
117	D117T	0,93	0,83	0,82	0,88	1,03	1,20	0,91
117	D117V	1,08	0,86	0,91	1,08	2,00	1,98	0,40
117	D117W	0,76	0,56	0,82	0,82	0,74	0,70	1,20
123	P123A	1,06	1,01	1,43	1,25	1,10	0,95	0,84
123	P123D	1,19	1,05	1,18	1,22	1,38	1,34	0,84
123	P123E	1,49	1,39	1,45	1,41	1,65	1,24	0,66
123	P123G	1,10	0,96	1,18	1,07	1,18	1,10	0,90
123	P123K	0,84	0,62	1,09	0,96	1,00	0,89	1,18
123	P123L	0,83	0,72	1,03	1,00	1,21	0,98	0,93
123	P123M	1,14	1,00	1,13	1,29	1,52	1,25	0,61

123	P123Q	1,25	1,15	1,19	1,35	1,55	1,30	0,68
123	P123R	1,02	0,95	1,28	1,28	1,12	1,11	0,96
123	P123S	1,07	0,84	0,88	0,92	1,17	0,97	0,96
123	P123T	1,00	0,89	0,83	0,90	1,13	0,83	0,97
123	P123V	0,83	0,79	0,97	1,08	1,23	0,99	0,83
124	S124A	1,33	1,45	1,31	1,39	1,27	1,34	0,79
124	S124C	1,28	1,32	0,93	1,15	1,54	1,21	0,77
124	S124D	1,19	1,20	1,14	1,24	1,35	1,31	0,88
124	S124E	1,15	1,22	1,16	1,19	1,24	1,11	0,93
124	S124F	1,12	1,19	1,05	1,16	1,05	0,98	1,01
124	S124G	0,92	0,81	0,79	0,84	1,14	0,80	1,08
124	S124H	0,91	0,98	0,97	1,02	1,12	1,11	0,98
124	S124I	0,93	0,92	0,92	0,91	0,99	1,05	1,10
124	S124K	0,89	0,89	0,95	0,90	0,92	0,77	1,24
124	S124L	0,70	0,73	0,74	0,62	0,74	0,61	1,36
124	S124N	1,16	1,18	1,00	1,15	1,17	0,96	0,87
124	S124P	1,08	0,97	1,06	1,25	1,43	1,02	0,71
124	S124Q	1,16	1,22	1,09	1,18	1,27	1,20	0,82
124	S124R	1,26	1,24	1,05	1,16	1,35	1,21	0,88
124	S124T	1,03	1,09	0,90	0,92	1,06	1,03	1,02
124	S124V	0,97	0,96	0,81	0,86	0,98	1,00	1,01
124	S124Y	0,87	0,88	0,74	0,83	0,86	0,75	1,13
125	D125A	0,75	0,72	1,11	1,21	1,17	1,04	0,82
125	D125E	1,02	1,00	0,92	1,01	0,96	0,77	0,94
125	D125G	0,51	0,48	0,91	0,90	0,46	0,77	1,15
125	D125K	0,37	0,34	0,65	0,80	0,79	0,68	1,23
125	D125M	1,08	1,06	1,02	1,11	1,11	0,98	0,93
125	D125Q	0,87	0,74	0,92	1,03	0,85	0,81	0,94
125	D125R	0,43	0,43	0,69	0,92	0,74	0,61	1,06
125	D125S	0,67	0,57	0,96	1,03	0,80	0,82	1,12
125	D125T	0,91	0,92	0,78	0,80	0,78	0,59	1,17

125	D125V	0,38	0,36	0,67	0,81	0,78	1,01	1,17
127	N127A	0,80	0,88	1,41	1,37	1,42	1,34	0,69
127	N127C	1,25	1,40	1,26	1,39	1,48	1,45	0,69
127	N127D	1,21	1,24	1,24	1,31	1,19	1,41	0,78
127	N127F	0,98	0,84	1,27	1,23	1,09	0,90	0,82
127	N127G	0,86	0,71	1,05	1,04	1,03	1,05	0,93
127	N127H	0,70	0,63	0,83	0,89	0,86	0,81	1,02
127	N127K	0,51	0,47	0,77	0,86	0,95	1,01	1,03
127	N127L	0,71	0,67	0,99	1,04	1,12	1,01	0,93
127	N127M	1,00	1,15	1,47	1,46	1,35	1,23	0,73
127	N127P	1,10	1,04	1,30	1,39	1,16	1,21	0,65
127	N127Q	1,04	1,01	1,42	1,47	1,33	1,00	0,71
127	N127R	0,88	0,87	1,04	1,10	1,14	0,89	0,96
127	N127S	0,87	0,71	1,08	1,06	1,04	0,91	0,90
127	N127T	0,78	0,68	0,79	0,79	0,93	0,75	1,08
127	N127V	0,75	0,78	1,34	1,27	1,11	0,97	0,75
127	N127W	0,79	0,73	0,76	0,80	0,84	0,82	1,16
127	N127Y	1,16	1,12	1,23	1,15	1,21	1,14	0,82
130	I130A	1,15	1,06	1,61	1,47	1,25	1,13	0,82
130	I130G	0,81	0,71	1,10	1,12	1,25	1,11	0,91
130	I130H	0,58	0,51	0,83	0,87	0,92	0,79	1,18
130	I130K	0,73	0,64	1,06	0,96	0,94	0,84	1,14
130	I130L	0,80	0,77	1,08	1,04	0,99	0,92	0,96
130	I130M	1,45	1,37	1,42	1,44	1,33	1,19	0,77
130	I130N	1,08	0,95	1,48	1,46	1,11	1,01	0,78
130	I130P	0,29	0,41	0,91	1,29	1,33	1,36	0,76
130	I130Q	-0,18	-1,25	1,18	0,52	-0,19	0,03	-0,12
130	I130R	1,09	0,91	1,30	1,34	0,91	1,00	0,85
130	I130S	1,02	0,81	1,02	1,06	1,07	0,84	0,97
130	I130T	0,97	0,99	1,09	1,04	0,97	0,99	0,98
130	I130V	1,12	1,21	1,12	1,12	0,94	0,96	0,83

130	I130W	0,85	0,69	0,95	1,01	1,11	0,89	0,89
132	G132A	1,52	1,66	1,32	1,47	1,60	1,39	0,68
132	G132C	1,38	1,47	1,26	1,28	1,10	0,87	0,79
132	G132D	1,84	1,78	1,18	1,50	1,56	1,56	0,51
132	G132E	1,17	1,33	1,11	1,21	0,90	0,86	0,86
132	G132F	1,20	1,21	1,03	1,18	1,03	1,03	0,91
132	G132H	0,98	1,03	0,93	0,97	1,04	0,99	1,02
132	G132L	0,98	1,03	0,76	0,84	0,88	0,85	0,95
132	G132M	1,81	1,76	1,51	1,61	1,81	1,73	0,61
132	G132N	1,18	1,23	1,11	1,27	1,15	1,08	0,82
132	G132P	1,51	1,59	1,28	1,40	1,26	1,34	0,75
132	G132R	1,35	1,32	0,97	1,12	1,02	1,06	0,87
132	G132S	1,32	1,34	1,08	1,22	1,15	0,96	0,77
132	G132T	1,09	1,05	0,87	0,96	0,94	0,98	1,03
132	G132V	0,99	1,09	0,96	1,02	0,95	1,03	0,98
132	G132W	1,17	1,13	0,95	1,07	1,02	0,84	0,91
132	G132Y	0,93	0,87	0,81	0,86	0,80	0,81	1,15
135	Q135A	0,95	0,99	1,00	1,20	1,13	0,99	0,84
135	Q135F	0,93	1,05	0,91	1,03	1,04	1,39	0,94
135	Q135G	0,77	0,80	0,75	0,84	0,97	1,05	1,08
135	Q135K	0,59	0,69	0,63	0,71	0,70	0,74	1,27
135	Q135L	0,40	0,22	-0,66	-0,33	0,38	-0,14	0,19
135	Q135M	0,91	1,03	1,01	1,14	0,90	1,01	0,86
135	Q135P	1,12	1,16	0,96	1,07	0,85	1,16	0,87
135	Q135R	0,92	1,01	0,95	1,00	0,95	1,14	1,08
135	Q135S	0,93	0,93	0,80	0,95	0,91	0,87	0,94
135	Q135T	0,84	0,83	0,73	0,80	0,79	0,83	1,19
135	Q135V	0,92	0,84	0,66	0,75	0,98	1,23	0,76
135	Q135Y	0,75	0,75	0,69	0,79	0,75	0,91	1,16
145	P145A	1,15	1,17	1,44	1,50	1,30	1,29	0,71
145	P145D	1,35	1,61	1,15	1,33	1,45	1,48	0,57

145	P145E	1,55	1,48	1,26	1,45	1,34	1,65	0,63
145	P145F	1,34	1,32	1,02	1,20	1,12	1,32	0,74
145	P145H	0,98	0,88	0,81	0,99	1,13	1,03	0,90
145	P145I	1,20	1,06	0,84	0,98	1,10	1,20	0,85
145	P145K	0,90	0,89	0,88	1,05	1,15	1,02	0,88
145	P145L	1,03	0,90	0,81	1,01	0,97	1,23	0,85
145	P145N	1,19	1,43	1,41	1,58	1,49	1,48	0,61
145	P145R	1,22	1,11	1,10	1,29	1,14	1,11	0,86
145	P145S	1,12	1,04	1,03	1,10	1,08	1,12	0,85
145	P145T	1,15	0,99	0,91	1,00	0,92	0,81	0,89
145	P145V	1,09	1,18	1,08	1,19	1,24	1,25	0,73
145	P145Y	1,14	1,12	0,89	1,15	1,08	1,16	0,75
146	G146A	1,18	1,00	1,34	1,41	1,19	1,05	0,77
146	G146C	2,03	1,89	1,71	1,89	2,19	1,52	0,40
146	G146D	1,32	1,35	1,45	1,52	1,50	1,17	0,70
146	G146E	1,43	1,43	1,63	1,62	1,38	1,33	0,82
146	G146H	1,00	0,99	0,77	0,88	1,01	0,93	1,06
146	G146K	0,94	0,84	1,06	1,07	1,05	1,10	1,08
146	G146L	0,99	0,80	0,85	ND	0,97	0,74	0,97
146	G146P	1,33	1,24	1,30	1,36	1,43	1,31	0,76
146	G146R	1,21	1,07	1,12	1,30	1,21	1,41	0,85
146	G146S	1,18	1,13	1,02	1,04	0,97	0,94	0,91
146	G146T	0,91	0,83	0,98	1,00	0,97	0,78	1,13
146	G146V	1,19	1,04	1,15	1,21	1,22	1,16	0,79
146	G146W	0,94	0,88	0,83	0,91	0,80	1,01	0,93
148	G148A	1,20	1,28	1,37	1,49	1,22	1,10	0,71
148	G148C	1,09	0,94	1,25	1,28	1,17	1,19	0,84
148	G148D	-1,07	-0,40	0,77	0,36	0,81	1,35	-0,11
148	G148E	1,17	1,19	1,27	1,27	1,37	1,02	0,89
148	G148F	1,08	1,07	1,13	1,16	1,03	1,27	0,97
148	G148H	0,89	0,90	1,00	0,97	0,91	0,66	1,13

148	G148L	0,88	0,83	0,89	0,90	0,94	0,91	1,16
148	G148N	1,00	0,98	1,20	1,17	1,13	1,18	1,01
148	G148P	1,30	1,33	1,34	1,45	1,35	1,09	0,76
148	G148Q	-1,69	-1,32	1,69	0,84	-0,01	0,58	-0,07
148	G148R	1,27	1,20	1,12	1,24	1,14	0,71	0,85
148	G148S	0,96	0,97	0,92	0,96	0,84	1,05	1,03
148	G148T	1,35	1,20	0,70	0,86	1,35	0,90	0,49
148	G148V	0,96	0,95	0,95	1,02	1,04	0,69	1,03
148	G148W	1,00	0,88	0,90	0,96	0,89	0,83	1,00
148	G148Y	0,82	0,74	0,86	0,93	0,91	0,87	1,14
153	S153A	1,14	1,15	1,09	1,23	1,21	1,09	0,86
153	S153C	1,70	1,78	1,37	1,54	1,51	1,61	0,53
153	S153D	1,34	1,25	0,99	1,11	1,18	1,02	0,88
153	S153E	1,76	1,18	1,20	1,34	1,54	1,36	0,61
153	S153F	1,42	1,35	1,07	1,18	1,22	1,36	0,80
153	S153G	1,35	1,16	0,97	1,03	1,08	1,25	0,88
153	S153H	0,98	0,91	0,72	0,77	0,92	1,00	1,05
153	S153I	1,31	1,09	0,95	1,05	1,28	1,35	0,74
153	S153K	0,79	0,82	0,80	0,87	1,02	1,00	1,08
153	S153L	1,11	0,96	0,92	0,98	1,03	1,26	0,92
153	S153N	1,29	1,38	1,38	1,43	1,20	1,75	0,76
153	S153P	1,09	1,19	1,21	1,28	1,15	1,15	1,00
153	S153Q	1,14	1,22	0,95	1,21	1,39	1,47	0,73
153	S153R	1,29	1,16	1,00	1,12	1,18	1,16	0,95
153	S153T	0,93	1,02	0,82	0,89	0,88	0,97	1,01
153	S153V	1,30	1,16	0,97	1,07	1,08	1,26	0,77
153	S153W	0,94	0,95	0,75	0,86	0,85	1,21	0,90
153	S153Y	1,15	1,03	0,96	1,00	1,03	1,13	0,86
159	Y159A	1,17	1,17	1,42	1,52	1,50	1,70	0,74
159	Y159C	1,46	1,19	1,80	1,73	1,10	1,66	0,66
159	Y159D	1,08	1,21	1,89	1,88	1,63	2,01	0,78

159	Y159E	1,23	1,25	1,34	1,50	1,31	1,66	0,73
159	Y159F	1,11	1,10	1,03	1,10	0,96	1,17	0,97
159	Y159G	0,92	0,79	0,95	1,02	1,22	1,44	0,94
159	Y159H	0,97	0,86	0,97	1,05	1,07	1,17	1,01
159	Y159K	1,03	0,78	1,20	1,21	0,96	1,71	0,90
159	Y159L	0,77	0,61	0,95	1,00	1,24	1,41	0,98
159	Y159N	0,97	0,94	1,46	1,56	1,40	1,85	0,78
159	Y159R	1,10	0,86	1,19	1,40	1,39	1,75	0,80
159	Y159S	0,97	0,82	1,01	1,09	1,25	1,44	0,94
159	Y159T	0,93	0,93	1,18	1,20	1,26	1,74	0,87
159	Y159V	1,09	0,95	0,96	1,07	1,12	1,48	0,87
159	Y159W	1,08	1,12	0,98	1,08	0,73	0,96	0,88
166	W166C	0,57	0,71	0,61	0,60	0,90	1,03	0,80
166	W166E	0,58	0,78	0,94	0,74	1,09	1,12	0,97
166	W166F	0,75	0,82	0,73	0,81	0,82	1,06	1,07
166	W166G	0,65	0,57	0,42	0,50	0,84	0,93	1,18
166	W166H	0,59	0,64	0,57	0,67	0,90	0,92	1,26
166	W166I	0,56	0,65	0,85	0,79	0,65	1,16	1,13
166	W166K	0,47	0,49	0,96	0,81	0,60	1,09	1,49
166	W166L	0,45	0,54	0,79	0,64	0,58	0,91	1,46
166	W166M	0,70	0,83	0,96	0,82	0,89	1,24	1,00
166	W166P	0,16	0,30	-0,15	-0,02	1,19	1,09	0,69
166	W166R	0,67	0,86	1,40	1,17	0,83	0,76	0,94
166	W166S	0,61	0,64	0,63	0,57	0,90	0,95	1,14
166	W166T	0,60	0,73	0,92	0,76	0,70	0,33	1,15
166	W166V	0,51	0,61	0,88	0,75	0,49	0,98	1,10
166	W166Y	0,65	0,70	0,73	0,78	0,81	0,96	1,16
169	S169A	1,10	1,14	1,17	1,30	1,17	1,35	0,85
169	S169C	1,05	1,37	1,33	1,43	1,54	1,47	0,74
169	S169D	0,91	1,17	1,21	1,26	1,36	1,42	0,71
169	S169E	1,24	1,36	1,37	1,59	1,65	1,81	0,67

169	S169F	1,04	1,33	1,01	1,13	1,15	1,36	0,74
169	S169G	1,05	0,90	0,97	0,99	0,99	1,22	0,97
169	S169I	0,84	0,82	0,84	1,02	1,18	1,00	0,93
169	S169K	0,81	0,85	0,78	0,94	0,88	1,03	1,00
169	S169L	0,82	0,65	0,83	0,95	0,99	1,00	1,09
169	S169M	0,98	0,71	1,05	1,17	0,98	1,17	0,92
169	S169N	0,88	1,09	1,28	1,35	1,43	1,41	0,76
169	S169P	0,55	0,85	0,74	1,10	1,25	0,96	0,78
169	S169Q	1,08	1,18	1,27	1,43	1,43	1,54	0,75
169	S169R	0,95	0,88	1,01	1,13	1,08	1,26	0,96
169	S169T	0,78	0,75	0,87	0,96	0,92	0,79	1,07
169	S169V	0,78	0,88	0,78	1,01	1,10	1,00	0,94
169	S169Y	0,91	0,87	1,00	1,11	0,97	1,10	0,93
171	K171C	1,20	1,53	1,27	1,46	1,71	1,56	0,54
171	K171D	1,22	1,28	1,11	1,32	1,03	1,49	0,75
171	K171E	1,18	1,46	1,26	1,33	1,61	1,36	0,65
171	K171G	1,03	1,06	0,87	0,91	1,08	1,29	0,80
171	K171H	0,90	0,76	0,82	0,90	0,93	0,94	1,20
171	K171L	0,70	0,76	0,84	0,88	0,88	0,86	1,05
171	K171M	1,11	1,32	1,25	1,34	1,43	1,08	0,67
171	K171P	0,99	1,09	1,19	1,31	1,36	1,32	0,73
171	K171Q	1,08	1,15	1,05	1,26	1,66	1,37	0,67
171	K171R	1,01	0,96	0,96	1,08	1,10	1,42	0,92
171	K171S	1,12	0,97	0,86	0,96	0,90	1,17	0,93
171	K171T	1,00	0,88	0,87	0,93	0,96	1,03	1,09
171	K171V	0,87	0,92	0,81	0,92	1,13	0,97	0,89
171	K171W	0,74	0,74	0,59	0,82	0,88	0,86	1,03
171	K171Y	0,86	0,73	0,70	0,90	0,96	1,06	0,92
179	R179A	0,88	0,88	1,28	1,47	1,62	1,55	0,83
179	R179G	0,53	0,56	0,93	1,05	1,02	1,09	1,05
179	R179H	0,82	0,78	1,07	1,19	1,25	1,32	1,00

179	R179L	0,71	0,62	0,79	0,93	1,00	1,28	0,99
179	R179M	0,81	1,14	1,24	1,51	1,58	1,52	0,66
179	R179P	0,33	0,50	1,14	1,33	1,42	1,61	0,79
179	R179Q	1,07	0,98	1,03	1,27	1,31	1,39	0,82
179	R179S	0,86	0,62	0,94	1,12	1,11	1,21	1,02
179	R179T	0,97	0,78	1,00	1,16	1,31	1,32	0,94
179	R179V	0,90	0,89	0,84	1,03	1,26	1,12	0,91
179	R179W	0,81	0,70	0,92	1,19	1,17	1,71	0,87
179	R179Y	0,64	0,49	0,81	0,95	0,89	1,22	1,06
180	G180A	0,82	0,75	1,37	0,96	1,25	1,45	0,76
180	G180C	0,43	0,46	1,29	0,82	1,35	1,56	0,73
180	G180D	0,50	0,54	1,39	0,99	1,37	1,36	0,81
180	G180F	0,32	0,32	1,19	1,03	0,90	1,75	0,72
180	G180H	0,38	0,36	0,95	0,80	0,89	1,00	1,12
180	G180I	0,21	0,21	0,87	0,73	1,17	1,09	0,84
180	G180K	0,13	0,16	0,77	ND	0,99	1,02	1,26
180	G180L	0,22	0,25	1,02	0,72	0,81	0,94	1,38
180	G180N	0,46	0,52	1,41	1,13	1,24	0,89	0,81
180	G180P	0,42	0,45	1,39	ND	1,46	1,74	0,75
180	G180R	1,27	0,83	ND	ND	-0,82	-12,79	-0,03
180	G180S	0,82	0,70	0,98	0,79	0,90	0,92	0,96
180	G180T	0,46	0,37	0,91	0,76	1,02	0,77	1,07
180	G180V	0,25	0,18	0,89	ND	1,01	0,98	0,96
180	G180Y	0,29	0,34	0,91	0,75	1,03	1,11	1,03
181	I181A	1,16	1,15	1,60	1,19	1,45	1,48	0,78
181	I181C	1,18	1,21	1,79	ND	1,10	1,35	0,68
181	I181D	1,19	1,29	1,61	1,22	1,64	1,19	0,74
181	I181E	1,44	1,47	1,54	1,27	1,48	1,55	0,72
181	I181F	1,11	1,04	1,20	0,92	1,24	0,84	0,87
181	I181G	0,69	0,59	1,20	1,02	1,15	1,12	0,94
181	I181H	0,88	0,73	1,13	ND	0,95	0,95	0,98

181	I181K	0,58	0,43	1,15	ND	0,96	0,87	1,04
181	I181L	0,76	0,75	1,09	ND	0,91	0,78	1,01
181	I181P	1,04	1,07	1,35	ND	1,30	1,34	0,85
181	I181R	0,49	0,47	0,78	0,87	1,43	1,64	0,87
181	I181S	0,93	0,83	1,09	0,80	1,02	1,15	0,97
181	I181T	0,80	0,75	1,02	0,85	0,94	1,13	1,09
181	I181V	1,20	1,04	1,39	1,12	1,18	1,16	0,81
181	I181Y	0,83	0,69	1,06	0,89	0,94	0,87	0,95
182	G182A	0,82	0,87	1,36	1,14	1,24	1,11	0,72
182	G182C	1,18	1,14	1,73	1,58	1,96	1,42	0,45
182	G182D	0,79	0,71	1,40	1,17	1,40	1,56	0,77
182	G182E	0,68	0,64	1,45	1,26	1,73	1,43	0,66
182	G182F	1,30	1,21	1,10	1,06	1,50	1,46	0,46
182	G182H	0,64	0,53	1,01	ND	1,13	1,22	1,01
182	G182K	-0,04	-0,01	-0,15	ND	0,07	-0,08	0,91
182	G182L	0,53	0,48	1,12	ND	1,26	0,86	0,70
182	G182P	0,61	0,47	1,45	1,23	1,57	1,40	0,73
182	G182R	0,77	0,69	1,32	0,99	1,30	1,56	0,81
182	G182S	0,68	0,57	0,99	0,87	1,16	1,10	0,85
182	G182T	0,49	0,49	1,00	0,89	1,22	1,12	0,84
182	G182V	0,61	0,46	1,26	1,12	1,38	1,18	0,66
182	G182Y	0,61	0,48	0,85	0,88	1,00	0,96	0,84
183	K183A	0,20	0,17	1,19	1,20	1,58	1,99	0,66
183	K183C	0,18	0,19	1,35	1,24	1,38	2,02	0,62
183	K183E	0,14	0,02	1,20	1,10	1,37	1,55	0,72
183	K183F	0,15	-0,05	1,11	1,08	1,61	2,04	0,59
183	K183G	0,15	0,13	0,96	ND	1,24	1,35	0,94
183	K183H	0,27	0,15	0,93	0,84	1,31	1,26	0,86
183	K183L	0,05	0,10	0,91	0,93	1,15	1,44	0,86
183	K183M	0,14	0,18	1,42	1,40	1,60	2,40	0,58
183	K183P	0,03	0,17	1,27	1,06	1,73	1,64	0,58

183	K183Q	0,12	0,14	1,30	1,21	1,51	2,11	0,71
183	K183R	0,20	0,11	1,03	1,00	1,13	2,07	0,82
183	K183S	0,15	0,18	0,92	0,83	1,18	1,33	0,93
183	K183T	0,20	0,01	1,10	1,11	1,16	1,71	0,80
183	K183V	0,10	0,07	0,82	0,89	1,38	1,73	0,62
183	K183W	0,07	0,13	0,66	0,77	1,23	1,09	0,70
183	K183Y	0,08	0,14	0,66	0,73	1,10	1,32	0,88
187	W187A	0,45	0,36	1,67	1,77	1,21	1,02	0,90
187	W187C	0,48	0,40	1,23	1,49	1,19	1,13	0,88
187	W187E	0,62	0,51	1,18	1,22	1,14	1,08	1,04
187	W187G	0,16	0,13	0,57	0,86	0,86	0,73	1,13
187	W187I	0,70	0,57	0,83	0,86	0,78	0,82	1,29
187	W187K	0,16	0,16	0,85	0,90	0,71	0,64	1,72
187	W187L	0,69	0,69	0,72	0,78	0,75	0,66	1,29
187	W187N	0,53	0,62	1,29	1,41	1,10	1,08	0,91
187	W187P	0,17	0,14	0,29	1,65	1,19	1,15	0,85
187	W187Q	0,41	0,35	1,27	1,30	1,09	0,92	1,03
187	W187R	0,29	0,28	0,96	1,19	0,92	0,92	1,08
187	W187S	0,40	0,28	1,01	1,07	0,86	0,76	1,25
187	W187V	0,20	-0,60	-0,25	0,12	0,26	0,77	0,20
194	G194A	1,33	1,26	1,40	1,36	1,55	1,18	0,68
194	G194E	1,28	1,12	1,13	1,10	1,37	1,25	0,79
194	G194H	1,09	1,02	0,91	0,92	1,10	0,72	0,97
194	G194K	0,77	0,75	0,80	0,80	1,01	0,68	1,18
194	G194L	0,74	0,64	0,81	0,85	0,97	0,78	1,01
194	G194M	1,38	1,33	1,65	1,48	1,40	1,19	0,69
194	G194P	0,04	0,01	0,00	2,12	1,14	0,37	0,78
194	G194R	1,04	0,96	0,98	1,05	1,08	0,86	1,01
194	G194S	1,08	1,02	1,14	1,09	0,94	0,70	1,03
194	G194T	0,93	0,77	0,87	0,92	1,05	0,71	1,07
194	G194V	1,26	1,08	0,97	1,01	1,14	0,80	0,84

194	G194W	0,61	0,51	0,60	0,62	0,75	0,48	1,31
209	P209A	1,22	1,30	1,67	1,68	1,52	1,20	0,68
209	P209C	1,24	1,20	1,01	1,00	1,37	1,29	0,58
209	P209D	1,35	1,33	1,41	1,57	1,39	1,30	0,76
209	P209E	1,34	1,25	1,31	1,47	1,34	1,35	0,82
209	P209F	1,23	1,36	1,22	1,48	1,51	1,50	0,62
209	P209G	1,09	0,92	1,10	1,09	0,98	0,91	1,01
209	P209H	1,02	0,91	1,20	1,15	0,97	1,00	1,00
209	P209I	0,94	0,85	1,01	1,03	0,91	0,84	0,95
209	P209K	1,24	0,95	1,22	1,23	0,99	1,03	0,98
209	P209L	0,83	0,92	1,00	1,06	1,02	1,02	0,87
209	P209M	1,34	1,34	1,48	1,61	1,81	1,18	0,65
209	P209N	1,65	2,42	0,99	1,11	2,77	2,36	0,21
209	P209Q	-0,73	-0,45	ND	ND	-0,20	0,55	-0,12
209	P209R	1,38	1,03	1,41	1,45	1,08	1,22	0,91
209	P209S	1,14	1,02	1,13	1,21	1,02	0,86	0,89
209	P209T	1,12	1,10	1,37	1,35	1,35	0,97	0,84
209	P209V	0,98	0,83	1,10	0,93	1,16	1,04	0,82
209	P209W	0,99	1,06	1,03	1,10	1,16	0,86	0,80
209	P209Y	0,64	0,73	0,53	0,76	0,96	1,10	0,82
224	N224A	0,65	1,07	1,11	1,13	1,47	1,19	0,81
224	N224C	0,91	1,07	1,05	1,08	1,22	1,00	0,82
224	N224D	0,81	1,10	0,96	1,08	0,85	0,75	0,82
224	N224E	0,93	1,78	0,68	0,91	1,68	1,83	0,31
224	N224F	0,79	1,11	0,81	0,93	1,33	1,31	0,67
224	N224G	0,72	0,80	0,82	0,87	0,72	0,97	1,26
224	N224H	0,60	0,80	0,74	0,84	0,66	0,83	1,20
224	N224I	0,71	0,95	0,85	0,99	0,95	0,97	0,86
224	N224K	0,56	0,64	0,78	0,81	0,58	0,78	1,42
224	N224L	0,55	0,72	0,69	0,75	0,89	0,73	1,11
224	N224M	0,84	1,07	1,07	1,13	1,22	1,27	0,73

224	N224P	1,21	1,26	0,87	1,03	1,04	1,19	0,83
224	N224Q	0,97	1,03	0,98	0,98	1,12	1,07	0,90
224	N224R	0,89	1,22	0,65	0,76	1,15	1,34	0,53
224	N224S	0,91	0,84	0,88	0,93	0,78	0,82	1,11
224	N224T	0,90	0,86	0,93	0,95	0,78	0,99	1,17
224	N224V	0,83	0,88	0,78	0,89	0,92	0,89	0,92
224	N224W	0,82	0,87	0,70	0,80	0,79	0,88	1,02
224	N224Y	0,92	1,03	0,81	0,89	0,87	0,77	0,93
242	S242A	1,44	1,56	1,59	1,45	1,19	1,10	0,72
242	S242C	1,73	1,99	1,84	1,93	1,97	1,06	0,46
242	S242D	1,36	1,51	1,45	1,43	1,29	1,11	0,81
242	S242G	1,24	1,20	1,29	1,22	1,12	0,92	0,93
242	S242I	1,36	1,12	1,14	1,24	1,43	1,34	0,55
242	S242K	0,80	0,70	0,92	0,92	0,99	0,86	1,26
242	S242L	0,77	0,75	1,26	1,08	1,06	0,99	0,93
242	S242M	1,56	1,70	1,48	1,78	1,54	1,10	0,55
242	S242Q	1,44	1,62	1,28	1,34	1,34	1,14	0,84
242	S242R	0,98	0,82	1,14	1,15	1,02	1,07	1,05
242	S242T	1,06	0,93	0,90	0,91	1,08	0,71	0,99
242	S242V	1,19	1,00	0,90	1,00	1,28	0,94	0,65
245	P245A	1,53	1,58	1,74	1,69	1,46	1,09	0,68
245	P245C	1,18	1,01	1,45	1,43	1,25	1,07	0,63
245	P245D	1,52	1,36	1,65	1,61	1,45	1,53	0,77
245	P245E	1,39	1,24	1,28	1,40	1,24	0,80	0,95
245	P245F	1,28	1,35	1,13	1,15	1,23	0,93	0,77
245	P245H	1,11	0,94	1,16	1,06	1,03	0,75	1,09
245	P245I	0,81	0,61	1,05	0,96	0,93	0,90	0,97
245	P245L	0,82	0,71	0,92	0,92	1,05	0,90	0,98
245	P245M	1,18	1,20	1,76	1,74	1,60	1,27	0,67
245	P245N	1,70	1,40	1,62	1,60	1,40	1,42	0,79
245	P245Q	1,49	1,22	1,61	1,52	1,26	0,99	0,96

245	P245R	1,37	1,23	1,19	1,26	1,47	1,08	0,88
245	P245S	1,16	1,01	1,20	1,21	1,07	0,88	1,07
245	P245T	1,31	0,99	1,26	1,23	1,13	0,97	0,92
245	P245V	1,03	0,95	0,97	1,00	0,94	0,75	1,00
245	P245Y	0,89	0,87	1,09	0,99	0,88	0,65	1,15
256	G256A	1,13	1,22	1,07	1,22	1,09	1,29	0,70
256	G256C	0,94	1,02	0,83	0,95	0,92	1,05	0,64
256	G256D	0,98	1,00	1,18	1,17	1,01	1,15	0,95
256	G256E	0,84	0,87	0,81	0,86	0,71	1,24	1,04
256	G256H	0,71	0,74	0,74	0,77	0,83	0,70	1,18
256	G256I	0,75	0,93	0,43	0,54	0,96	0,78	0,71
256	G256K	0,58	0,60	0,56	0,65	0,68	0,84	1,38
256	G256L	0,60	0,68	0,56	0,66	0,76	0,86	0,91
256	G256M	1,15	1,07	0,97	1,13	1,14	1,24	0,67
256	G256N	0,94	0,97	1,18	1,23	1,05	1,01	0,98
256	G256P	1,50	1,45	0,71	0,89	1,51	1,67	0,46
256	G256R	1,02	0,96	0,86	0,96	1,08	0,32	0,91
256	G256S	0,96	0,96	0,79	0,87	0,82	0,98	0,95
256	G256T	0,90	0,93	0,62	0,67	0,87	0,80	0,96
256	G256V	0,89	0,84	0,77	0,77	1,07	1,11	0,72
256	G256W	0,74	0,77	0,53	0,60	0,78	0,84	0,81
269	D269A	1,71	1,92	1,19	1,67	1,38	2,24	0,23
269	D269C	1,67	1,68	1,02	1,35	1,95	2,39	0,28
269	D269F	-8,17	-9,85	2,60	1,57	-14,68	-4,97	0,02
269	D269G	1,18	1,30	0,68	0,96	1,59	1,43	0,37
269	D269H	0,88	0,93	0,86	1,01	1,21	1,07	0,56
269	D269I	-4,21	-1,61	-2,68	-0,84	1,26	3,06	0,03
269	D269K	0,61	0,49	0,73	0,93	0,98	1,08	0,68
269	D269M	2,30	4,29	1,94	2,82	6,32	9,02	0,02
269	D269N	1,20	1,07	1,39	1,58	1,07	1,36	0,68
269	D269P	1,10	1,31	0,98	1,54	2,14	2,17	0,19

269	D269Q	1,53	1,50	1,31	1,60	1,53	1,51	0,44
269	D269R	1,11	1,09	0,80	1,25	1,59	1,26	0,39
269	D269S	0,82	0,86	0,93	0,96	0,89	0,91	1,07
269	D269T	0,76	0,98	0,78	0,96	1,43	1,43	0,30
269	D269Y	1,05	0,91	0,73	1,06	1,46	1,47	0,20
271	N271A	1,26	1,33	1,32	1,38	1,07	1,21	0,79
271	N271D	1,25	1,29	1,25	1,37	1,21	1,35	0,80
271	N271F	1,75	1,69	1,17	1,33	1,37	1,75	0,64
271	N271H	0,79	0,76	0,84	0,80	0,89	0,91	1,10
271	N271I	1,19	1,10	1,12	1,21	1,16	1,42	0,67
271	N271K	0,79	0,75	0,92	0,93	0,94	1,20	1,15
271	N271L	0,98	0,95	1,24	1,07	0,93	0,93	0,81
271	N271M	1,25	1,29	1,40	1,44	1,16	1,59	0,68
271	N271P	1,42	1,54	1,12	1,23	1,61	1,59	0,40
271	N271S	0,99	1,03	0,96	1,04	1,02	1,10	0,97
271	N271T	0,91	0,89	1,00	0,99	0,90	0,83	0,98
271	N271V	0,70	0,88	0,80	1,01	1,07	1,08	0,76
271	N271W	0,99	0,93	0,83	0,96	1,02	0,69	0,80
271	N271Y	0,95	0,87	0,86	0,96	0,84	0,94	0,78
278	T278A	1,17	1,21	1,25	1,41	1,11	1,35	0,84
278	T278E	0,92	0,80	0,99	1,13	1,06	1,35	0,88
278	T278G	-1,12	0,26	-4,08	-1,79	3,31	1,75	0,04
278	T278H	0,89	0,89	0,92	1,02	0,94	1,03	1,00
278	T278I	0,89	0,87	0,81	0,86	0,82	0,89	1,10
278	T278K	0,84	0,75	0,91	0,96	0,82	0,91	1,08
278	T278L	0,82	0,80	1,02	0,99	0,82	0,93	0,96
278	T278M	1,26	1,35	1,27	1,47	1,32	1,35	0,70
278	T278N	1,22	1,19	1,17	1,30	1,00	1,35	0,86
278	T278P	1,78	1,71	1,06	1,79	2,30	3,46	0,19
278	T278R	1,13	1,07	1,00	1,24	1,10	1,47	0,83
278	T278S	0,91	0,92	0,86	1,00	0,99	1,01	1,06

278	T278W	0,92	0,99	0,84	1,00	1,04	1,08	0,85
278	T278Y	0,76	0,84	0,79	0,90	0,72	0,87	1,04
281	N281A	1,06	1,16	1,13	1,25	1,06	1,07	0,82
281	N281D	1,08	1,33	1,09	1,22	1,41	1,29	0,61
281	N281G	0,78	0,79	0,93	0,93	0,82	0,90	1,21
281	N281H	0,76	0,82	0,83	0,87	0,73	0,63	1,10
281	N281I	0,84	0,81	0,79	0,84	0,79	0,78	1,17
281	N281L	0,66	0,72	0,77	0,78	0,58	0,55	1,43
281	N281M	1,15	1,12	0,98	1,12	0,93	1,08	0,84
281	N281P	1,15	1,18	1,09	1,18	1,05	0,89	0,85
281	N281Q	1,22	1,33	1,00	1,13	1,10	1,16	0,62
281	N281R	1,03	1,05	0,98	1,02	0,95	0,97	0,96
281	N281S	0,90	0,91	0,88	0,89	0,72	1,01	1,09
281	N281T	-0,21	1,17	-0,65	-0,27	-0,63	-0,72	0,14
281	N281V	0,85	0,88	0,80	0,87	0,76	1,07	0,86
281	N281Y	0,79	0,84	0,75	0,80	0,59	0,73	1,18
302	G302C	1,40	1,39	1,42	1,50	1,34	1,39	0,66
302	G302D	1,10	1,14	1,13	1,17	1,14	0,96	0,88
302	G302E	1,25	1,34	1,43	1,42	1,38	1,28	0,75
302	G302F	1,26	1,51	1,02	1,22	1,42	1,77	0,50
302	G302H	0,95	0,94	0,94	0,92	0,80	0,84	1,09
302	G302I	1,34	1,31	1,13	1,25	1,63	1,52	0,67
302	G302L	0,84	0,86	0,92	0,98	0,78	0,86	0,98
302	G302M	1,31	1,35	1,35	1,51	1,31	1,52	0,69
302	G302N	1,38	1,39	1,48	1,48	1,17	1,18	0,70
302	G302P	1,24	1,29	1,32	1,43	1,23	1,03	0,59
302	G302R	1,13	1,19	1,06	1,14	0,99	0,94	0,89
302	G302S	1,05	1,11	0,91	0,96	0,87	0,99	1,01
302	G302T	0,89	0,92	0,94	0,95	0,77	0,70	1,05
302	G302V	1,08	1,16	1,09	1,15	0,76	0,96	0,88
302	G302W	0,79	0,75	0,85	0,83	0,80	0,75	1,30

302	G302Y	0,91	0,98	0,91	0,99	0,75	0,92	0,93
304	A304D	1,19	1,30	1,42	1,44	1,16	1,22	0,75
304	A304E	1,70	1,57	1,41	1,47	1,45	1,45	0,69
304	A304F	1,14	1,14	1,27	1,18	0,86	0,87	1,02
304	A304H	0,85	0,85	0,77	0,83	0,81	0,68	1,15
304	A304L	0,92	0,95	0,91	0,96	0,80	0,74	1,00
304	A304M	1,18	1,21	1,45	1,49	0,98	1,18	0,72
304	A304N	1,42	1,41	1,30	1,44	1,43	1,28	0,71
304	A304P	1,24	1,30	1,24	1,35	1,49	1,34	0,77
304	A304R	1,14	1,16	1,05	1,13	0,93	1,03	0,90
304	A304S	0,84	0,94	0,80	1,15	0,87	0,71	0,67
304	A304T	1,00	1,07	0,89	0,99	0,98	0,75	0,92
304	A304V	1,16	1,18	1,13	1,21	0,94	0,70	0,81
304	A304W	0,88	0,89	0,89	0,93	0,73	0,94	1,07
304	A304Y	0,89	0,93	0,87	0,95	0,66	0,77	1,01
308	R308A	1,52	1,58	1,23	1,51	1,40	1,34	0,52
308	R308C	1,61	2,01	0,97	1,22	1,95	1,87	0,39
308	R308D	2,54	2,88	1,75	2,01	3,24	2,75	0,24
308	R308E	1,54	1,66	1,15	1,34	1,42	1,45	0,53
308	R308F	1,91	2,67	0,69	1,30	1,80	1,55	0,18
308	R308G	1,27	1,29	0,81	0,95	1,02	1,10	0,59
308	R308H	1,10	1,08	0,77	0,92	1,06	0,97	0,66
308	R308I	1,13	1,55	0,57	0,76	0,92	0,84	0,43
308	R308K	1,00	0,97	1,00	0,99	0,99	0,92	0,95
308	R308L	0,97	1,33	0,36	0,67	0,93	0,19	0,33
308	R308M	1,94	2,07	1,31	1,66	1,65	1,92	0,38
308	R308N	1,72	1,86	1,09	1,37	1,94	1,71	0,41
308	R308P	4,38	4,55	1,93	2,52	5,05	3,89	0,12
308	R308S	1,06	1,00	0,84	0,97	0,84	0,87	1,00
308	R308T	1,36	1,34	0,91	1,08	1,16	1,24	0,73
308	R308V	1,31	1,47	0,62	0,88	1,06	0,97	0,42

308	R308W	0,92	1,50	0,34	0,70	1,29	1,01	0,31
308	R308Y	0,90	1,28	0,46	0,70	0,92	1,14	0,41
321	T321A	1,07	1,20	0,95	1,19	1,44	1,33	0,84
321	T321C	1,35	1,36	0,92	1,09	1,63	1,10	0,52
321	T321F	1,00	0,96	0,90	1,00	1,14	1,07	1,03
321	T321H	0,89	0,85	0,81	0,90	1,03	1,37	1,14
321	T321I	0,81	0,87	0,66	0,77	1,13	0,93	0,83
321	T321L	0,74	0,77	0,67	0,75	0,91	0,96	1,11
321	T321P	1,23	1,25	1,08	1,18	1,69	1,22	0,79
321	T321Q	1,12	1,15	1,05	1,10	1,14	1,27	0,93
321	T321R	1,02	0,92	1,02	0,96	1,09	0,96	1,04
321	T321S	1,02	0,91	0,88	0,99	1,14	0,84	1,08
321	T321V	0,95	0,92	0,72	0,81	1,34	0,43	0,84
321	T321Y	0,76	0,82	0,69	0,77	1,23	0,79	1,04
358	Q358A	1,07	1,42	1,63	1,45	1,54	1,31	0,65
358	Q358C	1,95	2,35	1,34	1,85	2,83	1,62	0,26
358	Q358D	1,35	1,37	1,21	1,29	1,55	1,10	0,79
358	Q358E	1,30	1,35	1,22	1,27	1,57	1,02	0,74
358	Q358F	1,35	1,32	1,05	1,14	1,49	1,19	0,71
358	Q358G	1,15	1,03	0,90	0,96	1,10	1,06	0,74
358	Q358H	1,05	0,99	0,95	0,97	1,15	1,40	0,94
358	Q358L	0,92	1,06	1,05	1,06	1,24	0,84	0,83
358	Q358M	1,12	1,37	1,42	1,41	1,52	1,17	0,72
358	Q358N	1,27	1,37	1,32	1,42	1,63	1,06	0,73
358	Q358P	1,27	1,33	1,10	1,23	1,72	1,17	0,65
358	Q358R	1,03	1,07	1,08	1,07	1,18	1,15	0,91
358	Q358S	1,09	0,99	1,02	1,04	1,01	0,91	0,93
358	Q358T	1,05	1,05	1,04	1,00	1,17	1,10	0,95
358	Q358V	1,15	1,18	1,02	1,13	1,35	1,35	0,67
378	P378C	28,49	39,29	11,48	19,82	40,84	34,77	0,05
378	P378D	1,13	1,20	1,15	1,18	1,12	0,99	0,88

378	P378F	1,84	2,17	0,62	1,01	2,97	0,36	0,15
378	P378G	1,21	1,20	1,00	1,06	1,44	1,30	0,75
378	P378H	0,90	0,94	0,80	0,85	1,11	0,50	1,06
378	P378I	1,16	1,20	1,03	1,15	1,33	1,26	0,62
378	P378L	0,78	0,89	0,88	0,97	1,08	0,79	0,82
378	P378N	1,31	1,39	1,19	1,37	1,42	0,97	0,71
378	P378R	0,94	0,93	1,10	1,07	1,05	1,03	1,28
378	P378S	1,15	1,09	0,99	1,04	1,08	1,11	0,90
378	P378T	0,83	0,96	0,90	0,93	0,87	0,73	1,04
378	P378V	1,08	1,08	1,09	1,10	1,15	0,94	0,87
378	P378Y	0,87	0,92	0,78	0,91	1,11	0,97	0,67
382	S382A	1,05	1,33	1,16	1,30	1,57	1,17	0,76
382	S382C	1,20	1,19	1,01	1,12	1,27	1,05	0,87
382	S382D	1,43	1,42	1,19	1,34	1,35	1,41	0,74
382	S382E	1,23	1,39	1,14	1,27	1,47	1,23	0,83
382	S382G	1,05	1,06	0,90	0,96	0,96	0,95	1,02
382	S382H	1,10	1,02	0,96	0,99	1,10	0,98	1,00
382	S382I	1,03	1,07	0,82	0,88	1,07	0,96	0,79
382	S382K	0,94	0,84	0,95	0,98	1,12	0,78	1,09
382	S382L	0,93	0,93	0,69	0,82	0,95	0,70	0,79
382	S382M	1,51	1,84	1,25	1,51	2,20	1,47	0,54
382	S382N	1,39	1,43	1,15	1,35	1,55	1,16	0,72
382	S382P	1,41	1,42	1,22	1,33	1,65	1,25	0,70
382	S382R	1,23	1,19	0,97	1,17	1,14	0,78	0,91
382	S382T	1,18	1,15	0,98	1,08	1,30	1,14	0,90
382	S382V	1,13	1,07	0,85	0,98	1,22	0,89	0,81
382	S382W	1,08	1,03	0,90	0,98	1,19	0,94	0,98
383	K383A	1,26	1,16	1,24	1,35	1,17	0,86	0,66
383	K383C	1,85	2,15	0,60	1,01	1,16	0,02	0,16
383	K383D	1,14	1,17	1,16	1,13	1,04	0,89	0,69
383	K383E	1,04	0,98	0,98	1,00	1,00	0,82	0,94

383	K383F	1,43	1,44	0,93	1,01	1,47	0,86	0,50
383	K383H	0,80	0,78	0,79	0,84	0,97	1,03	0,96
383	K383L	0,64	0,66	0,50	0,60	0,66	0,92	0,76
383	K383M	1,32	1,19	0,94	1,10	1,20	1,01	0,57
383	K383N	1,27	1,20	0,98	1,11	1,07	1,16	0,64
383	K383P	1,89	2,46	1,17	1,37	1,82	2,31	0,22
383	K383Q	1,03	0,98	1,01	1,06	0,95	1,15	0,94
383	K383R	1,02	0,91	1,00	0,95	1,10	0,84	0,99
383	K383S	0,92	0,92	0,87	0,92	0,97	0,74	0,86
383	K383T	0,79	0,76	0,83	0,84	0,90	0,83	0,98
383	K383W	0,70	0,78	0,62	0,68	0,74	0,39	0,61
383	K383Y	0,62	0,72	0,78	0,75	0,73	0,67	0,87
398	T398A	1,28	1,18	1,34	1,43	1,37	1,17	0,73
398	T398C	1,58	1,46	1,20	1,39	1,61	1,35	0,46
398	T398D	1,29	1,24	1,33	1,33	0,88	1,42	0,75
398	T398E	1,33	1,24	1,31	1,32	1,17	1,38	0,81
398	T398I	0,81	0,87	0,91	0,96	0,91	0,86	1,04
398	T398K	0,92	0,76	0,99	0,97	0,97	0,66	1,06
398	T398L	0,76	0,68	0,85	0,87	0,86	1,14	0,99
398	T398M	1,29	1,24	1,39	1,38	1,18	1,03	0,75
398	T398N	1,96	1,88	1,34	1,58	1,23	1,31	0,37
398	T398P	1,38	1,29	1,33	1,35	0,97	1,29	0,77
398	T398Q	1,47	1,41	1,61	1,52	1,46	1,51	0,74
398	T398R	1,16	1,08	1,25	1,16	1,25	1,02	0,98
398	T398S	1,03	0,94	1,08	1,05	0,92	0,67	1,07
398	T398V	1,00	1,06	1,20	1,19	1,03	0,96	0,87
405	H405A	1,61	1,64	1,45	1,54	1,54	1,15	0,56
405	H405C	1,92	2,06	1,69	1,91	2,68	1,40	0,33
405	H405D	1,45	1,44	1,25	1,30	1,37	1,21	0,47
405	H405F	2,03	2,09	1,28	1,41	3,15	1,98	0,20
405	H405G	1,16	1,20	1,10	1,14	1,50	1,14	0,72

405	H405K	0,71	0,58	0,87	0,89	1,05	0,64	0,72
405	H405L	0,79	0,89	0,77	0,94	0,97	0,72	0,49
405	H405M	1,65	1,66	1,28	1,51	1,67	1,22	0,41
405	H405N	1,42	1,26	1,37	1,42	1,43	1,09	0,69
405	H405P	-12,67	-11,60	-0,88	-2,21	-6,12	-0,26	-0,03
405	H405Q	1,50	1,53	1,33	1,42	1,76	1,33	0,59
405	H405R	1,54	1,56	1,22	1,36	1,29	0,84	0,51
405	H405S	1,09	1,00	1,05	1,03	1,10	0,91	0,90
405	H405T	0,99	0,94	0,86	0,89	0,96	0,77	0,87
405	H405W	0,86	0,83	0,43	0,64	1,32	0,50	0,35
405	H405Y	0,96	1,07	0,84	0,93	1,37	0,96	0,50
417	T417A	1,55	1,30	1,42	1,39	1,28	1,05	0,71
417	T417D	1,55	1,28	1,40	1,43	1,14	1,34	0,80
417	T417E	1,22	1,07	1,16	1,17	1,12	1,07	0,89
417	T417H	0,98	0,89	0,91	0,95	1,07	0,89	0,98
417	T417I	1,00	0,99	0,79	0,84	0,90	0,82	0,82
417	T417L	0,87	0,79	0,88	0,89	0,98	1,03	0,92
417	T417M	1,65	1,65	1,39	1,52	1,82	1,41	0,49
417	T417P	1,38	1,25	1,34	1,35	1,26	1,12	0,74
417	T417Q	1,47	1,24	1,21	1,24	1,40	1,26	0,84
417	T417R	1,34	1,15	1,36	1,31	1,13	1,08	0,85
417	T417S	1,10	0,95	1,01	1,03	0,96	1,13	1,02
417	T417V	0,88	0,86	0,85	0,92	0,97	0,94	0,97
417	T417W	0,97	0,84	0,72	0,89	1,01	0,77	0,90
418	E418A	1,16	1,16	1,32	1,29	1,44	0,99	0,83
418	E418C	1,14	1,24	0,98	1,10	1,21	0,73	0,66
418	E418D	0,94	0,94	1,06	1,11	0,98	0,84	0,96
418	E418G	0,68	0,70	0,81	0,82	0,82	0,58	1,17
418	E418H	0,71	0,73	0,76	0,80	0,87	0,75	1,04
418	E418I	0,80	0,75	0,76	0,79	1,09	0,70	0,97
418	E418K	0,68	0,62	0,68	0,71	0,77	0,79	1,27

418	E418L	0,69	0,64	0,72	0,78	0,39	0,47	1,08
418	E418M	0,96	0,95	1,01	1,07	1,33	0,81	0,86
418	E418N	1,00	1,01	1,18	1,20	1,11	0,87	0,83
418	E418P	1,04	1,03	1,15	1,19	1,09	0,72	0,87
418	E418Q	1,11	1,13	1,05	1,16	1,22	0,76	0,84
418	E418R	1,08	1,01	0,95	1,03	1,26	1,01	0,86
418	E418S	1,03	0,94	0,80	0,85	0,94	0,85	0,86
418	E418T	0,87	0,80	0,82	0,84	0,91	0,50	1,09
418	E418V	0,71	0,65	0,66	0,82	0,83	0,34	1,22
418	E418Y	0,80	0,77	0,65	0,79	0,88	0,59	0,81
420	P420A	1,16	1,17	1,41	1,49	1,36	0,97	0,81
420	P420C	1,17	1,32	1,37	1,47	1,09	1,02	0,70
420	P420D	1,29	1,25	1,37	1,38	1,35	0,90	0,75
420	P420E	1,32	1,27	1,32	1,35	1,45	0,79	0,75
420	P420H	1,05	0,95	0,95	1,01	1,11	0,69	0,98
420	P420I	0,98	0,95	0,87	0,95	1,07	0,62	0,98
420	P420L	0,85	0,82	0,87	0,91	1,07	0,74	0,97
420	P420M	1,37	1,41	1,33	1,29	1,28	0,75	0,73
420	P420N	1,42	1,38	1,30	1,41	1,50	0,95	0,73
420	P420R	0,49	-5,15	-1,38	-0,61	-11,09	-1,99	-0,01
420	P420S	1,01	0,88	1,10	1,09	0,93	0,81	1,11
420	P420T	0,97	0,87	0,94	0,95	0,68	0,87	1,10
420	P420V	1,11	1,06	1,10	1,12	1,21	0,77	0,84
420	P420W	0,72	0,69	0,71	0,75	0,80	0,54	1,29
420	P420Y	0,90	0,83	0,80	0,76	1,05	0,85	0,96
421	G421A	1,36	1,28	1,23	1,30	1,31	0,79	0,79
421	G421D	1,23	1,28	1,43	1,38	1,28	0,99	0,72
421	G421E	1,44	1,43	1,47	1,46	1,48	1,23	0,66
421	G421F	1,23	1,19	1,13	1,13	1,50	0,75	0,79
421	G421H	0,91	0,81	0,80	0,84	0,69	0,71	1,19
421	G421I	1,19	1,13	0,97	1,08	1,38	0,80	0,65

421	G421L	0,80	0,77	0,91	0,95	1,24	0,74	0,97
421	G421N	1,28	1,30	1,23	1,34	1,49	0,82	0,75
421	G421P	1,20	1,22	1,22	1,27	1,41	0,83	0,74
421	G421Q	1,31	1,27	1,27	1,29	1,30	1,15	0,75
421	G421R	1,17	1,04	1,05	1,09	1,08	0,85	1,00
421	G421S	1,11	1,02	1,05	1,04	1,05	0,80	0,97
421	G421T	1,04	0,91	0,95	0,98	1,05	0,86	1,05
421	G421W	0,84	0,85	0,86	0,94	0,94	0,74	0,96
421	G421Y	0,98	0,86	0,89	0,94	1,12	0,64	0,95
432	P432A	1,40	1,30	1,44	1,53	1,64	1,26	0,75
432	P432D	1,77	1,59	1,72	1,77	1,95	1,24	0,61
432	P432E	1,39	1,29	1,40	1,41	1,33	1,19	0,77
432	P432H	1,14	1,07	0,83	1,01	1,35	0,97	0,80
432	P432K	1,21	0,96	1,05	1,08	1,22	1,02	0,91
432	P432L	1,06	0,90	0,98	0,98	1,26	0,63	0,97
432	P432M	1,48	1,47	1,72	1,71	2,15	1,45	0,65
432	P432N	1,31	1,38	1,28	1,41	1,59	1,02	0,73
432	P432Q	1,62	1,39	1,31	1,46	1,69	1,46	0,70
432	P432R	1,60	1,35	1,36	1,43	1,27	1,21	0,78
432	P432S	1,16	1,02	0,94	1,00	1,07	0,78	1,04
432	P432T	1,19	0,99	1,33	1,13	1,27	1,08	0,98
432	P432Y	1,14	0,98	0,82	0,94	1,21	0,69	0,90
437	W437C	0,83	0,77	1,09	1,15	0,89	0,84	1,01
437	W437D	0,97	0,85	1,12	1,15	0,98	0,97	1,08
437	W437E	0,99	1,00	0,79	0,87	0,95	0,76	0,59
437	W437F	1,01	0,81	0,94	1,00	0,74	0,80	1,22
437	W437G	0,83	0,72	0,82	0,82	0,78	0,66	1,42
437	W437H	0,65	0,64	0,83	0,84	0,78	0,71	1,52
437	W437L	0,64	0,60	0,73	0,75	0,59	0,68	1,55
437	W437M	1,03	0,86	1,01	1,06	0,83	0,63	1,11
437	W437N	1,01	0,94	1,02	1,06	0,87	1,07	1,04

437	W437Q	1,05	0,90	1,08	1,11	0,90	0,77	1,12
437	W437R	0,91	0,83	1,07	1,02	0,83	0,53	1,19
437	W437S	0,96	0,75	0,99	0,96	0,86	0,90	1,24
437	W437T	0,78	0,71	0,92	0,89	0,77	0,71	1,32
437	W437V	0,75	0,73	0,90	0,87	0,81	0,87	1,36
437	W437Y	0,66	0,59	0,78	0,77	0,64	0,68	1,50
443	Q443A	1,24	1,01	1,35	1,32	1,08	1,08	0,83
443	Q443C	1,27	1,23	1,16	1,22	1,02	1,22	0,80
443	Q443F	1,26	1,14	1,18	1,20	1,10	1,15	0,86
443	Q443G	1,12	0,94	1,11	1,02	1,01	1,00	1,08
443	Q443K	0,79	0,75	0,93	0,90	0,83	0,76	1,10
443	Q443L	0,84	0,81	1,07	1,02	0,89	0,85	1,09
443	Q443N	1,22	1,18	1,41	1,53	1,21	1,23	0,77
443	Q443P	1,02	0,97	1,08	1,16	1,03	0,64	0,92
443	Q443R	1,06	1,03	1,03	1,10	0,99	0,98	0,98
443	Q443S	0,89	0,82	0,95	0,94	0,84	0,87	1,20
443	Q443T	1,01	0,76	0,88	0,89	0,89	0,69	1,15
443	Q443V	1,02	0,90	1,09	1,10	1,23	1,03	0,95
443	Q443W	0,57	0,59	0,57	0,63	0,65	0,63	0,87
443	Q443Y	0,82	0,87	0,95	0,97	0,97	0,86	0,92
446	G446A	1,00	0,91	1,25	1,26	0,97	1,08	0,95
446	G446C	1,39	1,31	1,84	1,78	1,40	1,23	0,73
446	G446D	1,12	0,99	1,15	1,25	1,15	0,97	0,93
446	G446F	1,34	1,37	1,00	1,15	1,03	1,22	0,75
446	G446H	0,93	0,80	0,65	0,70	0,84	0,83	1,32
446	G446I	1,22	1,07	0,97	1,04	1,39	1,05	0,70
446	G446K	0,97	0,83	0,80	0,86	0,70	0,87	1,10
446	G446L	0,80	0,78	0,86	0,88	0,94	0,85	1,07
446	G446M	1,21	1,05	0,85	0,99	1,06	1,16	0,87
446	G446N	1,17	1,08	1,05	1,21	1,07	1,07	0,88
446	G446P	1,21	1,09	1,07	1,16	1,09	0,95	0,74

446	G446Q	1,28	1,21	1,16	1,23	1,09	1,01	0,83
446	G446R	0,37	0,07	0,71	1,10	0,22	0,65	0,75
446	G446S	1,07	0,95	0,95	0,95	0,75	1,01	1,11
446	G446T	1,03	0,88	0,69	0,81	0,91	0,96	1,09
446	G446V	1,17	1,09	0,91	0,98	1,14	0,90	0,82
446	G446W	0,85	0,72	0,83	0,89	0,92	0,80	1,05
446	G446Y	0,88	0,76	1,02	1,00	0,83	0,91	1,09
454	G454A	1,33	1,25	1,61	1,60	1,14	1,26	0,88
454	G454C	1,33	1,18	1,15	1,20	1,14	1,37	0,78
454	G454D	1,40	1,30	1,27	1,36	1,18	1,09	0,76
454	G454E	1,36	1,21	1,08	1,19	0,99	0,91	0,83
454	G454H	0,92	0,83	0,89	0,95	0,83	0,83	1,10
454	G454I	0,87	0,79	0,77	0,82	0,88	0,75	1,02
454	G454K	0,86	0,80	0,99	0,97	0,82	0,81	1,13
454	G454L	0,12	-0,34	-0,62	-0,26	0,50	-0,62	0,11
454	G454M	1,39	1,26	1,14	1,42	1,26	1,30	0,68
454	G454N	1,20	1,09	1,07	1,20	1,11	1,10	0,91
454	G454P	1,41	1,34	1,14	1,29	1,16	0,96	0,77
454	G454R	1,25	1,09	0,99	1,12	1,07	1,01	0,92
454	G454S	0,83	0,80	0,83	0,90	0,89	0,79	1,17
454	G454T	1,04	0,93	0,90	0,98	0,99	0,94	1,02
454	G454V	1,20	1,07	1,05	1,10	1,18	0,89	0,93
457	S457A	1,05	0,95	1,22	1,27	1,23	1,21	0,89
457	S457C	1,27	1,23	0,72	0,72	1,53	1,44	0,59
457	S457D	1,02	0,89	1,05	1,16	0,93	0,81	0,99
457	S457E	1,10	0,95	0,97	1,06	0,97	0,79	0,95
457	S457G	0,82	0,71	0,82	0,87	0,80	0,88	1,21
457	S457H	0,83	0,72	0,81	0,90	0,89	1,12	1,17
457	S457K	0,74	0,63	0,79	0,86	0,76	0,62	1,37
457	S457L	0,67	0,61	0,68	0,79	0,64	0,63	1,27
457	S457M	1,07	0,98	0,96	1,08	1,03	0,99	0,92

457	S457N	1,08	0,92	1,10	1,19	1,13	1,15	0,86
457	S457P	1,29	1,21	1,09	1,18	1,30	1,19	0,88
457	S457Q	1,10	1,01	1,06	1,13	1,14	0,96	0,91
457	S457R	1,58	1,31	0,89	1,10	1,59	1,89	0,42
457	S457T	0,88	0,70	0,94	0,94	0,85	1,01	1,18
457	S457V	0,89	0,82	0,83	0,88	0,84	0,78	1,11
457	S457W	0,87	0,69	0,64	0,74	0,84	0,60	1,05
457	S457Y	0,81	0,70	0,70	0,80	0,80	0,79	1,15
459	T459A	1,10	1,03	1,25	1,34	1,46	1,18	0,83
459	T459D	1,20	1,17	1,19	1,24	1,37	1,44	0,82
459	T459G	1,15	1,01	0,98	0,97	0,81	1,36	1,08
459	T459I	1,05	0,95	0,95	1,01	1,04	1,04	1,02
459	T459K	1,04	0,91	0,86	0,90	0,80	0,72	1,08
459	T459L	0,93	0,83	1,19	1,10	0,91	0,81	1,04
459	T459Q	1,46	1,43	1,40	1,47	1,29	1,24	0,72
459	T459R	1,09	1,00	1,09	1,09	0,90	0,97	1,05
459	T459S	0,99	1,00	0,85	0,87	1,04	0,90	1,06
459	T459V	1,11	1,02	0,92	0,99	1,07	1,35	0,93
459	T459Y	1,10	1,02	0,97	1,06	1,14	0,74	0,92
461	T461A	1,40	1,44	1,16	1,28	1,74	1,18	0,47
461	T461D	1,26	1,09	1,21	1,25	1,25	1,10	0,92
461	T461E	1,52	1,44	1,49	1,43	1,22	1,06	0,74
461	T461F	1,29	1,22	1,31	1,25	1,14	1,12	0,79
461	T461G	1,09	1,03	1,08	1,04	1,16	1,14	0,98
461	T461I	1,11	1,00	0,99	1,05	1,03	1,33	0,93
461	T461K	0,89	0,75	0,78	0,91	0,98	0,99	1,01
461	T461L	0,92	0,85	1,03	1,02	1,15	0,91	0,87
461	T461N	1,18	1,18	1,35	1,37	1,36	1,30	0,81
461	T461P	1,19	1,10	1,37	1,33	1,14	1,17	0,92
461	T461R	1,19	1,04	1,13	1,18	1,11	0,91	0,99
461	T461S	1,12	1,04	0,87	0,88	1,03	0,90	0,88

461	T461V	0,95	1,00	1,01	1,05	1,11	1,28	0,87
461	T461W	0,97	0,82	0,77	0,86	0,75	0,67	0,87
461	T461Y	1,02	0,93	0,90	1,02	1,01	1,11	0,87
464	S464D	1,45	1,23	1,24	1,31	1,51	1,21	0,73
464	S464E	0,95	0,98	1,04	1,06	1,06	1,23	1,03
464	S464G	0,94	0,86	0,92	1,00	0,98	0,97	1,04
464	S464H	0,88	0,84	0,82	0,87	0,99	1,04	1,10
464	S464I	0,94	0,80	0,78	0,83	0,96	1,15	1,00
464	S464K	0,94	0,85	0,88	0,93	0,93	0,81	0,97
464	S464L	0,77	0,81	0,79	0,91	0,88	0,86	1,02
464	S464M	1,32	1,27	1,35	1,50	1,18	1,42	0,81
464	S464N	1,15	1,03	1,16	1,25	1,18	1,38	0,85
464	S464P	1,42	1,38	1,32	1,42	1,40	1,56	0,76
464	S464Q	1,33	1,30	1,12	1,29	1,28	1,21	0,80
464	S464V	0,94	0,96	0,94	1,02	1,12	1,33	0,89
464	S464W	1,06	0,95	0,94	1,08	0,98	0,84	1,01
464	S464Y	0,81	0,71	1,01	1,02	0,75	0,84	1,33
474	G474A	1,03	1,20	1,25	1,35	1,12	1,27	0,81
474	G474C	1,05	1,30	1,18	1,31	1,55	1,04	0,66
474	G474D	1,13	1,26	1,35	1,41	1,26	1,28	0,78
474	G474E	1,13	1,13	1,17	1,27	1,16	1,23	0,87
474	G474F	1,23	1,34	1,20	1,29	1,22	1,47	0,80
474	G474H	0,86	0,95	0,94	1,02	1,06	1,11	1,07
474	G474I	0,79	0,99	0,91	0,97	0,95	0,81	0,99
474	G474K	0,81	0,82	0,92	0,97	1,06	0,97	1,07
474	G474L	0,70	0,75	0,81	0,87	0,88	0,91	1,12
474	G474M	1,18	1,26	1,24	1,40	1,20	1,05	0,74
474	G474N	1,14	1,02	1,09	1,16	1,29	1,29	0,89
474	G474P	1,53	1,45	1,25	1,38	1,39	0,36	0,72
474	G474Q	1,19	1,14	1,26	1,33	1,35	1,37	0,79
474	G474R	1,15	1,17	1,16	1,29	1,31	1,41	0,82

474	G474S	0,87	0,89	0,97	0,99	1,00	0,93	1,09
474	G474T	0,97	1,01	1,13	1,06	1,03	1,00	1,01
474	G474V	0,88	0,91	1,03	1,02	1,03	0,94	1,01
483	R483A	1,25	1,23	1,35	1,43	1,43	1,34	0,74
483	R483C	1,19	1,17	1,73	1,51	1,19	1,59	0,70
483	R483F	1,08	1,49	1,36	1,23	1,51	1,18	0,57
483	R483G	1,07	1,13	1,07	1,12	1,14	1,08	0,86
483	R483K	0,82	0,73	0,86	0,90	0,91	0,69	1,12
483	R483L	1,10	1,03	1,29	1,20	1,06	0,93	0,94
483	R483M	1,31	1,50	1,42	1,56	1,51	1,26	0,66
483	R483N	1,17	1,32	1,46	1,39	1,34	1,09	0,75
483	R483P	1,19	1,17	1,37	1,35	1,17	1,05	0,83
483	R483Q	1,38	1,48	1,84	1,67	1,72	1,51	0,65
483	R483S	0,99	1,05	0,92	0,96	1,04	0,94	1,02
483	R483T	1,10	1,03	1,04	0,98	0,98	0,93	0,93
483	R483V	1,11	1,18	1,25	1,26	1,25	1,20	0,80
483	R483Y	0,81	0,86	1,07	1,06	1,04	0,81	0,96

Será evidente que um grande número de substituições produziu α -amilases variantes tendo uma ou mais propriedades melhoradas em comparação com a α -amilase selvagem. Estas substituições estão incluídas nas presentes composições e métodos.

5 Exemplo 24. Propriedade alterada de variantes de AmyS

Este exemplo mostra que algumas variantes de α -amilase de *G. stearothermophilus* (AmyS) (descritas no Exemplo 22) têm uma propriedade alterada em relação à α -amilase parental. Um rastreamento de alto rendimento de estabilidade térmica de variantes de AmyS foi realizado como descrito no Exemplo 3. Os índices de desempenho para atividade (medidos como ensaio de BODIPY) e atividade residual (após estresse térmico) são mostrados nas Tabelas 24-1, 24-2, 24-3.

TABELA 24-1: Posições na proteína AmyS com mutações (mostradas na coluna rotulada Variante) que tem índices de desempenho tanto para atividade quanto para atividade residual após estresse térmico melhores do que

a AmyS selvagem.

Variante	Atividade	Atividade Residual
72 D	1,0300361	1,0701945
74 A	1,0821966	1,2443197
74 E	1,0425346	1,0348158
74 G	1,1272413	1,0873821
74 H	1,0489031	1,0047597
74 I	1,0441329	1,0204416
74 Y	1,0962024	1,0243028
86 E	1,0744425	1,0082956
86 K	1,0320588	1,0003874
115 E	1,0371929	1,0263233
115 K	1,0983963	1,1179136
115 L	1,0304852	1,2220073
115 N	1,0617811	1,0373701
115 Q	1,0585819	1,0086197
115 R	1,0362569	1,0196812
115 Y	1,0818022	1,0155115
124 A	1,0066154	1,0764058
124 K	1,0875013	1,3977188
124 N	1,2073767	1,1957849
124 Q	1,0581528	1,1748222
124 R	1,0401245	1,2046408
125 N	1,2111343	1,111989
132 A	1,0229275	1,3339209
135 F	1,0125922	1,1400675
145 A	1,0535347	1,269397
146 A	1,0159296	1,2695343
146 D	1,0111003	1,0989512
146 E	1,0209598	1,076157
146 T	1,0557131	1,0905141
146 W	1,0503671	1,0446909

Variante	Atividade	Atividade Residual
148 A	1,1550962	1,3714229
148 E	1,0257123	1,1367377
148 F	1,0047267	1,0833811
148 R	1,1439066	1,0724962
153 A	1,0933406	1,1903028
153 D	1,047218	1,0763254
153 G	1,0314126	1,0393344
153 H	1,0243746	1,0325474
153 N	1,0749307	1,1537286
153 P	1,1090313	1,1653113
153 R	1,0695773	1,050884
159 A	1,2514424	1,8489959
159 C	1,1389324	1,4229765
159 D	1,3042895	1,616517
159 E	1,3048703	1,6426287
159 F	1,0692526	1,2740874
159 G	1,309088	1,4806394
159 H	1,2239861	1,4766606
159 K	1,3024788	1,6188749
159 L	1,2438467	1,7685564
159 N	1,4021695	1,747298
159 R	1,3445318	1,6062932
159 S	1,3352659	1,5322275
159 T	1,2115923	1,5982316
159 V	1,1075763	1,5364844
169 L	1,2709	1,221157
169 M	1,0720854	1,2525822
169 Y	1,1519097	1,3009779
179 A	1,2856782	1,4150905
179 Q	1,0837406	1,0777175
180 A	1,223674	1,1463487
181 A	1,5853606	2,5498838

Variante	Atividade	Atividade Residual
181 C	1,0805237	1,2359592
181 D	1,2451756	1,4958763
181 E	1,2126846	1,3673333
181 F	1,1174172	1,0714025
181 L	1,0562715	1,2603028
181 M	1,0553459	1,1115696
181 N	1,0657087	1,058626
181 P	1,3407541	1,8191875
181 Q	1,1827757	1,3094913
181 R	2,1023852	1,000651
181 V	1,2072805	1,2882775
181 Y	1,1468422	1,2888335
187 L	1,0631177	1,1713174
242 D	1,053295	1,2659451
242 E	1,1904636	1,4089496
242 G	1,0897161	1,0670134
259 M	1,054788	1,1174398
261 L	1,1311136	1,2682418
271 K	1,0660617	1,1281026
271 V	1,0912656	1,3024768
278 A	1,1681249	1,3749858
278 H	1,2287582	1,3214257
278 K	1,2908668	1,3351968
278 N	1,2587781	1,4816971
278 R	1,2602246	1,3802029
278 S	1,0407916	1,051006
281 A	1,0778757	1,302493
281 I	1,0773434	1,0691046
281 L	1,0664433	1,5428781
281 M	1,2357293	1,317267
281 P	1,1452343	1,1634661
281 R	1,1498741	1,1898966

Variante	Atividade	Atividade Residual
281 Y	1,0366211	1,0814182
302 C	1,0627926	1,0743991
302 D	1,3067743	1,3085968
302 E	1,0492343	1,1151221
302 M	1,0807557	1,2463993
304 D	1,1358974	1,304862
304 E	1,1872403	1,2138013
304 F	1,1250781	1,0476505
304 M	1,2316987	1,2224245
304 N	1,0270711	1,0584592
304 P	1,0166456	1,0403283
304 R	1,0960387	1,0336549
304 V	1,0716606	1,0416779
304 W	1,1600113	1,0109269
304 Y	1,3289811	1,1964204
308 A	1,0074309	1,189004
321 A	1,0826055	1,2311805
321 H	1,384587	1,4691649
321 Q	1,3306703	1,3485614
321 R	1,2446359	1,3138378
321 S	1,1483705	1,1251132
321 Y	1,0396471	1,1263643
333 Q	1,425789	1,6656427
378 D	1,0880667	1,2202146
378 N	1,0064817	1,2616767
378 R	1,0264777	1,2826859
378 T	1,042994	1,0795534
382 D	1,1628676	1,2206133
382 G	1,0050534	1,009576
382 K	1,1896345	1,178075
382 N	1,0241429	1,1576205
382 P	1,001145	1,0672392

Variante	Atividade	Atividade Residual
398 A	1,0127464	1,2067063
418 A	1,070915	1,3701437
418 M	1,101424	1,3091549
418 N	1,1440828	1,4650527
420 A	1,1288416	1,2216203
420 D	1,0368387	1,065286
420 M	1,011372	1,1274183
420 N	1,0213745	1,1440374
421 E	1,010536	1,0961403
421 H	1,0434891	1,0576175
421 L	1,0197128	1,0679988
421 N	1,092512	1,1299631
421 Q	1,0784982	1,1126707
421 R	1,142674	1,2396538
421 T	1,0098565	1,023113
432 A	1,1828859	1,4534375
432 D	1,1261465	1,2701694
432 E	1,0932052	1,1438228
432 K	1,0432215	1,1145887
432 L	1,1040571	1,2896033
432 M	1,1530369	1,3947422
432 N	1,1373288	1,2843802
432 Q	1,2305257	1,3438957
432 R	1,1226193	1,2108348
432 S	1,1383528	1,1690319
432 T	1,0946975	1,1651163
432 Y	1,0242088	1,2209025
437 C	1,0389223	1,0550093
437 D	1,0648095	1,2263069
437 F	1,0884138	1,0761389
437 G	1,1270339	1,2057266
437 H	1,0624587	1,2128077

Variante	Atividade	Atividade Residual
437 L	1,0706178	1,2702869
437 M	1,1727007	1,3357945
437 N	1,0678835	1,1245993
437 Q	1,0533035	1,1845926
437 R	1,0211609	1,01587
437 S	1,0996009	1,0837657
437 V	1,0035949	1,1373234
437 Y	1,2190374	1,428939
443 G	1,039287	1,0340347
443 L	1,0229234	1,0966951
443 P	1,0219417	1,0948128
446 A	1,2002798	1,498028
446 D	1,0773299	1,1176728
446 H	1,0897531	1,071114
446 K	1,039616	1,0263734
446 N	1,1867752	1,1501356
446 R	1,0179243	1,035122
446 S	1,00426	1,0219768
446 Y	1,1205486	1,2525673
459 I	1,0404304	1,0379194
459 M	1,0320006	1,1066777
459 Y	1,0131462	1,0198803
461 P	1,084833	1,1869717
464 D	1,0164453	1,0297077
464 H	1,0355113	1,0962268
464 L	1,0084324	1,0510274
464 M	1,0026999	1,1589373
464 N	1,0727228	1,1205096
464 Q	1,0719588	1,2199585
464 Y	1,1888873	1,3747167
474 A	1,1556971	1,3935021
474 D	1,0692943	1,1879003

Variante	Atividade	Atividade Residual
474 E	1,1729152	1,3481142
474 F	1,0633952	1,1462803
474 H	1,0620029	1,1722857
474 I	1,0766474	1,1352128
474 K	1,1240341	1,2036886
474 L	1,110407	1,267509
474 M	1,1869843	1,3422689
474 N	1,1135684	1,2124349
474 P	1,0761861	1,2293237
474 Q	1,2580448	1,3477339
474 R	1,1994238	1,3506214
474 S	1,2348915	1,2615358
474 T	1,1757697	1,1841873
474 V	1,0823992	1,2078523

TABELA 24-2: Posições na proteína AmyS com mutações (mostradas na coluna rotulada Variante) que têm índices de desempenho para atividade após estresse térmico pelo menos 20% melhores que a AmyS selvagem e índices de desempenho para início de atividade ou expressão pelo menos a metade da AmyS selvagem.

Variante	Atividade	Atividade Residual
74A	1,0821966	1,2443197
115L	1,0304852	1,2220073
124K	1,0875013	1,3977188
124R	1,0401245	1,2046408
132A	1,0229275	1,3339209
132C	0,9072598	1,2271522
135A	0,9014583	1,2604591
145A	1,0535347	1,269397
146A	1,0159296	1,2695343
148A	1,1550962	1,3714229
148N	0,8803735	1,202166
159A	1,2514424	1,8489959

Variante	Atividade	Atividade Residual
159C	1,1389324	1,4229765
159D	1,3042895	1,616517
159E	1,3048703	1,6426287
159F	1,0692526	1,2740874
159G	1,309088	1,4806394
159H	1,2239861	1,4766606
159K	1,3024788	1,6188749
159L	1,2438467	1,7685564
159N	1,4021695	1,747298
159R	1,3445318	1,6062932
159S	1,3352659	1,5322275
159T	1,2115923	1,5982316
159V	1,1075763	1,5364844
169A	0,9976004	1,3149706
169L	1,2709	1,221157
169M	1,0720854	1,2525822
169Y	1,1519097	1,3009779
179A	1,2856782	1,4150905
181A	1,5853606	2,5498838
181C	1,0805237	1,2359592
181D	1,2451756	1,4958763
181E	1,2126846	1,3673333
181L	1,0562715	1,2603028
181P	1,3407541	1,8191875
181Q	1,1827757	1,3094913
181V	1,2072805	1,2882775
181Y	1,1468422	1,2888335
242A	0,8658592	1,3402797
242D	1,053295	1,2659451
242E	1,1904636	1,4089496
242Q	0,9905304	1,8848517
261L	1,1311136	1,2682418
271A	0,9883235	1,3367718
271V	1,0912656	1,3024768
278A	1,1681249	1,3749858
278H	1,2287582	1,3214257

Variante	Atividade	Atividade Residual
278K	1,2908668	1,3351968
278N	1,2587781	1,4816971
278R	1,2602246	1,3802029
281A	1,0778757	1,302493
281L	1,0664433	1,5428781
281M	1,2357293	1,317267
302D	1,3067743	1,3085968
302M	1,0807557	1,2463993
304D	1,1358974	1,304862
304E	1,1872403	1,2138013
304M	1,2316987	1,2224245
321A	1,0826055	1,2311805
321H	1,384587	1,4691649
321Q	1,3306703	1,3485614
321R	1,2446359	1,3138378
333Q	1,425789	1,6656427
378D	1,0880667	1,2202146
378N	1,0064817	1,2616767
378R	1,0264777	1,2826859
382D	1,1628676	1,2206133
398A	1,0127464	1,2067063
418A	1,070915	1,3701437
418M	1,101424	1,3091549
418N	1,1440828	1,4650527
420A	1,1288416	1,2216203
421R	1,142674	1,2396538
432A	1,1828859	1,4534375
432D	1,1261465	1,2701694
432L	1,1040571	1,2896033
432M	1,1530369	1,3947422
432N	1,1373288	1,2843802
432Q	1,2305257	1,3438957
432R	1,1226193	1,2108348
432Y	1,0242088	1,2209025
437D	1,0648095	1,2263069
437G	1,1270339	1,2057266

Variante	Atividade	Atividade Residual
437H	1,0624587	1,2128077
437L	1,0706178	1,2702869
437M	1,1727007	1,3357945
437Y	1,2190374	1,428939
446A	1,2002798	1,498028
446Y	1,1205486	1,2525673
454A	0,9816646	1,2570919
464Q	1,0719588	1,2199585
464Y	1,1888873	1,3747167
474A	1,1556971	1,3935021
474E	1,1729152	1,3481142
474K	1,1240341	1,2036886
474L	1,110407	1,267509
474M	1,1869843	1,3422689
474N	1,1135684	1,2124349
474P	1,0761861	1,2293237
474Q	1,2580448	1,3477339
474R	1,1994238	1,3506214
474S	1,2348915	1,2615358
474V	1,0823992	1,2078523

TABELA 24-3: Posições na proteína AmyS com mutações (mostradas na coluna rotulada Variante) que têm índices de desempenho para atividade ou expressão pelo menos 20% maiores que a AmyS selvagem.

Variante	Atividade	Atividade Residual
124N	1,2073767	1,1957849
125A	1,372718	-0,3461869
125K	1,2754087	-0,3195654
125N	1,2111343	1,111989
130A	1,2829276	-0,1606582
130S	1,2547959	-0,2396474
159A	1,2514424	1,8489959
159D	1,3042895	1,616517
159E	1,3048703	1,6426287
159G	1,309088	1,4806394

Variante	Atividade	Atividade Residual
159H	1,2239861	1,4766606
159K	1,3024788	1,6188749
159L	1,2438467	1,7685564
159N	1,4021695	1,747298
159R	1,3445318	1,6062932
159S	1,3352659	1,5322275
159T	1,2115923	1,5982316
166F	1,3226117	0,9751853
166G	1,3251188	-0,8989095
166H	1,5608888	0,889625
166S	1,5553953	-0,4698927
166Y	1,3161377	0,9404254
169L	1,2709	1,221157
179A	1,2856782	1,4150905
179P	1,2367832	-0,2832651
180A	1,223674	1,1463487
180D	1,3732003	0,5446904
180H	1,3854073	-0,9190277
180K	1,4038831	-1,1078033
180L	1,6414819	-0,6936105
180N	1,2646998	-1,0108408
180T	1,4553893	-0,8759486
180V	1,2190216	-1,0611484
180Y	1,3113267	0,6162484
181A	1,5853606	2,5498838
181D	1,2451756	1,4958763
181E	1,2126846	1,3673333
181G	1,2893058	0,9117403
181P	1,3407541	1,8191875
181R	2,1023852	1,000651
181S	1,2285225	0,9373869
181V	1,2072805	1,2882775
187A	1,3658382	-0,221251
187C	1,3181513	-0,2335241
187K	1,2523832	-0,2685104
187N	1,2632558	0,127576

Variante	Atividade	Atividade Residual
187P	1,4102122	-0,2495879
187Q	1,2477941	-0,2008265
187R	1,3445711	-0,2482154
187S	1,2513011	-0,2208563
242H	1,280464	0,7629545
242N	1,29758	0,8729278
278H	1,2287582	1,3214257
278K	1,2908668	1,3351968
278N	1,2587781	1,4816971
278R	1,2602246	1,3802029
281M	1,2357293	1,317267
302D	1,3067743	1,3085968
304M	1,2316987	1,2224245
304Y	1,3289811	1,1964204
321H	1,384587	1,4691649
321Q	1,3306703	1,3485614
321R	1,2446359	1,3138378
333Q	1,425789	1,6656427
432Q	1,2305257	1,3438957
437Y	1,2190374	1,428939
446A	1,2002798	1,498028
474Q	1,2580448	1,3477339
474S	1,2348915	1,2615358

Com base nos dados de desempenho relativo e dados de estabilidade das posições de AmyS descritas na Tabela 23-1, 24-1, 24-2 e Tabela 24-3, as posições de AmyS foram classificadas como restritivas versus não restritivas como se segue: posições não restritivas têm $\geq 20\%$ de mutações neutras para pelo menos uma propriedade. Estas posições são boas candidatas para a mutação ao construir α -amilases engendradas porque as mutações nesta posição têm uma alta probabilidade de desempenho aumentado. As posições restritivas têm $< 20\%$ de mutações neutras para atividade e estabilidade. Estas posições são geralmente deixadas sozinhas (*isto é*, não mudadas) ao engendrar as variantes de α -amilase, já que mutação nestas posições tende a reduzir, ao invés de aumentar o desempenho. Todas as

posições/sítios descritos na Tabela 23-1 são não restritivos.

Exemplo 25. Bibliotecas Posicionais Adicionais na proteína AmyS

Além das variantes de AmyS descritas no Exemplo 22, bibliotecas posicionais em sítios adicionais foram geradas em α -amilase de *G. stearothermophilus* com um truncamento (SEQ ID NO: 2). As bibliotecas foram produzidas por Geneart (Geneart GmbH, Josef-Engert-strasse 11, D-93053 Regensburg, DE). A Tabela 25-1 mostra as variantes de sítio que foram geradas:

TABELA 25-1: Sítios Variantes gerados em AmyS
N5: A,C,E,F,G,H, I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
G6: A,D,E,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
E13: A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
W14: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y
Y15: A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W
L16: A,D,E,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D18: A,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
G20: A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K25: A,C,D,E,F,G,H,L,M,N,P,Q,R,S,T,Y
A27: C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
E29: A,D,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
L36: A,C,D,E,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
T39: C,D,E,F,G,H,K,M,N,P,Q,R,S,V,W
T50: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
R52: A,C,D,E,G,H,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
S53: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,T,V,W,Y
D54: A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
E67: A,C,D,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
K71: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
T73: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,V,W,Y
R75: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,P,Q,S,T,V,W,Y
K77: A,C,D,E,F,G,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
T80: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
K81: A,C,D,E,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Q83: A,C,D,E,G,G,H,I,L,M,P,R,S,T,V,W,Y
L85: A,C,D,E,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
A90: C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,O,Q,R,S,T,V,W,Y

TABELA 25-1: Sítios Variantes gerados em AmyS
H92: C,D,E,F,G,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
H106: A,C,D,E,G,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K107: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D111: A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
T113: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,V,W
E114: A,C,D,F,G,H,I,L,M,N,P,R,T,V,W,Y
E120: A,C,D,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
V121: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,P,Q,R,S,T,W,Y
R126: A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,T,V,W,Y
Q128: A,C,D,E,G,H,I,K,L,N,P,R,S,T,V,W,Y
S131: A,C,D,E,F,G,H,I,K,M,N,P,R,T,W,Y
T133: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
Q137: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,P,R,S,T,V,W,Y
A138: C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
W139: A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,Y
K141: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D143: A,C,E,G,H,I,K,L,M,N,P,T,V,W,Y
R147: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
N149: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,V,W
T150: A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,Q,R,S,V,Y
Y151: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
S152: A,C,D,E,F,G,H,I,K,M,N,Q,R,T,V,W,Y
K155: A,C,D,E,G,H,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
H160: A,C,D,E,F,G,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D165: A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
E168: A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
L172: A,C,D,E,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
S173: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,T,V,W,Y
K177: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
E188: A,C,D,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
T191: A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W
E192: A,C,D,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
N193: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,R,S,T,W,Y
Y196: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,R,S,T,V,W
L199: A,E,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
M200: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,S,T,V,W

TABELA 25-1: Sítios Variantes gerados em AmyS
Y201: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
A202: C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y
T213: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W
K216: A,D,E,F,G,H,I,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
N217: A,C,E,F,G,H,I,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K220: A,C,D,E,F,G,H,I,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
W221: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,V,Y
N227: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
R232: A,C,D,E,G,H,K,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
A235: C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K237: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y
H238: A,C,D,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,Y
K240: A,D,E,F,G,H,I,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D246: A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,Y
S249: A,C,D,E,F,G,H,K,L,M,P,Q,R,T,V,W,Y
Y250: A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
R252: A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,Y
S253: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,T,V,W,Y
Q254: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,R,S,T,V,W,Y
T255: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,V,W,Y
K257: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
P258: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y
Y268: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
K272: A,C,D,E,F,G,H,I,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
H274: A,C,D,E,F,G,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,W,Y
N275: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K279: C,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
T283: A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,V,W,Y
S285: A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,Q,R,T,V,W,Y
N293: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K294: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
T297: C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
K300: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
S301: A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y
D306: A,C,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
T309: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,v,W,Y

TABELA 25-1: Sítios Variantes gerados em AmyS
T312: A,C,D,E,F,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
N313: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,V,W
K317: A,C,D,E,F,G,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D318: A,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Q319: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,R,S,T,V,W,Y
P320: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,Q,R,S,T,V,W,Y
L338: A,C,D,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Q339: A,C,D,E,F,G,H,K,L,M,P,R,S,T,V,W,Y
S340: A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,T,V,Y
D343: A,C,E,F,H,I,L,M,N,P,Q,R,T,W,Y
W345: A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V
C363: A,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Y366: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
Y369: A,C,E,F,G,H,I,K,M,P,Q,R,S,T,V,W
Y370: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W
Y375: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W
S379: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y
K381: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D385: A,C,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W
P386: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,Q,S,T,V,W,Y
R391: A,C,E,G,H,K,L,N,P,Q,S,T,V,W,Y
R392: A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
D393: A,C,E,F,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Y394: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,V,W
H400: A,C,D,E,F,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Y402: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W
L403: A,C,D,E,F,G,H,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D404: A,C,E,G,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,V,W,Y
S406: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,T,V,Y
D407: C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
G410: A,C,D,E,F,H,I,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y
R413: A,D,E,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,S,T,V,W,Y
E414: A,C,D,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
V416: A,C,D,F,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
K419: A,C,D,E,F,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
S422: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y

TABELA 25-1: Sítios Variantes gerados em AmyS
L427: A,C,D,E,F,G,H,I,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
G433: A,C,D,E,F,H,I,K,L,M,N,P,W,R,S,T,V,Y
K436: A,C,D,E,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
Y439: A,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
K442: A,C,F,G,H,I,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
A445: C,D,G,H,I,K,L,N,P,Q,R,S,T,V,W
K447: A,C,D,F,G,H,I,L,M,N,Q,R,S,T,V,W,Y
V448: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,W,Y
Y450: A,C,D,E,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W
L452: A,C,D,E,F,G,H,K,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y
N455: A,C,D,E,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
N463: A,D,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
D465: A,C,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
E469: A,C,D,F,G,H,K,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,W,Y
K471: A,C,D,F,G,H,I,L,M,N,P,Q,R,S,T,V,Y
N473: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,P,Q,R,S,T,V,W,Y
S476: A,C,D,E,F,G,H,I,K,L,M,N,P,Q,R,T,V,W,Y

Exemplo 26. Propriedades alteradas de variantes descritas no Exemplo 25

Este exemplo mostra que variantes (AmyS) de alfa-amilase de *G. stearothermophilus* (descritas no Exemplo 25) podem ter uma propriedade alterada em relação à α -amilase parental. Um rastreamento de alto rendimento de estabilidade térmica de variantes de AmyS foi realizado como descrito no Exemplo 3. Os índices de desempenho para atividade (medidos como ensaio de BODIPY) e atividade residual (após estresse térmico) são mostrados nas Tabelas 26-1, 26-2, 26-3.

TABELA 26-1: Posições na proteína AmyS com mutações (mostradas na coluna rotulada Variante) que têm índices de desempenho tanto para atividade quanto para atividade residual após estresse térmico melhores que a AmyS.

Variante	Atividade	Atividade Residual
006A	1,59	1,10
006D	1,64	1,14
006E	1,93	1,08
006I	1,47	1,23

Variante	Atividade	Atividade Residual
006L	1,61	1,15
006M	1,60	1,11
006N	1,61	1,21
006P	2,47	1,10
006Q	1,34	1,26
006S	1,86	1,12
006T	2,01	1,21
006V	1,54	1,29
006W	1,32	1,13
006Y	1,88	1,07
014F	1,25	1,06
014T	1,22	1,22
014Y	1,71	1,08
015A	1,48	1,05
015H	1,85	1,01
016E	1,21	1,09
025C	1,46	1,33
025D	1,03	1,06
025H	1,06	1,03
025Q	1,07	1,24
027N	1,00	1,06
036K	1,05	1,01
036M	1,05	1,05
039C	1,05	1,09
039D	1,47	1,15
039E	1,32	1,15
039G	1,05	1,23
039H	1,10	1,16
039K	1,10	1,12
039N	1,64	1,14
039Q	1,43	1,20
039R	1,10	1,01
039S	1,02	1,15
050G	1,18	1,00
050N	1,12	1,20
050Q	1,08	1,31

Variante	Atividade	Atividade Residual
050S	1,09	1,07
052M	1,00	1,01
052T	1,00	1,11
053A	1,00	1,03
053H	1,00	1,12
053K	1,10	1,03
053T	1,02	1,25
067G	1,13	1,01
067H	1,03	1,04
071R	1,10	1,10
075A	1,14	1,05
075M	1,04	1,04
085E	1,02	1,09
085M	1,04	1,01
085S	1,04	1,02
090H	1,03	1,05
090M	1,02	1,02
113L	1,08	1,08
133P	1,08	1,41
138P	1,15	1,07
138S	1,02	1,12
138T	1,05	1,16
139Y	1,63	1,14
141M	1,01	1,23
141N	1,02	1,11
143G	1,09	1,13
143V	1,01	1,00
150M	1,00	1,05
160N	1,02	1,11
165N	1,10	1,16
172A	1,06	1,14
172R	1,06	1,16
173K	1,03	1,17
188P	1,16	1,40
193K	1,17	1,28
193Y	1,10	1,89

Variante	Atividade	Atividade Residual
201H	1,44	1,06
201M	1,21	1,16
213Q	1,02	1,12
213R	1,05	1,05
213S	1,08	1,10
216E	1,30	1,03
216Q	1,34	1,04
221F	1,28	1,07
221I	1,23	1,33
221M	1,35	1,16
221N	1,57	1,11
221S	1,40	1,34
221V	1,31	1,13
221Y	1,36	1,14
227A	1,02	1,01
227D	1,06	1,01
227E	1,06	1,03
227G	1,09	1,05
227K	1,13	1,00
235R	1,14	1,03
246E	1,03	1,18
249K	1,02	1,15
249R	1,03	1,07
250C	1,12	1,03
250E	1,33	1,13
250F	1,28	1,29
250G	1,33	1,09
250I	1,27	1,35
250K	1,48	1,07
250L	1,32	1,02
250M	1,39	1,35
250N	1,40	1,05
250Q	1,54	1,01
250S	1,41	1,02
252A	1,08	1,12
252E	1,12	1,09

Variante	Atividade	Atividade Residual
252K	1,21	1,19
252Q	1,04	1,16
252S	1,01	1,04
253D	1,04	1,07
253K	1,01	1,10
253N	1,03	1,06
258D	1,10	1,33
258G	1,02	1,30
258H	1,13	1,38
258K	1,11	1,29
258N	1,01	1,07
258Q	1,13	1,31
258R	1,13	1,02
258S	1,08	1,12
258T	1,10	1,27
258Y	1,08	1,16
268F	1,07	1,28
268G	1,21	1,03
268S	1,22	1,06
274Y	1,07	1,05
283K	1,01	1,14
283S	1,06	1,02
283Y	1,04	1,01
285F	1,02	1,18
285Q	1,22	1,38
285W	1,08	1,13
293H	1,05	1,12
293K	1,41	1,42
293Q	1,06	1,14
293T	1,12	1,10
297R	1,14	1,03
301G	1,05	1,02
301K	1,05	1,08
309K	1,08	1,18
309R	1,08	1,12
312A	1,00	1,01

Variante	Atividade	Atividade Residual
312G	1,07	1,18
313R	1,13	1,19
313S	1,05	1,25
318H	1,10	1,12
318S	1,37	1,11
318T	1,32	1,40
318Y	1,33	1,10
319A	1,13	1,02
319G	1,03	1,14
319K	1,52	1,10
319R	1,44	1,18
319V	1,08	1,07
319W	1,08	1,05
319Y	1,41	1,04
320S	1,03	1,16
320T	1,28	1,11
320Y	1,03	1,05
338A	1,29	1,36
338G	1,34	1,38
338I	1,32	1,12
338M	1,27	1,20
338P	1,23	1,11
338S	1,51	1,13
338T	1,05	1,42
338V	1,55	1,14
339A	1,13	1,08
339G	1,21	1,17
339H	1,04	1,03
339K	1,13	1,26
339P	1,24	1,02
339S	1,02	1,02
339T	1,01	1,35
340A	1,43	1,23
340H	1,45	1,12
340I	1,07	1,07
340M	1,20	1,24

Variante	Atividade	Atividade Residual
340N	1,75	1,10
340Q	1,76	1,21
340T	1,14	1,21
343E	1,07	1,00
343P	1,03	1,30
343Q	1,01	1,14
343R	1,03	1,25
345D	1,15	1,10
345E	1,24	1,06
345H	1,10	1,15
345M	1,01	1,02
345N	1,10	1,07
345Q	1,10	1,26
345S	1,12	1,01
345T	1,15	1,15
345V	1,02	1,16
366H	1,12	1,07
366Q	1,49	1,03
366S	1,02	1,07
369M	1,02	1,06
370A	1,21	1,03
370G	1,18	1,21
370N	1,41	1,04
370S	1,50	1,06
370T	1,10	1,07
370V	1,13	1,05
375A	1,39	1,03
375L	1,07	1,03
375T	1,04	1,25
379A	1,02	1,01
385Q	1,01	1,02
392K	1,09	1,10
394K	1,07	1,09
394L	1,11	1,22
394Q	1,13	1,09
394S	1,15	1,11

Variante	Atividade	Atividade Residual
394W	1,16	1,11
402T	1,02	1,32
403R	1,01	1,36
403V	1,00	1,34
413A	1,06	1,02
419A	1,29	1,36
419I	1,32	1,12
419M	1,27	1,20
419P	1,23	1,11
419S	1,51	1,13
419T	1,05	1,42
419V	1,55	1,14
422N	1,03	1,12
433A	1,08	1,27
433K	1,05	1,27
433M	1,01	1,23
433Y	1,01	1,26
442G	1,02	1,23
442H	1,04	1,07
442N	1,03	1,39
442P	1,03	1,11
442Q	1,05	1,11
442R	1,01	1,33
442S	1,07	1,24
442T	1,06	1,34
442Y	1,08	1,24
445G	1,01	1,21
447A	1,06	1,09
447L	1,01	1,06
448D	1,02	1,15
448F	1,01	1,48
448G	1,05	1,26
448H	1,03	1,37
448K	1,07	1,20
448L	1,08	1,04
448Q	1,16	1,18

Variante	Atividade	Atividade Residual
448S	1,10	1,20
448Y	1,27	1,33
450R	1,02	1,22
450S	1,01	1,22
452A	1,06	1,08
452G	1,00	1,07
452K	1,08	1,11
452M	1,09	1,13
452N	1,28	1,06
452T	1,18	1,02
452V	1,14	1,14
452Y	1,07	1,17
455A	1,04	1,07
455G	1,00	1,23
455H	1,01	1,05
455K	1,08	1,10
455R	1,02	1,13
463A	1,06	1,25
463G	1,00	1,04
463L	1,01	1,16
463M	1,08	1,24
469A	1,01	1,16
469D	1,02	1,22
469F	1,00	1,11
469Q	1,04	1,03
469T	1,06	1,15
469V	1,08	1,15
469Y	1,09	1,35
471A	1,09	1,09
471D	1,06	1,01
471F	1,05	1,10
471G	1,12	1,13
471I	1,02	1,22
471N	1,12	1,04
471T	1,09	1,11
471V	1,11	1,28

Variante	Atividade	Atividade Residual
471Y	1,36	1,15
473K	1,02	1,02
473M	1,00	1,11
473R	1,05	1,08
473T	1,04	1,04
476A	1,02	1,51
476M	1,08	1,58
476Q	1,03	1,13
476R	1,08	1,01
476T	1,01	1,78

TABELA 26-2: Posições na proteína AmyS com mutações (mostradas na coluna rotulada Variante) que têm índices de desempenho para atividade residual após estresse térmico pelo menos 20% melhores que a AmyS selvagem e índices de desempenho para início de atividade ou expressão pelo menos a metade da AmyS selvagem.

5

Variante	Atividade	Atividade Residual
006I	1,47	1,23
006N	1,61	1,21
006Q	1,34	1,26
006T	2,01	1,21
006V	1,54	1,29
014T	1,22	1,22
016F	0,98	2,17
025A	0,82	1,22
025C	1,46	1,33
025G	0,97	1,27
025Q	1,07	1,24
027M	0,88	1,21
036Q	0,78	1,40
036S	0,69	1,25
039G	1,05	1,23
039V	0,82	1,30
050I	0,61	1,24
050L	0,67	1,22
050M	0,62	1,32

Variante	Atividade	Atividade Residual
050N	1,12	1,20
050Q	1,08	1,31
052S	0,92	1,21
053T	1,02	1,25
067N	0,95	1,32
067S	1,00	1,23
080D	0,86	1,22
080I	0,82	1,29
090E	0,92	1,20
133P	1,08	1,41
133V	0,92	1,25
137M	0,83	1,30
137S	0,98	1,45
141E	0,92	3,48
141I	0,87	1,40
141L	0,85	1,22
141M	1,01	1,23
141Q	0,97	1,28
141R	0,99	1,23
141S	0,98	1,21
141V	1,00	1,21
150E	0,87	4,54
151I	0,78	1,22
152G	0,91	1,25
155S	0,85	1,22
155Y	0,80	1,21
168W	0,66	1,23
173T	0,86	1,33
188P	1,16	1,40
193F	0,98	1,71
193K	1,17	1,28
193L	0,78	1,22
193Y	1,10	1,89
213L	0,75	1,26
213M	0,78	1,26
213V	0,76	1,35

Variante	Atividade	Atividade Residual
217Q	0,74	1,31
220P	0,89	1,33
220Q	0,87	1,21
220R	0,83	1,26
220S	0,81	1,30
220V	0,82	1,21
221I	1,23	1,33
221S	1,40	1,34
249E	0,92	1,27
250F	1,28	1,29
250I	1,27	1,35
250M	1,39	1,35
252L	0,96	1,32
253Y	0,94	1,34
254E	0,89	1,29
254F	0,74	1,23
254T	0,65	1,21
254V	0,92	1,31
255F	0,68	1,30
255K	0,83	1,27
255W	0,74	1,27
257L	0,74	1,26
257M	0,79	1,29
257S	0,71	1,29
257V	0,78	1,31
258D	1,10	1,33
258G	1,02	1,30
258H	1,13	1,38
258K	1,11	1,29
258Q	1,13	1,31
258T	1,10	1,27
258V	0,80	1,29
268F	1,07	1,28
274W	0,79	1,26
283M	0,93	1,26
283N	0,96	1,29

Variante	Atividade	Atividade Residual
283V	0,81	1,23
285E	0,89	1,33
285Q	1,22	1,38
293G	0,92	1,31
293K	1,41	1,42
294W	0,66	1,23
301F	0,68	1,44
301I	0,74	1,28
301P	0,61	1,21
301R	0,89	1,35
301T	0,85	1,23
301W	0,75	1,27
309D	0,89	1,27
309V	0,95	1,38
312H	0,99	1,30
312S	0,99	1,29
312V	0,87	1,40
312Y	0,92	1,31
313G	0,96	1,25
313H	0,94	1,25
313I	0,55	1,44
313L	0,85	1,21
313S	1,05	1,25
313V	0,74	1,28
318T	1,32	1,40
338A	1,29	1,36
338C	0,67	1,24
338G	1,34	1,38
338M	1,27	1,20
338T	1,05	1,42
339K	1,13	1,26
339T	1,01	1,35
339V	0,76	1,23
340A	1,43	1,23
340M	1,20	1,24
340Q	1,76	1,21

Variante	Atividade	Atividade Residual
340T	1,14	1,21
343C	0,74	1,32
343I	0,88	1,27
343P	1,03	1,30
343R	1,03	1,25
343Y	0,82	1,29
345I	0,90	1,28
345Q	1,10	1,26
369I	0,91	1,33
369T	0,68	1,28
370G	1,18	1,21
375T	1,04	1,25
385T	0,92	1,22
386K	0,87	1,22
394L	1,11	1,22
394V	0,75	3,00
400A	0,89	1,24
400N	0,92	1,26
400V	0,91	1,28
402H	0,91	1,21
402I	0,75	1,36
402T	1,02	1,32
402V	0,95	1,40
402W	0,89	1,24
403A	0,89	1,20
403E	0,93	1,26
403G	0,96	1,22
403Q	0,98	1,24
403R	1,01	1,36
403T	0,99	1,53
403V	1,00	1,34
404C	0,61	1,28
404E	0,78	1,38
404G	0,77	1,25
404I	0,84	1,20
404V	0,79	1,28

Variante	Atividade	Atividade Residual
419A	1,29	1,36
419C	0,67	1,24
419M	1,27	1,20
419T	1,05	1,42
422E	0,78	1,31
422G	0,99	1,20
433A	1,08	1,27
433H	0,99	1,27
433I	0,86	1,37
433K	1,05	1,27
433L	0,90	1,30
433M	1,01	1,23
433V	0,95	1,27
433Y	1,01	1,26
442A	0,98	1,38
442G	1,02	1,23
442N	1,03	1,39
442R	1,01	1,33
442S	1,07	1,24
442T	1,06	1,34
442V	0,99	1,20
442W	0,98	1,32
442Y	1,08	1,24
445G	1,01	1,21
445I	0,84	1,25
445N	0,91	1,20
445T	0,88	1,29
445V	0,93	1,27
445W	0,80	1,25
447I	0,91	1,22
447N	0,97	1,43
447Q	1,00	1,34
447W	0,89	1,31
447Y	0,96	1,21
448C	0,98	1,36
448F	1,01	1,48

Variante	Atividade	Atividade Residual
448G	1,05	1,26
448H	1,03	1,37
448I	0,97	1,44
448N	0,70	1,24
448Y	1,27	1,33
450C	0,84	1,22
450H	0,90	1,23
450M	0,89	1,29
450N	0,96	1,23
450R	1,02	1,22
450S	1,01	1,22
450T	0,96	1,32
450W	0,95	1,21
455G	1,00	1,23
455I	0,95	1,23
455P	0,93	1,36
455V	0,89	1,26
463A	1,06	1,25
463M	1,08	1,24
463S	0,96	1,27
463T	0,91	1,38
463V	0,86	1,32
463W	0,74	1,45
465G	0,92	1,35
465I	0,85	1,37
465K	0,88	1,53
465N	0,93	1,32
465T	0,92	1,42
465V	0,93	1,24
469D	1,02	1,22
469W	0,97	1,24
469Y	1,09	1,35
471I	1,02	1,22
471V	1,11	1,28
473G	0,99	1,35
473Y	0,86	1,23

Variante	Atividade	Atividade Residual
476A	1,02	1,51
476G	0,97	1,22
476L	0,93	1,46
476M	1,08	1,58
476N	0,98	1,61
476T	1,01	1,78

TABELA 26-3: Posições na proteína AmyS com mutações (mostradas na coluna rotulada Variante) que têm índices de desempenho para atividade ou expressão pelo menos 20% melhor que a AmyS selvagem.

Variante	Atividade
006A	1,59
006D	1,64
006E	1,93
006H	2,29
006I	1,47
006K	2,36
006L	1,61
006M	1,60
006N	1,61
006P	2,47
006Q	1,34
006R	1,28
006S	1,86
006T	2,01
006V	1,54
006W	1,32
006Y	1,88
013K	1,22
014F	1,25
014T	1,22
014Y	1,71
015A	1,48
015D	1,82
015E	1,96
015G	1,89

Variante	Atividade
015H	1,85
015K	1,58
015N	1,88
015P	1,59
015Q	1,74
015R	1,60
015S	1,78
015T	1,47
015W	1,44
016A	1,31
016E	1,21
016G	1,35
016H	1,21
016K	1,41
016N	1,32
016P	1,30
016Q	1,33
016R	1,28
016T	1,32
025C	1,46
039D	1,47
039E	1,32
039N	1,64
039Q	1,43
081Y	1,20
121P	1,22
139D	1,40
139H	1,59
139R	1,29
139Y	1,63
177A	1,20
188D	1,21
191H	1,27
191K	1,33
192A	1,26
192D	1,50

Variante	Atividade
192G	1,38
192N	1,35
192P	1,33
192Q	1,55
192S	1,47
192T	1,35
192V	1,25
192Y	1,30
196A	1,57
196C	1,36
196D	1,29
196E	1,29
196F	1,38
196H	1,92
196I	1,61
196K	1,29
196P	1,50
196R	1,29
196S	1,59
196T	1,65
196V	1,55
201A	1,41
201E	1,36
201G	1,63
201H	1,44
201M	1,21
202H	1,30
216E	1,30
216G	1,20
216H	1,28
216M	1,39
216Q	1,34
216R	1,32
216S	1,28
216T	1,22
216Y	1,31

Variante	Atividade
221A	1,54
221D	1,31
221F	1,28
221I	1,23
221L	1,50
221M	1,35
221N	1,57
221R	1,29
221S	1,40
221V	1,31
221Y	1,36
237G	1,21
240G	1,22
240N	1,37
240P	1,69
240Q	1,21
240R	1,41
240T	1,23
246R	1,31
250A	1,21
250D	1,29
250E	1,33
250F	1,28
250G	1,33
250I	1,27
250K	1,48
250L	1,32
250M	1,39
250N	1,40
250Q	1,54
250R	1,55
250S	1,41
250W	1,35
252K	1,21
268A	1,39
268D	1,44

Variante	Atividade
268E	1,47
268G	1,21
268H	1,24
268K	1,90
268N	1,51
268P	1,41
268Q	1,30
268R	1,49
268S	1,22
274A	1,40
274D	1,20
274G	1,36
274I	1,39
274K	1,60
274L	1,40
274N	1,50
274Q	1,47
274R	1,50
274S	1,28
274T	1,38
275K	1,22
285Q	1,22
285Y	1,49
293K	1,41
293R	1,37
318A	1,38
318F	1,22
318G	1,39
318I	1,40
318K	1,73
318L	1,31
318M	1,26
318R	1,54
318S	1,37
318T	1,32
318V	1,34

Variante	Atividade
318Y	1,33
319C	1,38
319D	1,31
319H	1,28
319I	1,32
319K	1,52
319R	1,44
319Y	1,41
320K	1,23
320R	1,25
320T	1,28
338A	1,29
338G	1,34
338I	1,32
338M	1,27
338P	1,23
338S	1,51
338V	1,55
339G	1,21
339P	1,24
340A	1,43
340D	1,63
340E	1,58
340H	1,45
340K	1,76
340N	1,75
340Q	1,76
345E	1,24
363D	1,74
363E	1,34
363M	1,36
363N	1,86
363Q	1,78
363S	1,35
366Q	1,49
370A	1,21

Variante	Atividade
370D	1,35
370E	1,35
370H	1,36
370K	1,65
370N	1,41
370Q	1,51
370S	1,50
375A	1,39
375D	1,52
375E	1,48
375K	1,43
375N	1,48
375Q	1,56
375R	1,61
375S	1,29
419A	1,29
419I	1,32
419M	1,27
419P	1,23
419S	1,51
419V	1,55
448Y	1,27
452N	1,28
452Q	1,22
452R	1,26
452S	1,21
471R	1,33
471Y	1,36

TABELA 26-4 mostra os valores de Índice de desempenho (Pi) de 2.666 variantes de AmyS em 152 posições. Os Índices de desempenho menores ou iguais a 0,05 no ensaio de atividade foram corrigidos para 0,05 e indicados em **itálico** na TABELA 26-4. Além disso, para a medida de estabilidade, se o Índice de desempenho de atividade nos ensaios de estabilidade for menor ou igual a 0,05 o índice de desempenho de estabilidade associado foi corrigido para 0,05.

TABELA 26-4: Índices de Desempenho para medidas de atividade de AmyS Variantes			
Posição	Variante	PI Estabilidade	PI Atividade
5	N005A	0,95	0,32
5	N005C	0,98	0,29
5	N005E	1,04	0,43
5	N005F	0,79	0,15
5	N005G	0,88	0,34
5	N005H	0,89	0,43
5	N005I	1,00	0,10
5	N005K	0,90	0,34
5	N005L	1,04	0,10
5	N005M	0,84	0,18
5	N005P	1,10	0,40
5	N005Q	1,07	0,58
5	N005R	0,94	0,40
5	N005S	0,98	0,35
5	N005T	0,83	0,35
5	N005V	0,88	0,16
5	N005W	0,94	0,07
5	N005Y	1,07	0,21
6	G006A	1,10	1,59
6	G006D	1,14	1,64
6	G006E	1,08	1,93
6	G006H	0,95	2,29
6	G006I	1,23	1,47
6	G006K	0,93	2,36
6	G006L	1,15	1,61
6	G006M	1,11	1,60
6	G006N	1,21	1,61
6	G006P	1,10	2,47
6	G006Q	1,26	1,34
6	G006R	0,98	1,28
6	G006S	1,12	1,86
6	G006T	1,21	2,01
6	G006V	1,29	1,54
6	G006W	1,13	1,32

6	G006Y	1,07	1,88
13	E013A	0,32	1,01
13	E013C	0,22	0,68
13	E013D	0,08	1,03
13	E013F	0,05	0,81
13	E013G	0,18	1,00
13	E013H	0,60	1,10
13	E013I	0,15	0,87
13	E013K	0,22	1,22
13	E013L	0,20	1,02
13	E013M	0,20	0,96
13	E013N	0,05	0,05
13	E013P	0,05	0,37
13	E013Q	0,21	0,96
13	E013R	0,28	1,04
13	E013S	0,28	0,92
13	E013T	0,19	0,79
13	E013V	0,19	0,76
13	E013W	0,05	0,76
13	E013Y	0,89	0,93
14	W014A	0,95	0,77
14	W014C	0,91	0,71
14	W014D	0,81	0,59
14	W014E	0,95	1,07
14	W014F	1,06	1,25
14	W014G	0,97	0,88
14	W014H	0,05	0,05
14	W014I	1,12	0,40
14	W014K	1,01	0,69
14	W014L	0,88	0,15
14	W014M	1,18	0,84
14	W014N	0,92	0,99
14	W014P	0,84	0,98
14	W014Q	0,94	0,67
14	W014R	0,97	0,67
14	W014S	0,97	1,02
14	W014T	1,22	1,22

14	W014V	1,17	0,81
14	W014Y	1,08	1,71
15	Y015A	1,05	1,48
15	Y015C	0,70	1,15
15	Y015D	0,77	1,82
15	Y015E	0,68	1,96
15	Y015G	0,69	1,89
15	Y015H	1,01	1,85
15	Y015I	0,63	0,91
15	Y015K	0,74	1,58
15	Y015L	0,67	0,76
15	Y015M	0,72	1,12
15	Y015N	0,99	1,88
15	Y015P	0,57	1,59
15	Y015Q	0,80	1,74
15	Y015R	0,72	1,60
15	Y015S	0,58	1,78
15	Y015T	0,87	1,47
15	Y015W	0,95	1,44
16	L016A	0,81	1,31
16	L016D	0,93	1,12
16	L016E	1,09	1,21
16	L016F	2,17	0,98
16	L016G	0,61	1,35
16	L016H	0,96	1,21
16	L016I	0,79	1,12
16	L016K	0,79	1,41
16	L016M	0,94	1,15
16	L016N	0,92	1,32
16	L016P	0,35	1,30
16	L016Q	0,96	1,33
16	L016R	0,71	1,28
16	L016S	0,94	1,19
16	L016T	0,87	1,32
16	L016V	0,87	1,16
16	L016W	0,75	0,99
16	L016Y	0,97	1,10

18	D018A	1,08	0,89
18	D018F	0,68	0,58
18	D018G	0,88	0,87
18	D018H	0,84	0,84
18	D018I	0,79	0,70
18	D018K	0,88	0,65
18	D018L	0,60	0,72
18	D018N	0,73	1,01
18	D018P	0,84	1,04
18	D018Q	0,80	1,00
18	D018R	0,81	0,65
18	D018S	0,81	0,93
18	D018T	0,81	0,91
18	D018V	0,89	0,77
18	D018W	0,72	0,51
18	D018Y	0,72	0,87
20	G020A	0,79	0,25
20	G020C	0,58	0,24
20	G020D	0,92	0,96
20	G020E	0,89	0,95
20	G020F	0,65	0,13
20	G020H	0,75	0,11
20	G020I	0,96	0,28
20	G020K	0,05	0,05
20	G020L	0,05	0,05
20	G020M	0,69	0,10
20	G020N	0,78	0,09
20	G020P	0,05	0,05
20	G020Q	0,61	0,07
20	G020R	0,05	0,05
20	G020S	0,05	0,05
20	G020T	0,82	0,09
20	G020V	0,77	0,19
20	G020W	0,80	0,69
20	G020Y	0,05	0,05
25	K025A	1,22	0,82
25	K025C	1,33	1,46

25	K025D	1,06	1,03
25	K025E	1,07	0,95
25	K025F	1,00	0,58
25	K025G	1,27	0,97
25	K025H	1,03	1,06
25	K025L	1,12	0,64
25	K025M	1,03	0,61
25	K025N	0,91	1,06
25	K025P	0,98	0,55
25	K025Q	1,24	1,07
25	K025R	1,08	0,96
25	K025S	1,07	0,98
25	K025T	1,14	0,89
25	K025Y	0,98	0,65
27	A027C	0,79	0,55
27	A027D	1,01	0,95
27	A027E	0,93	0,95
27	A027F	0,88	0,85
27	A027G	1,20	0,98
27	A027H	1,05	1,00
27	A027I	1,05	0,87
27	A027K	0,86	1,01
27	A027L	1,06	0,86
27	A027M	1,21	0,88
27	A027N	1,06	1,00
27	A027P	1,13	0,43
27	A027Q	1,00	0,96
27	A027R	1,11	0,89
27	A027S	1,16	0,97
27	A027T	1,20	0,90
27	A027V	1,20	0,82
27	A027W	1,13	0,76
27	A027Y	0,97	0,28
29	E029A	1,05	0,50
29	E029D	0,94	1,11
29	E029G	0,75	0,37
29	E029H	0,83	0,83

29	E029K	1,05	0,89
29	E029L	0,76	0,22
29	E029M	0,76	0,15
29	E029N	1,02	0,89
29	E029P	0,87	0,33
29	E029Q	1,04	0,86
29	E029R	1,09	0,92
29	E029S	0,97	0,83
29	E029T	0,95	0,59
29	E029W	0,74	0,10
29	E029Y	0,05	0,05
36	L036A	0,95	0,85
36	L036C	0,83	0,43
36	L036D	0,91	0,27
36	L036E	0,90	0,40
36	L036F	1,14	0,90
36	L036G	0,92	0,34
36	L036H	0,92	0,77
36	L036I	1,17	0,89
36	L036K	1,01	1,05
36	L036M	1,05	1,05
36	L036N	1,02	0,68
36	L036P	0,90	0,06
36	L036Q	1,40	0,78
36	L036R	1,12	0,76
36	L036S	1,25	0,69
36	L036T	1,11	0,64
36	L036V	0,88	0,97
36	L036W	0,92	0,63
36	L036Y	1,07	0,91
39	T039C	1,09	1,05
39	T039D	1,15	1,47
39	T039E	1,15	1,32
39	T039F	1,16	0,48
39	T039G	1,23	1,05
39	T039H	1,16	1,10
39	T039K	1,12	1,10

39	T039M	1,18	0,54
39	T039N	1,14	1,64
39	T039P	1,11	0,26
39	T039Q	1,20	1,43
39	T039R	1,01	1,10
39	T039S	1,15	1,02
39	T039V	1,30	0,82
39	T039W	1,11	0,25
50	T050A	1,09	0,98
50	T050C	1,03	0,34
50	T050D	0,87	0,91
50	T050E	0,05	0,05
50	T050F	0,86	0,43
50	T050G	1,00	1,18
50	T050H	0,97	0,82
50	T050I	1,24	0,61
50	T050K	1,13	0,80
50	T050L	1,22	0,67
50	T050M	1,32	0,62
50	T050N	1,20	1,12
50	T050P	1,03	0,99
50	T050Q	1,31	1,08
50	T050R	1,13	0,79
50	T050S	1,07	1,09
50	T050V	1,02	0,79
50	T050W	0,90	0,18
50	T050Y	1,14	0,42
52	R052A	0,99	1,02
52	R052C	0,87	0,62
52	R052D	0,76	0,85
52	R052E	0,77	0,97
52	R052G	0,96	0,93
52	R052H	0,91	0,99
52	R052K	0,93	1,02
52	R052L	1,10	0,98
52	R052M	1,01	1,00
52	R052N	0,95	0,99

52	R052P	1,05	0,95
52	R052Q	0,05	0,05
52	R052S	1,21	0,92
52	R052T	1,11	1,00
52	R052V	1,14	0,95
52	R052W	1,00	0,83
52	R052Y	0,99	0,96
53	S053A	1,03	1,00
53	S053C	0,73	0,58
53	S053D	0,75	0,83
53	S053E	1,05	0,88
53	S053F	0,87	0,85
53	S053G	1,14	0,93
53	S053H	1,12	1,00
53	S053I	0,99	1,12
53	S053K	1,03	1,10
53	S053L	0,93	0,96
53	S053M	0,96	0,97
53	S053P	0,88	1,00
53	S053Q	0,94	0,94
53	S053R	0,83	1,15
53	S053T	1,25	1,02
53	S053V	1,11	0,94
53	S053W	1,09	0,84
53	S053Y	0,94	0,93
54	D054A	0,34	0,88
54	D054C	0,64	0,38
54	D054E	0,05	0,05
54	D054F	0,05	0,60
54	D054G	0,11	0,97
54	D054H	0,11	1,04
54	D054I	0,30	0,83
54	D054K	0,05	1,08
54	D054L	0,05	0,89
54	D054M	0,11	0,88
54	D054N	0,94	1,05
54	D054P	0,05	1,03

54	D054Q	0,05	0,05
54	D054R	0,06	0,89
54	D054S	0,38	0,96
54	D054T	0,17	0,95
54	D054V	0,17	0,77
54	D054W	0,05	0,05
54	D054Y	0,05	0,64
67	E067A	0,05	0,05
67	E067C	1,08	0,75
67	E067D	0,90	1,07
67	E067G	1,01	1,13
67	E067H	1,04	1,03
67	E067K	0,98	0,94
67	E067L	0,97	0,95
67	E067M	0,93	0,91
67	E067N	1,32	0,95
67	E067P	0,05	0,05
67	E067Q	0,93	0,95
67	E067R	1,01	0,90
67	E067S	1,23	1,00
67	E067T	0,99	0,98
67	E067W	0,05	0,05
67	E067Y	1,11	0,93
71	K071A	0,72	0,81
71	K071C	0,80	0,61
71	K071D	0,69	0,71
71	K071E	0,80	0,84
71	K071F	0,47	0,61
71	K071G	0,74	0,91
71	K071H	0,96	0,88
71	K071I	0,83	0,75
71	K071L	0,55	0,61
71	K071M	0,80	0,68
71	K071N	1,11	0,89
71	K071P	0,92	0,86
71	K071Q	0,98	0,77
71	K071R	1,10	1,10

71	K071S	0,99	0,97
71	K071T	0,95	0,83
71	K071V	0,94	0,84
71	K071W	0,82	0,91
71	K071Y	0,52	0,71
73	T073A	0,97	1,11
73	T073C	0,91	0,60
73	T073D	0,89	1,02
73	T073E	0,75	1,08
73	T073F	0,73	0,99
73	T073G	0,79	1,12
73	T073H	0,86	0,88
73	T073I	0,66	1,02
73	T073K	0,20	0,97
73	T073L	0,47	1,17
73	T073M	0,59	0,64
73	T073N	0,73	1,08
73	T073P	0,57	0,98
73	T073R	0,40	1,11
73	T073S	0,87	1,10
73	T073V	0,67	1,09
73	T073W	0,83	1,07
73	T073Y	0,79	1,10
75	R075A	1,05	1,14
75	R075C	0,88	0,85
75	R075D	0,87	0,99
75	R075E	0,86	1,01
75	R075F	0,76	0,92
75	R075G	0,79	1,04
75	R075H	0,85	1,07
75	R075I	0,86	1,01
75	R075L	0,88	1,04
75	R075M	1,04	1,04
75	R075P	0,90	0,93
75	R075Q	0,90	0,95
75	R075S	0,66	0,60
75	R075T	0,98	0,88

75	R075V	0,78	0,94
75	R075W	0,75	0,93
75	R075Y	0,68	1,04
77	K077A	0,38	0,98
77	K077C	0,28	0,51
77	K077D	0,05	0,59
77	K077E	0,11	0,77
77	K077F	0,20	0,72
77	K077G	0,13	0,76
77	K077I	0,16	1,00
77	K077L	0,54	0,98
77	K077M	0,58	0,99
77	K077N	0,05	0,05
77	K077P	0,05	0,61
77	K077Q	0,07	0,86
77	K077R	0,77	1,07
77	K077S	0,11	0,89
77	K077T	0,05	0,86
77	K077V	0,05	0,83
77	K077W	0,05	0,77
80	T080A	0,88	1,01
80	T080C	0,91	0,69
80	T080D	1,22	0,86
80	T080E	0,71	0,92
80	T080F	1,10	0,50
80	T080G	1,02	0,93
80	T080H	1,01	0,95
80	T080I	1,29	0,82
80	T080K	0,90	0,86
80	T080L	0,82	0,98
80	T080M	0,97	0,95
80	T080N	0,90	1,00
80	T080P	0,88	0,88
80	T080Q	0,87	0,88
80	T080R	0,99	0,76
80	T080S	0,83	1,09
80	T080V	0,87	0,87

80	T080W	0,77	0,89
80	T080Y	0,72	0,97
81	K081A	0,87	0,94
81	K081C	0,84	0,74
81	K081D	0,96	0,83
81	K081E	0,69	0,92
81	K081G	0,86	0,81
81	K081H	0,73	1,03
81	K081I	0,82	0,79
81	K081L	0,87	1,01
81	K081M	0,93	1,04
81	K081N	0,05	0,05
81	K081P	0,90	0,79
81	K081Q	0,84	1,03
81	K081R	0,90	1,04
81	K081S	0,74	0,98
81	K081T	0,80	0,93
81	K081V	0,66	1,03
81	K081W	0,60	0,98
81	K081Y	0,89	1,20
83	Q083A	1,20	0,98
83	Q083C	1,79	0,17
83	Q083D	0,94	0,92
83	Q083E	0,98	0,95
83	Q083F	0,87	0,80
83	Q083G	0,76	1,01
83	Q083H	0,78	0,86
83	Q083I	0,69	0,85
83	Q083L	0,77	0,91
83	Q083M	0,91	0,96
83	Q083P	1,01	0,82
83	Q083R	0,91	0,90
83	Q083S	0,75	0,99
83	Q083T	0,84	0,84
83	Q083V	0,73	0,80
83	Q083W	0,82	0,78
83	Q083Y	0,71	0,93

85	L085A	0,94	1,06
85	L085C	0,90	0,63
85	L085D	0,84	1,04
85	L085E	1,09	1,02
85	L085G	0,85	0,90
85	L085H	0,73	1,02
85	L085I	0,89	0,88
85	L085K	0,96	0,93
85	L085M	1,01	1,04
85	L085N	1,10	0,89
85	L085P	1,01	0,72
85	L085Q	0,91	0,99
85	L085R	0,96	1,01
85	L085S	1,02	1,04
85	L085T	0,83	1,12
85	L085W	0,93	0,95
85	L085Y	0,70	1,08
90	A090C	1,00	0,65
90	A090D	1,12	0,92
90	A090E	1,20	0,92
90	A090F	0,99	0,76
90	A090G	1,04	0,87
90	A090H	1,05	1,03
90	A090I	0,90	0,83
90	A090K	0,93	1,04
90	A090L	0,76	0,92
90	A090M	1,02	1,02
90	A090N	1,02	0,98
90	A090P	1,39	0,10
90	A090Q	0,94	0,93
90	A090R	0,90	0,90
90	A090S	1,16	0,99
90	A090T	0,78	0,88
90	A090V	0,79	0,87
90	A090W	0,69	0,84
90	A090Y	0,83	0,96
92	H092C	0,75	0,29

92	H092D	1,06	0,69
92	H092E	0,88	0,76
92	H092F	0,92	0,28
92	H092G	0,86	0,81
92	H092K	0,89	0,98
92	H092L	0,43	0,12
92	H092N	0,85	0,78
92	H092P	0,05	0,05
92	H092Q	0,80	0,89
92	H092R	0,75	0,96
92	H092S	0,70	0,87
92	H092T	0,68	0,47
92	H092V	0,70	0,28
92	H092W	0,83	0,44
92	H092Y	0,71	0,63
106	H106A	0,32	0,19
106	H106C	0,33	0,06
106	H106D	0,58	0,07
106	H106E	0,05	0,05
106	H106G	0,16	0,17
106	H106I	0,05	0,05
106	H106K	0,05	0,05
106	H106L	0,05	0,06
106	H106N	0,14	0,08
106	H106P	0,59	0,06
106	H106Q	0,07	0,39
106	H106R	0,05	0,05
106	H106S	0,05	0,20
106	H106T	0,05	0,05
106	H106V	0,05	0,05
106	H106W	0,05	0,05
106	H106Y	0,05	0,05
107	K107A	0,46	0,81
107	K107C	0,42	0,67
107	K107D	0,32	0,51
107	K107E	0,35	0,70
107	K107F	0,42	0,66

107	K107G	0,23	0,76
107	K107H	0,34	0,94
107	K107I	0,29	0,69
107	K107L	0,53	0,75
107	K107M	0,60	0,79
107	K107N	0,43	0,88
107	K107P	0,05	0,65
107	K107Q	0,63	0,74
107	K107R	1,05	0,71
107	K107S	0,30	0,78
107	K107T	0,38	0,72
107	K107V	0,41	0,70
107	K107W	0,05	0,44
107	K107Y	0,40	0,64
111	D111A	0,55	0,95
111	D111C	0,71	0,60
111	D111E	0,87	1,01
111	D111F	0,63	0,65
111	D111G	0,74	0,90
111	D111H	0,50	0,85
111	D111I	0,56	0,91
111	D111K	0,45	0,62
111	D111L	0,44	0,86
111	D111M	0,65	1,00
111	D111N	0,97	0,87
111	D111P	0,78	0,71
111	D111Q	0,77	0,95
111	D111R	0,53	0,07
111	D111S	0,67	0,91
111	D111T	0,61	1,02
111	D111V	0,58	1,02
111	D111W	0,42	0,54
111	D111Y	0,49	0,92
113	T113A	0,89	0,97
113	T113C	0,80	0,82
113	T113D	0,94	0,95
113	T113E	0,92	0,91

113	T113F	0,76	0,92
113	T113G	0,88	1,08
113	T113H	0,88	0,96
113	T113I	1,14	0,88
113	T113K	0,93	1,13
113	T113L	1,08	1,08
113	T113M	0,83	0,99
113	T113P	1,05	0,96
113	T113Q	0,88	1,05
113	T113R	0,88	1,03
113	T113V	1,12	0,94
113	T113W	1,06	0,88
114	E114A	0,54	0,97
114	E114C	0,62	0,76
114	E114D	0,71	0,82
114	E114F	0,36	0,92
114	E114G	0,59	1,01
114	E114H	0,49	0,92
114	E114I	0,54	0,86
114	E114L	0,43	0,97
114	E114M	0,77	0,97
114	E114N	0,67	0,88
114	E114P	0,37	0,37
114	E114R	0,35	0,84
114	E114T	0,54	0,94
114	E114V	0,43	0,85
114	E114W	0,31	0,94
114	E114Y	0,26	0,93
120	E120A	0,29	1,20
120	E120C	0,24	0,89
120	E120D	0,05	1,02
120	E120F	0,05	0,88
120	E120G	0,05	1,14
120	E120H	0,09	0,90
120	E120I	0,60	0,87
120	E120L	0,20	0,97
120	E120M	0,39	0,96

120	E120N	0,16	1,02
120	E120P	0,05	1,12
120	E120Q	0,66	1,10
120	E120R	0,12	1,12
120	E120S	0,08	1,07
120	E120T	0,22	1,06
120	E120V	0,53	0,93
120	E120W	0,15	0,81
120	E120Y	0,07	0,98
121	V121A	0,05	1,04
121	V121C	0,92	0,55
121	V121D	0,05	0,91
121	V121E	0,05	0,93
121	V121F	0,05	0,77
121	V121G	0,05	0,92
121	V121H	0,05	0,05
121	V121I	0,05	0,79
121	V121L	0,05	0,98
121	V121M	0,05	0,97
121	V121P	0,05	1,22
121	V121Q	0,05	0,97
121	V121R	0,05	1,01
121	V121S	0,05	0,95
121	V121T	0,07	0,92
121	V121W	0,05	0,62
121	V121Y	0,05	0,88
126	R126A	0,05	0,05
126	R126D	0,05	0,46
126	R126E	0,05	0,82
126	R126F	0,05	1,03
126	R126G	0,05	0,89
126	R126H	0,05	1,06
126	R126I	0,05	0,95
126	R126L	0,05	0,97
126	R126M	0,05	1,01
126	R126N	0,05	1,07
126	R126P	0,05	0,67

126	R126Q	0,05	0,65
126	R126T	0,05	0,83
126	R126V	0,05	0,99
126	R126W	0,05	1,06
126	R126Y	0,05	1,01
128	Q128A	0,05	0,05
128	Q128C	0,42	0,95
128	Q128D	0,15	1,05
128	Q128E	0,90	1,00
128	Q128G	0,05	0,99
128	Q128H	0,34	1,05
128	Q128I	0,90	0,89
128	Q128K	0,52	1,15
128	Q128L	0,47	0,97
128	Q128N	0,12	1,05
128	Q128P	0,05	1,03
128	Q128R	0,31	1,14
128	Q128S	0,28	1,02
128	Q128T	0,05	0,05
128	Q128V	0,86	0,97
128	Q128W	0,07	0,76
128	Q128Y	0,13	0,86
131	S131A	0,05	1,15
131	S131C	0,05	0,98
131	S131D	0,26	1,08
131	S131E	0,05	1,14
131	S131F	0,05	0,92
131	S131G	0,24	0,86
131	S131H	0,05	1,13
131	S131I	0,05	0,05
131	S131K	0,05	1,13
131	S131M	0,05	0,99
131	S131N	0,76	1,02
131	S131P	0,05	1,05
131	S131R	0,05	1,05
131	S131T	0,49	0,90
131	S131W	0,05	0,82

131	S131Y	0,05	0,90
133	T133A	0,95	1,13
133	T133C	0,49	0,97
133	T133D	1,03	0,99
133	T133E	0,82	1,02
133	T133F	0,17	0,97
133	T133G	0,47	0,84
133	T133H	0,41	1,19
133	T133I	0,86	0,96
133	T133K	0,47	0,85
133	T133L	0,41	1,06
133	T133M	0,51	1,05
133	T133N	0,68	1,13
133	T133P	1,41	1,08
133	T133Q	0,63	1,10
133	T133R	0,18	1,13
133	T133S	0,72	1,08
133	T133V	1,25	0,92
133	T133W	0,14	0,98
133	T133Y	0,41	1,01
137	Q137A	0,92	0,97
137	Q137C	1,09	0,77
137	Q137D	0,89	0,96
137	Q137E	1,06	0,87
137	Q137F	0,85	0,86
137	Q137G	1,13	0,94
137	Q137H	0,95	1,05
137	Q137I	0,93	0,22
137	Q137L	1,20	0,82
137	Q137M	1,30	0,83
137	Q137P	0,07	1,05
137	Q137R	0,95	1,05
137	Q137S	1,45	0,98
137	Q137T	1,12	0,91
137	Q137V	1,02	0,86
137	Q137W	1,06	0,88
137	Q137Y	0,94	0,89

138	A138C	0,05	0,05
138	A138D	0,05	0,37
138	A138E	0,05	0,54
138	A138G	0,90	1,02
138	A138H	0,05	0,60
138	A138I	0,23	0,90
138	A138K	0,05	0,15
138	A138L	0,05	0,90
138	A138M	0,05	0,94
138	A138N	0,50	0,94
138	A138P	1,07	1,15
138	A138Q	0,13	0,69
138	A138R	0,05	0,15
138	A138S	1,12	1,02
138	A138T	1,16	1,05
138	A138V	1,17	0,87
138	A138W	0,05	0,27
138	A138Y	0,14	0,97
139	W139A	0,82	0,89
139	W139C	0,75	0,39
139	W139D	0,93	1,40
139	W139E	0,81	0,97
139	W139G	0,79	0,74
139	W139H	0,97	1,59
139	W139I	0,74	0,58
139	W139K	0,68	0,42
139	W139L	0,78	0,59
139	W139M	0,87	1,00
139	W139N	1,13	0,85
139	W139Q	0,82	0,79
139	W139R	0,96	1,29
139	W139S	0,93	1,04
139	W139T	0,71	0,87
139	W139V	0,72	0,66
139	W139Y	1,14	1,63
141	K141A	1,09	0,73
141	K141C	1,03	0,85

141	K141D	0,89	0,98
141	K141E	3,48	0,92
141	K141F	0,89	0,80
141	K141G	1,18	0,96
141	K141H	1,13	0,99
141	K141I	1,40	0,87
141	K141L	1,22	0,85
141	K141M	1,23	1,01
141	K141N	1,11	1,02
141	K141P	1,07	0,96
141	K141Q	1,28	0,97
141	K141R	1,23	0,99
141	K141S	1,21	0,98
141	K141T	1,17	0,94
141	K141V	1,21	1,00
141	K141W	1,16	0,87
141	K141Y	1,17	0,88
143	D143A	0,95	1,04
143	D143C	1,11	0,84
143	D143E	1,12	0,98
143	D143G	1,13	1,09
143	D143H	0,91	0,98
143	D143I	1,05	0,94
143	D143K	0,86	0,96
143	D143L	0,05	0,05
143	D143M	0,86	1,05
143	D143N	1,10	0,99
143	D143P	0,98	0,84
143	D143T	0,05	0,05
143	D143V	1,00	1,01
143	D143W	1,00	0,99
143	D143Y	0,75	0,15
147	R147A	0,73	0,25
147	R147C	0,05	0,05
147	R147D	0,66	0,07
147	R147E	0,05	0,05
147	R147F	0,05	0,05

147	R147G	0,74	0,11
147	R147H	0,81	0,21
147	R147I	0,05	0,05
147	R147K	1,05	0,48
147	R147L	0,05	0,05
147	R147M	0,65	0,07
147	R147N	0,91	0,30
147	R147P	0,05	0,05
147	R147Q	0,88	0,30
147	R147S	0,90	0,39
147	R147T	0,90	0,10
147	R147V	0,05	0,05
147	R147W	0,05	0,05
147	R147Y	0,05	0,05
149	N149A	0,94	0,93
149	N149D	0,89	0,95
149	N149E	0,98	0,93
149	N149F	1,09	0,85
149	N149G	0,90	0,93
149	N149H	1,01	0,98
149	N149I	1,15	0,83
149	N149K	0,90	0,88
149	N149L	0,88	0,94
149	N149M	0,05	0,05
149	N149Q	1,00	0,93
149	N149R	0,80	0,95
149	N149S	0,94	1,03
149	N149V	1,06	0,87
149	N149W	1,01	0,87
150	T150A	0,90	0,96
150	T150C	1,03	0,72
150	T150D	0,82	0,87
150	T150E	4,54	0,87
150	T150F	0,05	0,05
150	T150G	0,99	0,86
150	T150I	0,82	0,93
150	T150K	0,86	0,96

150	T150L	0,83	0,07
150	T150M	1,05	1,00
150	T150N	0,98	1,08
150	T150Q	0,83	0,99
150	T150R	0,99	1,04
150	T150S	0,77	0,96
150	T150V	0,90	0,93
150	T150Y	1,18	1,00
151	Y151A	0,96	0,87
151	Y151C	0,80	0,67
151	Y151D	0,99	0,71
151	Y151E	0,76	0,71
151	Y151F	0,96	0,88
151	Y151G	1,17	0,79
151	Y151H	1,04	0,87
151	Y151I	1,22	0,78
151	Y151L	1,05	0,90
151	Y151M	1,02	0,83
151	Y151N	0,98	0,91
151	Y151P	0,89	0,77
151	Y151Q	1,07	0,75
151	Y151R	1,05	0,76
151	Y151S	0,85	0,80
151	Y151T	1,04	0,80
151	Y151V	1,14	0,80
151	Y151W	1,16	0,79
152	S152A	0,95	0,88
152	S152C	0,83	0,75
152	S152D	0,05	0,05
152	S152E	1,09	0,71
152	S152F	0,75	0,22
152	S152G	1,25	0,91
152	S152H	0,99	0,71
152	S152I	0,81	0,22
152	S152K	0,74	0,58
152	S152M	0,05	0,05
152	S152N	1,20	0,43

152	S152Q	0,71	0,21
152	S152R	0,89	0,86
152	S152T	1,16	0,99
152	S152V	0,79	0,42
152	S152W	0,73	0,22
152	S152Y	0,91	0,26
155	K155A	1,10	0,85
155	K155C	0,92	0,72
155	K155D	0,94	0,85
155	K155E	0,82	0,79
155	K155G	1,05	0,58
155	K155H	1,04	0,84
155	K155L	1,05	0,89
155	K155M	0,91	0,91
155	K155N	1,18	0,90
155	K155P	0,99	0,94
155	K155Q	0,84	0,90
155	K155R	1,20	0,93
155	K155S	1,22	0,85
155	K155T	1,12	0,76
155	K155V	1,01	0,85
155	K155W	1,09	0,88
155	K155Y	1,21	0,80
160	H160A	0,89	0,89
160	H160C	0,84	0,98
160	H160D	0,89	0,69
160	H160E	0,86	0,52
160	H160F	0,77	0,79
160	H160G	0,82	0,36
160	H160I	0,36	0,58
160	H160L	1,03	0,92
160	H160M	0,56	0,97
160	H160N	1,11	1,02
160	H160P	0,05	0,05
160	H160Q	0,98	0,47
160	H160R	0,54	0,62
160	H160S	0,05	0,05

160	H160T	1,01	0,91
160	H160V	0,76	0,74
160	H160W	0,26	0,66
160	H160Y	0,86	0,89
165	D165A	0,53	0,12
165	D165C	1,01	0,07
165	D165E	1,14	0,07
165	D165F	0,09	0,07
165	D165G	0,63	0,20
165	D165H	0,46	0,18
165	D165I	0,06	0,15
165	D165K	0,07	0,14
165	D165L	0,30	0,11
165	D165M	0,58	0,10
165	D165N	1,16	1,10
165	D165P	0,05	0,05
165	D165Q	0,53	0,11
165	D165R	0,08	0,11
165	D165S	0,83	0,43
165	D165T	0,05	0,50
165	D165V	0,05	0,15
165	D165W	0,05	0,05
165	D165Y	0,31	0,07
168	E168A	0,83	0,92
168	E168C	0,83	0,50
168	E168D	0,82	0,57
168	E168F	0,69	0,59
168	E168G	0,92	0,75
168	E168H	0,84	0,90
168	E168I	1,08	0,71
168	E168K	0,05	0,05
168	E168L	0,80	0,92
168	E168M	1,12	0,80
168	E168N	0,97	0,83
168	E168P	0,05	0,05
168	E168Q	0,88	0,87
168	E168R	1,18	0,90

168	E168S	0,95	0,83
168	E168T	0,83	0,16
168	E168V	0,89	0,73
168	E168W	1,23	0,66
168	E168Y	0,76	0,82
172	L172A	1,14	1,06
172	L172C	1,07	0,89
172	L172D	0,83	0,91
172	L172E	0,97	1,01
172	L172G	0,50	0,60
172	L172H	0,93	1,06
172	L172I	0,97	0,90
172	L172K	0,98	1,12
172	L172M	0,86	0,91
172	L172N	0,91	0,96
172	L172P	0,17	0,83
172	L172Q	1,00	0,89
172	L172R	1,16	1,06
172	L172S	0,78	1,01
172	L172T	0,82	0,94
172	L172V	1,02	0,88
172	L172W	1,09	0,92
172	L172Y	1,06	0,98
173	S173A	0,92	0,74
173	S173C	0,82	0,57
173	S173D	0,63	0,71
173	S173E	1,07	0,65
173	S173F	0,82	0,25
173	S173G	0,73	0,78
173	S173H	0,85	0,66
173	S173I	1,20	0,59
173	S173K	1,17	1,03
173	S173L	0,75	0,20
173	S173M	1,05	0,48
173	S173N	1,02	0,84
173	S173Q	1,08	0,84
173	S173R	0,88	1,03

173	S173T	1,33	0,86
173	S173V	1,12	0,46
173	S173W	0,86	0,20
173	S173Y	0,90	0,25
177	K177A	0,05	1,20
177	K177C	0,05	0,76
177	K177D	0,05	1,07
177	K177E	0,05	1,08
177	K177F	0,05	1,01
177	K177G	0,05	1,03
177	K177H	0,05	1,07
177	K177I	0,05	0,89
177	K177L	0,89	0,91
177	K177M	0,10	0,90
177	K177N	0,05	1,15
177	K177P	0,05	1,11
177	K177Q	0,08	1,07
177	K177R	0,47	1,09
177	K177S	0,05	1,00
177	K177T	0,05	1,01
177	K177W	0,05	1,07
177	K177Y	0,05	0,97
188	E188A	0,05	1,10
188	E188C	0,05	0,85
188	E188D	0,05	1,21
188	E188F	0,05	1,08
188	E188G	0,05	1,17
188	E188H	0,05	1,00
188	E188I	0,05	1,11
188	E188K	0,05	1,02
188	E188M	0,05	1,08
188	E188N	0,05	1,06
188	E188P	1,40	1,16
188	E188Q	0,05	1,06
188	E188S	0,05	1,10
188	E188T	0,05	1,17
188	E188V	0,05	1,08

188	E188W	0,05	1,07
188	E188Y	0,05	1,02
191	T191A	0,49	1,11
191	T191C	0,13	1,07
191	T191D	0,91	1,03
191	T191F	0,05	1,02
191	T191G	0,19	1,09
191	T191H	0,05	1,27
191	T191I	0,18	1,06
191	T191K	0,05	1,33
191	T191L	0,05	1,08
191	T191M	0,06	1,09
191	T191N	0,76	1,13
191	T191P	0,99	1,07
191	T191Q	0,18	1,17
191	T191R	0,05	1,20
191	T191S	0,72	1,05
191	T191V	0,16	1,02
191	T191W	0,05	0,91
192	E192A	0,05	1,26
192	E192C	0,55	1,12
192	E192D	0,42	1,50
192	E192G	0,05	1,38
192	E192H	0,05	0,78
192	E192I	0,05	1,00
192	E192K	0,05	0,33
192	E192M	0,05	1,19
192	E192N	0,05	1,35
192	E192P	0,05	1,33
192	E192Q	0,22	1,55
192	E192R	0,05	0,37
192	E192S	0,05	1,47
192	E192T	0,10	1,35
192	E192V	0,05	1,25
192	E192W	0,05	1,17
192	E192Y	0,05	1,30
193	N193A	0,05	0,98

193	N193C	0,73	0,62
193	N193D	0,05	0,95
193	N193E	0,05	0,74
193	N193F	1,71	0,98
193	N193G	0,05	0,96
193	N193H	1,10	0,92
193	N193I	0,05	0,78
193	N193K	1,28	1,17
193	N193L	1,22	0,78
193	N193M	0,81	0,96
193	N193P	0,05	0,90
193	N193R	0,87	0,97
193	N193S	0,05	1,15
193	N193T	0,05	0,86
193	N193W	1,09	0,73
193	N193Y	1,89	1,10
196	Y196A	0,74	1,57
196	Y196C	0,05	1,36
196	Y196D	0,29	1,29
196	Y196E	0,05	1,29
196	Y196F	0,74	1,38
196	Y196G	0,05	1,09
196	Y196H	0,05	1,92
196	Y196I	0,05	1,61
196	Y196K	0,05	1,29
196	Y196L	0,05	1,14
196	Y196N	0,54	0,94
196	Y196P	0,05	1,50
196	Y196R	0,05	1,29
196	Y196S	0,36	1,59
196	Y196T	0,05	1,65
196	Y196V	0,05	1,55
196	Y196W	0,05	0,57
199	L199A	0,16	0,42
199	L199E	0,05	0,34
199	L199G	0,05	0,31
199	L199H	0,05	0,18

199	L199I	0,14	0,30
199	L199K	0,22	0,15
199	L199M	0,30	0,14
199	L199N	0,05	0,07
199	L199P	0,05	0,05
199	L199Q	0,05	0,20
199	L199R	0,05	0,23
199	L199S	0,05	0,29
199	L199T	0,12	0,35
199	L199V	0,61	0,13
199	L199W	0,05	0,05
199	L199Y	0,05	0,05
200	M200A	1,03	0,68
200	M200C	0,84	0,53
200	M200D	0,71	0,81
200	M200E	0,54	0,55
200	M200F	0,05	0,25
200	M200G	0,23	0,41
200	M200H	0,05	0,05
200	M200I	1,14	0,57
200	M200K	0,05	0,05
200	M200L	0,68	1,11
200	M200N	0,46	0,72
200	M200P	0,05	0,05
200	M200Q	0,78	0,77
200	M200S	0,61	1,11
200	M200T	0,80	0,61
200	M200V	0,97	0,56
200	M200W	0,05	0,05
201	Y201A	0,90	1,41
201	Y201C	1,22	0,14
201	Y201D	0,60	0,73
201	Y201E	0,81	1,36
201	Y201F	0,85	0,81
201	Y201G	0,56	1,63
201	Y201H	1,06	1,44
201	Y201I	1,35	0,11

201	Y201K	0,89	0,08
201	Y201L	1,05	0,18
201	Y201M	1,16	1,21
201	Y201N	1,15	0,31
201	Y201P	0,05	0,05
201	Y201Q	1,11	0,79
201	Y201R	0,87	0,06
201	Y201S	0,74	1,11
201	Y201T	0,65	0,39
201	Y201V	0,05	0,05
201	Y201W	0,73	0,08
202	A202C	0,97	0,57
202	A202D	0,83	0,93
202	A202E	0,49	0,85
202	A202F	0,05	0,68
202	A202G	0,45	0,83
202	A202H	0,05	1,30
202	A202I	0,50	1,02
202	A202K	0,37	0,12
202	A202L	0,46	0,95
202	A202M	0,32	0,84
202	A202N	0,53	1,08
202	A202P	0,05	0,72
202	A202Q	0,47	1,01
202	A202R	0,05	0,05
202	A202S	0,69	0,79
202	A202T	0,63	1,07
202	A202V	0,82	1,02
202	A202Y	0,05	0,43
213	T213A	1,11	0,98
213	T213C	0,97	0,77
213	T213D	1,12	0,91
213	T213E	1,11	0,88
213	T213F	1,13	0,75
213	T213G	1,11	0,91
213	T213H	0,92	1,00
213	T213I	0,05	0,05

213	T213K	0,90	1,11
213	T213L	1,26	0,75
213	T213M	1,26	0,78
213	T213N	1,11	0,91
213	T213P	0,94	0,91
213	T213Q	1,12	1,02
213	T213R	1,05	1,05
213	T213S	1,10	1,08
213	T213V	1,35	0,76
213	T213W	1,17	0,68
216	K216A	0,66	0,24
216	K216D	0,05	0,05
216	K216E	1,03	1,30
216	K216F	0,05	0,05
216	K216G	0,83	1,20
216	K216H	0,90	1,28
216	K216I	0,05	0,05
216	K216L	0,05	0,05
216	K216M	0,97	1,39
216	K216P	0,91	0,97
216	K216Q	1,04	1,34
216	K216R	0,77	1,32
216	K216S	0,97	1,28
216	K216T	0,99	1,22
216	K216V	0,95	1,07
216	K216W	1,00	1,13
216	K216Y	0,79	1,31
217	N217A	1,10	0,87
217	N217C	0,81	0,78
217	N217E	0,05	0,73
217	N217F	0,90	0,88
217	N217G	0,95	0,90
217	N217H	1,09	0,90
217	N217I	1,08	0,76
217	N217L	1,09	0,82
217	N217M	0,97	0,80
217	N217P	0,97	0,73

217	N217Q	1,31	0,74
217	N217R	1,19	0,87
217	N217S	1,05	0,87
217	N217T	1,01	0,87
217	N217V	1,18	0,69
217	N217W	0,99	0,80
217	N217Y	0,05	0,05
220	K220A	1,06	0,79
220	K220C	1,05	0,75
220	K220D	1,02	0,88
220	K220E	1,12	0,88
220	K220F	1,03	0,78
220	K220G	1,10	0,84
220	K220H	1,12	0,81
220	K220I	1,13	0,81
220	K220M	1,05	0,75
220	K220N	1,17	0,80
220	K220P	1,33	0,89
220	K220Q	1,21	0,87
220	K220R	1,26	0,83
220	K220S	1,30	0,81
220	K220T	0,05	0,09
220	K220V	1,21	0,82
220	K220W	1,01	0,81
220	K220Y	1,08	0,84
221	W221A	0,88	1,54
221	W221C	0,95	1,09
221	W221D	0,84	1,31
221	W221E	0,05	0,05
221	W221F	1,07	1,28
221	W221G	0,05	0,05
221	W221H	0,05	0,05
221	W221I	1,33	1,23
221	W221K	0,05	0,05
221	W221L	0,88	1,50
221	W221M	1,16	1,35
221	W221N	1,11	1,57

221	W221P	0,05	0,05
221	W221R	0,93	1,29
221	W221S	1,34	1,40
221	W221V	1,13	1,31
221	W221Y	1,14	1,36
227	N227A	1,01	1,02
227	N227C	0,92	0,95
227	N227D	1,01	1,06
227	N227E	1,03	1,06
227	N227F	0,72	0,81
227	N227G	1,05	1,09
227	N227H	0,95	1,13
227	N227I	1,03	0,76
227	N227K	1,00	1,13
227	N227L	0,84	0,75
227	N227M	0,84	0,87
227	N227P	1,08	0,88
227	N227Q	0,94	1,00
227	N227R	0,89	1,03
227	N227S	0,96	0,95
227	N227T	1,06	0,96
227	N227V	1,05	0,84
227	N227W	1,07	0,81
227	N227Y	1,01	0,85
232	R232A	0,05	0,05
232	R232C	0,40	0,14
232	R232D	0,05	0,05
232	R232E	0,41	0,12
232	R232G	0,06	0,23
232	R232H	0,66	0,34
232	R232K	0,52	0,47
232	R232M	0,62	0,12
232	R232N	0,05	0,05
232	R232P	0,05	0,05
232	R232Q	0,54	0,12
232	R232S	0,59	0,16
232	R232T	0,76	0,17

232	R232V	0,70	0,15
232	R232W	0,05	0,05
232	R232Y	0,05	0,05
235	A235C	0,86	0,53
235	A235D	0,70	0,98
235	A235E	0,93	0,84
235	A235F	1,01	0,68
235	A235G	1,17	0,78
235	A235H	0,80	1,01
235	A235I	1,07	0,84
235	A235K	0,93	1,14
235	A235L	0,89	0,97
235	A235M	0,99	0,91
235	A235N	0,78	1,03
235	A235P	0,97	0,48
235	A235Q	1,01	0,89
235	A235R	1,03	1,14
235	A235S	0,92	1,00
235	A235T	0,05	0,05
235	A235V	1,01	0,86
235	A235W	0,98	0,60
235	A235Y	0,91	0,93
237	K237A	0,05	0,78
237	K237C	0,05	0,57
237	K237D	0,05	0,08
237	K237E	0,05	0,74
237	K237F	0,05	0,09
237	K237G	0,05	1,21
237	K237H	0,05	0,26
237	K237I	0,05	0,40
237	K237L	0,05	0,57
237	K237M	0,05	0,46
237	K237N	0,05	0,43
237	K237P	0,05	0,30
237	K237Q	0,05	0,77
237	K237R	0,48	0,88
237	K237T	0,05	0,69

237	K237V	0,05	0,54
237	K237W	0,05	0,05
237	K237Y	0,05	0,05
238	H238A	0,05	0,62
238	H238C	0,05	0,63
238	H238D	0,05	0,75
238	H238F	0,05	0,05
238	H238G	0,05	0,73
238	H238I	0,05	0,18
238	H238K	0,05	0,05
238	H238L	0,05	0,25
238	H238M	0,05	0,36
238	H238N	0,21	0,83
238	H238P	0,05	0,57
238	H238Q	0,05	1,18
238	H238R	0,05	0,05
238	H238T	0,05	0,74
238	H238V	0,05	0,52
238	H238Y	0,05	0,05
240	K240A	0,05	1,13
240	K240D	0,05	1,19
240	K240E	0,05	1,19
240	K240F	0,05	0,90
240	K240G	0,05	1,22
240	K240H	0,05	1,17
240	K240I	0,05	0,99
240	K240M	0,31	1,13
240	K240N	0,05	1,37
240	K240P	0,05	1,69
240	K240Q	0,12	1,21
240	K240R	0,27	1,41
240	K240S	0,05	1,07
240	K240T	0,05	1,23
240	K240V	0,05	1,09
240	K240W	0,05	1,01
240	K240Y	0,05	1,11
246	D246A	0,73	1,03

246	D246E	1,18	1,03
246	D246F	0,67	1,02
246	D246G	0,61	1,09
246	D246H	0,71	1,05
246	D246I	0,75	0,85
246	D246K	0,36	1,18
246	D246L	0,81	0,91
246	D246M	0,80	0,92
246	D246N	0,68	0,97
246	D246P	0,47	0,81
246	D246Q	0,78	0,98
246	D246R	0,24	1,31
246	D246S	0,97	1,01
246	D246T	0,83	1,14
246	D246Y	0,90	0,96
249	S249A	1,06	0,97
249	S249C	0,93	0,74
249	S249D	0,98	0,94
249	S249E	1,27	0,92
249	S249F	0,91	0,74
249	S249G	0,91	0,94
249	S249H	1,04	0,93
249	S249K	1,15	1,02
249	S249L	1,14	0,82
249	S249M	0,95	0,77
249	S249P	1,09	0,80
249	S249Q	1,20	0,94
249	S249R	1,07	1,03
249	S249T	1,17	0,91
249	S249V	1,01	0,74
249	S249W	1,13	0,77
249	S249Y	1,07	0,87
250	Y250A	0,99	1,21
250	Y250C	1,03	1,12
250	Y250D	0,97	1,29
250	Y250E	1,13	1,33
250	Y250F	1,29	1,28

250	Y250G	1,09	1,33
250	Y250I	1,35	1,27
250	Y250K	1,07	1,48
250	Y250L	1,02	1,32
250	Y250M	1,35	1,39
250	Y250N	1,05	1,40
250	Y250P	0,71	1,05
250	Y250Q	1,01	1,54
250	Y250R	0,99	1,55
250	Y250S	1,02	1,41
250	Y250T	0,05	0,05
250	Y250V	0,05	0,05
250	Y250W	0,99	1,35
252	R252A	1,12	1,08
252	R252C	0,97	0,81
252	R252D	0,89	0,86
252	R252E	1,09	1,12
252	R252F	1,01	0,89
252	R252G	0,76	1,00
252	R252I	1,07	0,97
252	R252K	1,19	1,21
252	R252L	1,32	0,96
252	R252M	0,98	0,96
252	R252N	1,15	0,97
252	R252P	0,72	0,83
252	R252Q	1,16	1,04
252	R252S	1,04	1,01
252	R252T	1,09	0,99
252	R252V	1,01	0,94
252	R252Y	1,14	0,86
253	S253A	1,09	0,97
253	S253D	1,07	1,04
253	S253E	0,05	0,05
253	S253F	1,19	0,82
253	S253G	1,18	0,92
253	S253H	1,13	0,97
253	S253I	1,13	0,84

253	S253K	1,10	1,01
253	S253L	1,09	0,79
253	S253M	0,05	0,05
253	S253N	1,06	1,03
253	S253P	0,95	0,90
253	S253Q	1,13	0,93
253	S253T	1,14	0,97
253	S253V	1,15	0,90
253	S253W	1,04	0,87
253	S253Y	1,34	0,94
254	Q254A	0,98	0,88
254	Q254C	0,94	0,66
254	Q254D	1,10	0,90
254	Q254E	1,29	0,89
254	Q254F	1,23	0,74
254	Q254G	1,15	0,77
254	Q254H	1,04	0,94
254	Q254I	1,12	0,91
254	Q254K	1,00	0,99
254	Q254L	1,09	0,82
254	Q254M	0,94	0,89
254	Q254N	1,17	0,90
254	Q254R	1,05	0,98
254	Q254S	1,07	0,98
254	Q254T	1,21	0,65
254	Q254V	1,31	0,92
254	Q254W	1,17	0,69
254	Q254Y	1,03	0,87
255	T255A	1,09	0,73
255	T255C	0,89	0,78
255	T255D	0,05	0,05
255	T255E	1,09	0,64
255	T255F	1,30	0,68
255	T255G	1,15	0,73
255	T255H	1,10	0,74
255	T255I	1,18	0,70
255	T255K	1,27	0,83

255	T255L	0,97	0,73
255	T255M	0,98	0,72
255	T255N	0,83	0,76
255	T255P	0,77	0,59
255	T255R	1,12	0,85
255	T255S	1,10	0,84
255	T255V	1,17	0,70
255	T255W	1,27	0,74
255	T255Y	1,02	0,72
257	K257A	1,08	0,67
257	K257C	0,89	0,49
257	K257D	1,16	0,75
257	K257E	1,15	0,76
257	K257F	1,03	0,92
257	K257G	0,97	0,73
257	K257H	1,12	0,69
257	K257I	1,09	0,59
257	K257L	1,26	0,74
257	K257M	1,29	0,79
257	K257N	1,16	0,83
257	K257P	0,62	0,38
257	K257Q	1,18	0,82
257	K257R	1,03	0,89
257	K257S	1,29	0,71
257	K257T	1,04	0,77
257	K257V	1,31	0,78
257	K257W	0,99	0,72
258	P258A	0,97	1,08
258	P258C	1,17	0,85
258	P258D	1,33	1,10
258	P258E	0,95	1,05
258	P258F	0,96	0,75
258	P258G	1,30	1,02
258	P258H	1,38	1,13
258	P258I	1,27	0,25
258	P258K	1,29	1,11
258	P258L	1,08	0,61

258	P258M	1,09	0,91
258	P258N	1,07	1,01
258	P258Q	1,31	1,13
258	P258R	1,02	1,13
258	P258S	1,12	1,08
258	P258T	1,27	1,10
258	P258V	1,29	0,80
258	P258W	1,14	0,87
258	P258Y	1,16	1,08
268	Y268A	0,86	1,39
268	Y268C	0,47	1,10
268	Y268D	0,59	1,44
268	Y268E	0,55	1,47
268	Y268F	1,28	1,07
268	Y268G	1,03	1,21
268	Y268H	0,87	1,24
268	Y268I	0,05	0,05
268	Y268K	0,78	1,90
268	Y268L	0,72	1,10
268	Y268M	0,97	1,15
268	Y268N	0,69	1,51
268	Y268P	0,78	1,41
268	Y268Q	0,71	1,30
268	Y268R	0,76	1,49
268	Y268S	1,06	1,22
268	Y268T	0,99	1,12
268	Y268V	0,88	0,99
268	Y268W	0,97	1,07
272	K272A	0,05	0,73
272	K272C	0,05	0,68
272	K272D	0,05	0,86
272	K272E	0,05	0,85
272	K272F	0,05	0,56
272	K272G	0,05	0,60
272	K272H	0,05	0,78
272	K272I	0,05	0,81
272	K272M	0,05	0,77

272	K272N	0,05	0,67
272	K272P	0,05	0,38
272	K272R	0,90	0,86
272	K272S	0,05	0,79
272	K272T	0,05	0,99
272	K272V	0,05	0,64
272	K272W	0,05	0,48
272	K272Y	0,05	0,66
274	H274A	0,66	1,40
274	H274C	0,65	0,68
274	H274D	0,64	1,20
274	H274E	0,86	1,14
274	H274F	0,88	1,00
274	H274G	0,56	1,36
274	H274I	0,76	1,39
274	H274K	0,85	1,60
274	H274L	0,87	1,40
274	H274N	0,67	1,50
274	H274P	0,05	0,50
274	H274Q	0,84	1,47
274	H274R	0,80	1,50
274	H274S	0,67	1,28
274	H274T	0,69	1,38
274	H274W	1,26	0,79
274	H274Y	1,05	1,07
275	N275A	0,32	1,01
275	N275C	0,22	0,68
275	N275D	0,08	1,03
275	N275E	0,05	0,98
275	N275F	0,05	0,81
275	N275G	0,18	1,00
275	N275H	0,60	1,10
275	N275I	0,15	0,87
275	N275K	0,22	1,22
275	N275L	0,20	1,02
275	N275M	0,20	0,96
275	N275P	0,05	0,37

275	N275Q	0,21	0,96
275	N275R	0,28	1,04
275	N275S	0,28	0,92
275	N275T	0,19	0,79
275	N275V	0,19	0,76
275	N275W	0,05	0,76
275	N275Y	0,89	0,93
279	K279C	0,05	0,54
279	K279E	0,05	0,91
279	K279F	0,05	0,70
279	K279G	0,05	0,85
279	K279H	0,05	0,36
279	K279I	0,05	0,68
279	K279L	0,05	0,52
279	K279M	0,05	0,71
279	K279N	0,05	0,91
279	K279P	0,05	0,46
279	K279Q	0,05	0,86
279	K279S	0,05	0,94
279	K279T	0,05	0,92
279	K279V	0,05	0,78
279	K279W	0,05	0,76
279	K279Y	0,05	0,78
283	T283A	1,06	0,97
283	T283C	1,16	0,78
283	T283D	0,92	1,03
283	T283E	0,95	1,01
283	T283G	0,97	1,01
283	T283H	1,09	0,84
283	T283I	1,10	0,72
283	T283K	1,14	1,01
283	T283L	1,07	0,76
283	T283M	1,26	0,93
283	T283N	1,29	0,96
283	T283P	0,46	0,56
283	T283R	0,82	1,08
283	T283S	1,02	1,06

283	T283V	1,23	0,81
283	T283W	1,07	0,75
283	T283Y	1,01	1,04
285	S285A	0,93	0,80
285	S285C	0,73	0,61
285	S285D	0,91	1,09
285	S285E	1,33	0,89
285	S285F	1,18	1,02
285	S285H	0,98	1,10
285	S285I	0,84	0,52
285	S285K	1,16	0,84
285	S285L	0,85	0,54
285	S285M	0,98	0,76
285	S285Q	1,38	1,22
285	S285R	0,84	0,96
285	S285T	0,98	0,79
285	S285V	0,70	0,63
285	S285W	1,13	1,08
285	S285Y	0,97	1,49
293	N293A	1,02	0,93
293	N293C	0,78	0,69
293	N293D	1,08	0,89
293	N293E	0,87	0,92
293	N293F	0,89	0,70
293	N293G	1,31	0,92
293	N293H	1,12	1,05
293	N293I	0,94	0,75
293	N293K	1,42	1,41
293	N293L	0,87	0,81
293	N293M	0,95	1,07
293	N293P	0,97	0,40
293	N293Q	1,14	1,06
293	N293R	0,86	1,37
293	N293S	0,93	0,95
293	N293T	1,10	1,12
293	N293V	1,04	0,82
293	N293W	1,09	0,78

293	N293Y	1,19	0,74
294	K294A	0,83	0,92
294	K294C	0,83	0,50
294	K294D	0,82	0,57
294	K294E	0,83	0,68
294	K294F	0,69	0,59
294	K294G	0,92	0,75
294	K294H	0,84	0,90
294	K294I	1,08	0,71
294	K294L	0,80	0,92
294	K294M	1,12	0,80
294	K294N	0,97	0,83
294	K294P	0,05	0,05
294	K294Q	0,88	0,87
294	K294R	1,18	0,90
294	K294S	0,95	0,83
294	K294T	0,83	0,16
294	K294V	0,89	0,73
294	K294W	1,23	0,66
294	K294Y	0,76	0,82
297	T297C	0,86	0,53
297	T297D	0,70	0,98
297	T297E	0,93	0,84
297	T297F	1,01	0,68
297	T297G	1,17	0,78
297	T297H	0,80	1,01
297	T297I	1,07	0,84
297	T297K	0,93	1,14
297	T297L	0,89	0,97
297	T297M	0,99	0,91
297	T297N	0,78	1,03
297	T297P	0,97	0,48
297	T297Q	1,01	0,89
297	T297R	1,03	1,14
297	T297S	0,92	1,00
297	T297V	1,01	0,86
297	T297W	0,98	0,60

297	T297Y	0,91	0,93
300	K300A	0,99	0,79
300	K300C	0,95	0,39
300	K300D	0,91	0,61
300	K300E	0,86	0,78
300	K300F	0,74	0,63
300	K300G	0,98	0,62
300	K300H	1,04	0,83
300	K300I	1,02	0,82
300	K300L	0,91	0,73
300	K300M	1,17	0,80
300	K300N	1,02	0,80
300	K300P	0,05	0,05
300	K300Q	0,90	0,86
300	K300R	1,20	0,92
300	K300S	0,93	0,80
300	K300T	1,16	0,87
300	K300V	1,15	0,84
300	K300W	0,97	0,57
301	S301A	1,10	0,89
301	S301E	1,12	0,94
301	S301F	1,44	0,68
301	S301G	1,02	1,05
301	S301H	1,12	0,87
301	S301I	1,28	0,74
301	S301K	1,08	1,05
301	S301L	1,09	0,97
301	S301M	1,09	0,87
301	S301N	1,16	0,64
301	S301P	1,21	0,61
301	S301Q	1,18	0,95
301	S301R	1,35	0,89
301	S301T	1,23	0,85
301	S301V	1,18	0,81
301	S301W	1,27	0,75
301	S301Y	1,10	0,80
306	D306A	0,82	0,40

306	D306C	0,74	0,30
306	D306E	0,80	0,71
306	D306F	0,71	0,10
306	D306G	0,76	0,26
306	D306H	0,84	0,35
306	D306I	0,80	0,18
306	D306K	0,77	0,41
306	D306L	0,78	0,18
306	D306N	1,15	0,89
306	D306P	0,82	0,39
306	D306Q	1,03	0,43
306	D306R	0,82	0,27
306	D306S	0,81	0,50
306	D306T	0,88	0,29
306	D306V	0,99	0,22
306	D306W	0,05	0,05
306	D306Y	0,94	0,12
309	T309A	0,05	0,05
309	T309C	1,15	0,59
309	T309D	1,27	0,89
309	T309E	0,95	0,91
309	T309F	1,15	0,80
309	T309G	1,17	1,00
309	T309H	0,94	0,97
309	T309I	1,17	0,82
309	T309K	1,18	1,08
309	T309L	1,15	0,95
309	T309M	1,15	0,97
309	T309N	1,20	0,99
309	T309P	0,93	0,20
309	T309Q	1,19	0,98
309	T309R	1,12	1,08
309	T309S	1,00	1,04
309	T309V	1,38	0,95
309	T309W	1,08	0,77
309	T309Y	1,11	0,94
312	T312A	1,01	1,00

312	T312C	0,99	0,70
312	T312D	1,03	0,96
312	T312E	1,15	0,95
312	T312F	1,05	0,92
312	T312G	1,18	1,07
312	T312H	1,30	0,99
312	T312K	0,83	0,25
312	T312L	1,08	0,95
312	T312M	0,98	0,91
312	T312N	1,04	0,99
312	T312P	0,74	0,85
312	T312Q	1,05	0,94
312	T312R	1,13	1,00
312	T312S	1,29	0,99
312	T312V	1,40	0,87
312	T312W	1,14	0,83
312	T312Y	1,31	0,92
313	N313A	1,01	0,93
313	N313C	0,95	0,63
313	N313D	0,95	0,51
313	N313E	1,05	0,90
313	N313F	1,06	0,64
313	N313G	1,25	0,96
313	N313H	1,25	0,94
313	N313I	1,44	0,55
313	N313K	1,12	0,85
313	N313L	1,21	0,85
313	N313M	1,02	0,89
313	N313P	1,05	0,81
313	N313Q	1,00	1,00
313	N313R	1,19	1,13
313	N313S	1,25	1,05
313	N313V	1,28	0,74
313	N313W	1,01	0,67
313	N313Y	1,10	0,90
317	K317A	0,98	0,94
317	K317C	0,83	0,54

317	K317D	0,82	0,86
317	K317E	0,78	0,91
317	K317F	0,92	0,84
317	K317G	0,91	0,88
317	K317L	1,10	0,86
317	K317M	1,02	0,95
317	K317N	1,03	0,92
317	K317P	0,86	0,80
317	K317Q	0,76	0,94
317	K317R	0,78	0,89
317	K317S	1,04	0,93
317	K317T	0,94	0,88
317	K317V	1,00	0,93
317	K317W	1,08	0,83
317	K317Y	1,05	0,93
318	D318A	0,93	1,38
318	D318E	0,90	1,09
318	D318F	0,78	1,22
318	D318G	0,91	1,39
318	D318H	1,12	1,10
318	D318I	0,75	1,40
318	D318K	0,65	1,73
318	D318L	1,00	1,31
318	D318M	0,90	1,26
318	D318N	0,92	1,19
318	D318P	0,61	0,37
318	D318Q	0,93	1,14
318	D318R	0,71	1,54
318	D318S	1,11	1,37
318	D318T	1,40	1,32
318	D318V	0,81	1,34
318	D318W	0,90	1,07
318	D318Y	1,10	1,33
319	Q319A	1,02	1,13
319	Q319C	0,73	1,38
319	Q319D	0,85	1,31
319	Q319E	0,98	1,20

319	Q319F	0,87	1,11
319	Q319G	1,14	1,03
319	Q319H	0,94	1,28
319	Q319I	0,94	1,32
319	Q319K	1,10	1,52
319	Q319L	0,95	1,11
319	Q319M	0,90	1,09
319	Q319N	0,91	1,12
319	Q319P	1,13	0,57
319	Q319R	1,18	1,44
319	Q319S	0,91	1,12
319	Q319T	0,98	1,10
319	Q319V	1,07	1,08
319	Q319W	1,05	1,08
319	Q319Y	1,04	1,41
320	P320A	1,02	0,96
320	P320C	1,01	0,75
320	P320D	0,74	0,91
320	P320E	1,04	0,85
320	P320F	0,76	0,77
320	P320G	1,00	1,00
320	P320H	1,00	1,18
320	P320I	0,86	0,80
320	P320K	0,96	1,23
320	P320L	0,87	0,83
320	P320M	1,04	0,60
320	P320Q	0,95	1,08
320	P320R	0,79	1,25
320	P320S	1,16	1,03
320	P320T	1,11	1,28
320	P320V	1,08	0,88
320	P320W	0,90	1,03
320	P320Y	1,05	1,03
338	L338A	1,36	1,29
338	L338C	1,24	0,67
338	L338D	1,00	0,94
338	L338E	0,87	0,65

338	L338F	0,90	0,17
338	L338G	1,38	1,34
338	L338H	0,05	0,05
338	L338I	1,12	1,32
338	L338K	0,05	0,05
338	L338M	1,20	1,27
338	L338P	1,11	1,23
338	L338Q	0,96	0,61
338	L338R	0,05	0,05
338	L338S	1,13	1,51
338	L338T	1,42	1,05
338	L338V	1,14	1,55
338	L338W	0,98	0,14
338	L338Y	1,15	0,11
339	Q339A	1,08	1,13
339	Q339C	0,88	0,79
339	Q339D	0,93	0,11
339	Q339E	1,07	0,84
339	Q339F	0,86	0,55
339	Q339G	1,17	1,21
339	Q339H	1,03	1,04
339	Q339K	1,26	1,13
339	Q339L	1,12	0,70
339	Q339M	0,93	0,81
339	Q339P	1,02	1,24
339	Q339R	0,81	0,35
339	Q339S	1,02	1,02
339	Q339T	1,35	1,01
339	Q339V	1,23	0,76
339	Q339W	0,05	0,05
339	Q339Y	1,14	0,78
340	S340A	1,23	1,43
340	S340C	0,74	0,75
340	S340D	0,97	1,63
340	S340E	0,92	1,58
340	S340F	0,83	0,82
340	S340H	1,12	1,45

340	S340I	1,07	1,07
340	S340K	0,99	1,76
340	S340L	0,05	0,05
340	S340M	1,24	1,20
340	S340N	1,10	1,75
340	S340P	0,69	0,81
340	S340Q	1,21	1,76
340	S340T	1,21	1,14
340	S340V	1,00	1,09
340	S340Y	1,02	0,97
343	D343A	0,96	0,35
343	D343C	1,32	0,74
343	D343E	1,00	1,07
343	D343F	0,91	0,79
343	D343H	0,98	1,02
343	D343I	1,27	0,88
343	D343L	0,95	1,08
343	D343M	0,99	1,02
343	D343N	1,05	0,88
343	D343P	1,30	1,03
343	D343Q	1,14	1,01
343	D343R	1,25	1,03
343	D343T	1,08	0,98
343	D343W	1,00	0,64
343	D343Y	1,29	0,82
345	W345A	1,05	0,90
345	W345C	0,97	0,43
345	W345D	1,10	1,15
345	W345E	1,06	1,24
345	W345F	1,07	0,55
345	W345H	1,15	1,10
345	W345I	1,28	0,90
345	W345K	0,05	0,05
345	W345L	1,07	0,99
345	W345M	1,02	1,01
345	W345N	1,07	1,10
345	W345P	1,00	0,94

345	W345Q	1,26	1,10
345	W345S	1,01	1,12
345	W345T	1,15	1,15
345	W345V	1,16	1,02
363	C363A	0,84	1,06
363	C363D	0,87	1,74
363	C363E	0,99	1,34
363	C363F	0,83	1,03
363	C363G	0,61	0,83
363	C363H	0,78	0,76
363	C363I	0,92	0,63
363	C363L	0,73	0,89
363	C363M	0,97	1,36
363	C363N	0,92	1,86
363	C363P	0,05	0,05
363	C363Q	0,88	1,78
363	C363R	0,05	0,05
363	C363S	0,88	1,35
363	C363T	1,15	0,18
363	C363V	1,02	0,99
363	C363W	0,35	0,70
363	C363Y	0,92	0,12
366	Y366A	0,96	1,14
366	Y366C	0,46	0,37
366	Y366D	0,52	1,18
366	Y366E	0,91	1,18
366	Y366F	0,91	0,87
366	Y366G	0,94	1,08
366	Y366H	1,07	1,12
366	Y366I	0,85	0,87
366	Y366K	0,72	0,82
366	Y366L	0,77	0,61
366	Y366M	0,92	0,79
366	Y366N	1,03	0,91
366	Y366P	0,54	0,78
366	Y366Q	1,03	1,49
366	Y366R	0,96	0,96

366	Y366S	1,07	1,02
366	Y366T	1,01	0,91
366	Y366V	1,04	0,94
366	Y366W	1,11	0,99
369	Y369A	0,05	0,05
369	Y369C	0,44	0,16
369	Y369E	0,98	0,87
369	Y369F	1,03	0,79
369	Y369G	0,86	0,33
369	Y369H	0,89	0,78
369	Y369I	1,33	0,91
369	Y369K	1,07	0,80
369	Y369M	1,06	1,02
369	Y369P	0,49	0,20
369	Y369Q	1,07	0,79
369	Y369R	1,11	0,95
369	Y369S	0,89	0,60
369	Y369T	1,28	0,68
369	Y369V	1,17	0,91
369	Y369W	1,09	0,95
370	Y370A	1,03	1,21
370	Y370C	0,44	0,19
370	Y370D	0,48	1,35
370	Y370E	0,98	1,35
370	Y370F	0,90	0,73
370	Y370G	1,21	1,18
370	Y370H	0,96	1,36
370	Y370I	0,99	1,00
370	Y370K	0,93	1,65
370	Y370L	0,93	0,88
370	Y370M	0,91	1,04
370	Y370N	1,04	1,41
370	Y370P	0,44	0,67
370	Y370Q	0,87	1,51
370	Y370S	1,06	1,50
370	Y370T	1,07	1,10
370	Y370V	1,05	1,13

370	Y370W	0,94	0,91
375	Y375A	1,03	1,39
375	Y375C	0,59	0,48
375	Y375D	0,96	1,52
375	Y375E	0,96	1,48
375	Y375F	0,90	1,00
375	Y375G	0,90	0,98
375	Y375H	0,98	1,16
375	Y375I	0,94	1,06
375	Y375K	0,96	1,43
375	Y375L	1,03	1,07
375	Y375M	0,98	1,05
375	Y375N	0,92	1,48
375	Y375P	0,92	0,89
375	Y375Q	0,92	1,56
375	Y375R	0,77	1,61
375	Y375S	0,92	1,29
375	Y375T	1,25	1,04
375	Y375W	0,98	0,88
379	S379A	1,01	1,02
379	S379C	0,60	0,44
379	S379D	0,92	0,96
379	S379E	0,99	1,01
379	S379F	0,48	0,43
379	S379G	0,90	0,91
379	S379H	0,05	0,05
379	S379I	0,80	0,70
379	S379K	1,00	1,12
379	S379L	0,84	0,56
379	S379M	0,87	0,80
379	S379N	1,03	0,98
379	S379P	0,61	0,39
379	S379Q	0,94	0,98
379	S379R	0,96	1,01
379	S379T	1,07	0,95
379	S379V	0,90	0,75
379	S379W	0,70	0,35

379	S379Y	0,92	0,59
381	K381A	0,85	0,78
381	K381C	0,86	0,35
381	K381D	0,87	0,65
381	K381E	0,93	0,81
381	K381F	0,96	0,20
381	K381G	0,96	0,82
381	K381H	1,13	0,73
381	K381I	0,98	0,36
381	K381L	0,95	0,38
381	K381M	0,93	0,56
381	K381N	0,87	0,68
381	K381P	1,18	0,39
381	K381Q	1,03	0,90
381	K381R	1,20	0,95
381	K381S	1,18	0,89
381	K381T	1,01	0,60
381	K381V	1,00	0,43
381	K381W	0,90	0,22
381	K381Y	0,87	0,63
385	D385A	1,01	0,88
385	D385C	0,05	0,05
385	D385E	0,89	1,05
385	D385F	0,73	0,54
385	D385G	1,05	0,88
385	D385H	0,96	0,99
385	D385I	0,46	0,15
385	D385K	1,00	1,06
385	D385L	0,96	0,47
385	D385N	0,91	0,96
385	D385P	0,05	0,05
385	D385Q	1,02	1,01
385	D385R	0,86	0,95
385	D385S	1,10	1,00
385	D385T	1,22	0,92
385	D385V	0,85	0,43
385	D385W	0,98	0,53

386	P386A	0,90	0,80
386	P386C	0,72	0,69
386	P386D	0,85	0,94
386	P386E	0,94	0,87
386	P386F	0,72	0,66
386	P386G	1,02	0,77
386	P386H	0,89	0,93
386	P386I	1,12	0,73
386	P386K	1,22	0,87
386	P386L	0,96	0,73
386	P386M	0,94	0,70
386	P386N	0,91	0,86
386	P386Q	0,95	0,86
386	P386S	0,83	0,82
386	P386T	1,00	0,54
386	P386V	1,11	0,79
386	P386W	0,90	0,44
386	P386Y	0,91	0,78
391	R391A	0,58	0,22
391	R391C	0,28	0,12
391	R391E	0,05	0,08
391	R391G	0,42	0,16
391	R391H	0,59	0,29
391	R391K	0,88	0,59
391	R391L	0,05	0,05
391	R391N	0,71	0,38
391	R391P	0,05	0,05
391	R391Q	0,62	0,28
391	R391S	0,05	0,33
391	R391T	0,67	0,25
391	R391V	0,24	0,09
391	R391W	0,05	0,05
391	R391Y	0,05	0,05
392	R392A	0,89	0,73
392	R392C	0,74	0,66
392	R392E	0,79	0,46
392	R392F	1,03	0,43

392	R392G	0,99	0,65
392	R392H	0,86	0,96
392	R392I	1,08	0,57
392	R392K	1,10	1,09
392	R392L	0,91	0,63
392	R392M	1,07	0,72
392	R392N	0,89	0,90
392	R392P	0,67	0,31
392	R392Q	1,12	0,75
392	R392S	1,00	0,73
392	R392T	1,00	0,91
392	R392V	0,89	0,48
392	R392W	0,68	0,23
392	R392Y	1,00	0,60
393	D393A	0,98	0,77
393	D393C	0,69	0,48
393	D393E	0,92	0,81
393	D393F	0,84	0,61
393	D393G	1,08	0,75
393	D393H	0,88	0,75
393	D393I	0,05	0,05
393	D393K	1,09	0,80
393	D393L	1,04	0,70
393	D393N	0,05	0,05
393	D393P	0,05	0,05
393	D393Q	1,00	0,82
393	D393R	0,88	0,64
393	D393S	0,92	0,91
393	D393T	1,12	0,90
393	D393V	1,04	0,63
393	D393W	0,95	0,66
393	D393Y	1,01	0,66
394	Y394A	0,91	0,86
394	Y394D	0,98	0,84
394	Y394E	0,92	1,03
394	Y394F	1,07	0,98
394	Y394G	1,13	0,85

394	Y394H	1,04	0,99
394	Y394I	1,11	0,95
394	Y394K	1,09	1,07
394	Y394L	1,22	1,11
394	Y394M	0,74	0,23
394	Y394N	1,00	1,01
394	Y394P	0,05	0,05
394	Y394Q	1,09	1,13
394	Y394S	1,11	1,15
394	Y394V	3,00	0,75
394	Y394W	1,11	1,16
400	H400A	1,24	0,89
400	H400C	1,16	0,73
400	H400D	1,05	0,82
400	H400E	0,99	0,95
400	H400F	1,01	0,94
400	H400G	0,90	0,83
400	H400I	1,04	0,91
400	H400K	0,92	1,03
400	H400L	0,90	0,88
400	H400M	1,01	0,91
400	H400N	1,26	0,92
400	H400P	0,05	0,05
400	H400Q	0,96	0,94
400	H400R	1,03	0,87
400	H400S	0,94	0,92
400	H400T	0,95	0,88
400	H400V	1,28	0,91
400	H400W	1,17	0,80
400	H400Y	1,15	0,92
402	Y402A	1,07	0,97
402	Y402C	0,92	0,76
402	Y402D	0,90	0,80
402	Y402E	1,09	0,77
402	Y402F	0,89	0,82
402	Y402G	0,92	0,81
402	Y402H	1,21	0,91

402	Y402I	1,36	0,75
402	Y402K	0,95	0,84
402	Y402L	1,09	0,49
402	Y402M	1,14	0,88
402	Y402N	1,06	0,86
402	Y402P	1,03	0,28
402	Y402Q	0,98	0,83
402	Y402R	1,16	0,75
402	Y402T	1,32	1,02
402	Y402V	1,40	0,95
402	Y402W	1,24	0,89
403	L403A	1,20	0,89
403	L403C	1,10	0,98
403	L403D	1,03	0,95
403	L403E	1,26	0,93
403	L403F	1,03	0,74
403	L403G	1,22	0,96
403	L403H	1,10	0,90
403	L403M	1,11	0,99
403	L403N	0,98	0,95
403	L403P	0,78	0,47
403	L403Q	1,24	0,98
403	L403R	1,36	1,01
403	L403S	1,17	1,00
403	L403T	1,53	0,99
403	L403V	1,34	1,00
403	L403W	1,15	0,85
403	L403Y	1,16	0,97
404	D404A	1,12	0,73
404	D404C	1,28	0,61
404	D404E	1,38	0,78
404	D404G	1,25	0,77
404	D404I	1,20	0,84
404	D404K	1,10	0,83
404	D404L	1,09	0,91
404	D404M	1,13	0,76
404	D404N	1,13	0,98

404	D404P	1,05	0,56
404	D404Q	1,17	0,91
404	D404R	1,15	0,77
404	D404S	1,19	0,99
404	D404V	1,28	0,79
404	D404W	1,05	0,76
404	D404Y	1,08	0,81
406	S406A	0,99	0,99
406	S406C	1,11	0,85
406	S406D	0,93	1,02
406	S406E	0,95	0,91
406	S406F	0,86	0,88
406	S406G	0,93	0,86
406	S406H	0,88	0,98
406	S406I	0,92	0,91
406	S406K	0,95	0,82
406	S406L	0,94	0,98
406	S406M	0,89	0,90
406	S406N	1,09	0,94
406	S406P	0,91	0,93
406	S406Q	0,05	0,05
406	S406T	1,18	0,97
406	S406V	1,14	0,87
406	S406Y	0,99	0,80
407	D407C	1,14	0,41
407	D407E	0,82	0,59
407	D407F	0,88	0,35
407	D407G	1,10	0,38
407	D407H	0,85	0,63
407	D407I	1,05	0,22
407	D407K	1,00	0,44
407	D407L	0,91	0,18
407	D407M	1,05	0,37
407	D407N	1,11	0,96
407	D407P	0,05	0,05
407	D407Q	0,94	0,53
407	D407R	0,78	0,36

407	D407S	0,93	0,65
407	D407T	1,06	0,49
407	D407V	0,93	0,29
407	D407W	1,06	0,20
407	D407Y	0,85	0,38
410	G410A	0,90	1,00
410	G410C	1,04	0,81
410	G410D	0,05	0,05
410	G410E	0,05	0,05
410	G410F	0,96	0,22
410	G410H	0,93	0,34
410	G410I	0,05	0,05
410	G410L	0,05	0,05
410	G410M	1,13	0,35
410	G410N	0,99	0,27
410	G410P	0,05	0,05
410	G410Q	1,05	0,14
410	G410R	0,98	0,27
410	G410T	1,08	0,70
410	G410V	1,10	0,42
410	G410W	0,05	0,05
410	G410Y	0,92	0,49
413	R413A	1,02	1,06
413	R413D	0,71	0,40
413	R413E	0,86	0,67
413	R413G	1,19	0,33
413	R413H	1,06	0,95
413	R413I	0,96	0,75
413	R413K	1,08	0,95
413	R413L	1,02	0,96
413	R413M	0,81	0,81
413	R413N	0,93	0,72
413	R413P	0,05	0,05
413	R413Q	0,81	0,35
413	R413S	0,85	0,87
413	R413T	0,05	0,74
413	R413V	0,93	0,73

413	R413W	0,92	0,41
413	R413Y	0,73	0,49
414	E414A	1,06	0,70
414	E414C	1,05	0,55
414	E414D	1,13	0,75
414	E414F	0,81	0,59
414	E414G	0,82	0,68
414	E414H	0,89	0,65
414	E414I	0,98	0,60
414	E414K	0,96	0,65
414	E414L	1,16	0,71
414	E414M	0,88	0,72
414	E414N	0,99	0,57
414	E414P	0,85	0,60
414	E414Q	0,85	0,70
414	E414R	1,00	0,65
414	E414S	0,91	0,63
414	E414T	0,79	0,67
414	E414W	1,03	0,25
414	E414Y	0,78	0,58
416	V416A	0,93	0,67
416	V416C	0,94	0,61
416	V416D	1,05	0,71
416	V416F	0,05	0,05
416	V416H	0,92	0,78
416	V416I	0,83	0,74
416	V416K	0,71	0,65
416	V416L	0,96	0,81
416	V416M	1,06	0,78
416	V416N	0,92	0,66
416	V416P	1,18	0,53
416	V416Q	1,02	0,74
416	V416R	1,02	0,29
416	V416S	1,15	0,46
416	V416T	1,01	0,65
416	V416W	0,83	0,55
416	V416Y	0,89	0,69

419	K419A	1,36	1,29
419	K419C	1,24	0,67
419	K419D	1,00	0,94
419	K419E	0,87	0,65
419	K419F	0,90	0,17
419	K419H	0,05	0,05
419	K419I	1,12	1,32
419	K419L	0,05	0,05
419	K419M	1,20	1,27
419	K419N	0,05	0,05
419	K419P	1,11	1,23
419	K419Q	0,96	0,61
419	K419R	0,05	0,05
419	K419S	1,13	1,51
419	K419T	1,42	1,05
419	K419V	1,14	1,55
419	K419W	0,98	0,14
419	K419Y	1,15	0,11
422	S422A	0,64	0,97
422	S422C	0,96	0,71
422	S422D	0,97	0,96
422	S422E	1,31	0,78
422	S422F	0,96	0,71
422	S422G	1,20	0,99
422	S422H	1,06	0,66
422	S422I	1,11	0,85
422	S422K	1,16	0,96
422	S422L	0,99	0,74
422	S422M	1,04	0,94
422	S422N	1,12	1,03
422	S422P	0,84	0,70
422	S422Q	0,15	0,82
422	S422R	1,02	0,94
422	S422T	0,97	0,92
422	S422V	1,17	0,88
422	S422W	0,96	0,70
422	S422Y	1,09	0,92

427	L427A	0,93	0,66
427	L427C	1,02	0,68
427	L427D	0,05	0,05
427	L427E	0,86	0,27
427	L427F	0,89	0,30
427	L427G	0,63	0,26
427	L427H	0,05	0,05
427	L427I	1,08	0,64
427	L427K	0,05	0,05
427	L427M	0,86	0,79
427	L427N	0,76	0,31
427	L427P	1,13	0,06
427	L427Q	0,95	0,53
427	L427R	0,05	0,05
427	L427S	0,78	0,27
427	L427T	0,80	0,70
427	L427V	0,82	0,72
427	L427W	0,05	0,05
427	L427Y	0,05	0,05
433	G433A	1,27	1,08
433	G433C	1,15	0,69
433	G433D	1,05	0,96
433	G433E	0,92	0,99
433	G433F	1,04	0,92
433	G433H	1,27	0,99
433	G433I	1,37	0,86
433	G433K	1,27	1,05
433	G433L	1,30	0,90
433	G433M	1,23	1,01
433	G433N	1,07	0,75
433	G433P	1,13	0,95
433	G433Q	0,78	0,99
433	G433R	1,00	0,91
433	G433S	1,17	0,96
433	G433T	1,17	0,90
433	G433V	1,27	0,95
433	G433Y	1,26	1,01

436	K436A	0,92	0,94
436	K436C	0,90	0,84
436	K436D	0,86	0,93
436	K436E	0,70	0,87
436	K436F	0,81	0,64
436	K436G	0,84	0,77
436	K436H	1,09	0,89
436	K436I	1,08	0,81
436	K436L	1,01	0,78
436	K436M	0,76	0,85
436	K436N	0,98	0,92
436	K436P	0,88	0,71
436	K436Q	1,01	0,96
436	K436R	1,06	0,79
436	K436S	0,75	0,92
436	K436T	0,95	0,90
436	K436V	0,98	0,87
436	K436W	1,07	0,71
436	K436Y	0,99	0,80
439	Y439A	1,02	0,78
439	Y439D	1,01	0,85
439	Y439E	0,05	0,05
439	Y439F	0,77	0,78
439	Y439G	1,01	0,77
439	Y439H	0,96	0,73
439	Y439I	0,05	0,05
439	Y439K	0,96	0,74
439	Y439L	0,05	0,05
439	Y439M	1,04	0,77
439	Y439N	0,96	0,83
439	Y439P	0,87	0,85
439	Y439Q	0,90	0,88
439	Y439R	0,75	0,80
439	Y439S	0,94	0,82
439	Y439T	0,84	0,79
439	Y439V	1,04	0,70
439	Y439W	0,86	0,72

442	K442A	1,38	0,98
442	K442C	0,05	0,05
442	K442F	1,04	0,97
442	K442G	1,23	1,02
442	K442H	1,07	1,04
442	K442I	1,13	0,93
442	K442N	1,39	1,03
442	K442P	1,11	1,03
442	K442Q	1,11	1,05
442	K442R	1,33	1,01
442	K442S	1,24	1,07
442	K442T	1,34	1,06
442	K442V	1,20	0,99
442	K442W	1,32	0,98
442	K442Y	1,24	1,08
445	A445C	0,98	0,83
445	A445D	1,04	0,87
445	A445G	1,21	1,01
445	A445H	0,90	0,93
445	A445I	1,25	0,84
445	A445K	1,20	0,11
445	A445L	1,17	0,92
445	A445N	1,20	0,91
445	A445P	0,91	0,77
445	A445Q	0,05	0,05
445	A445R	0,91	0,89
445	A445S	1,16	0,94
445	A445T	1,29	0,88
445	A445V	1,27	0,93
445	A445W	1,25	0,80
447	K447A	1,09	1,06
447	K447C	1,11	0,87
447	K447D	1,00	0,99
447	K447F	1,09	0,84
447	K447G	1,06	0,94
447	K447H	1,13	0,92
447	K447I	1,22	0,91

447	K447L	1,06	1,01
447	K447M	1,07	0,96
447	K447N	1,43	0,97
447	K447Q	1,34	1,00
447	K447R	1,10	0,96
447	K447S	0,90	0,92
447	K447T	1,21	0,37
447	K447V	0,69	0,86
447	K447W	1,31	0,89
447	K447Y	1,21	0,96
448	V448A	0,98	0,96
448	V448C	1,36	0,98
448	V448D	1,15	1,02
448	V448E	0,05	0,05
448	V448F	1,48	1,01
448	V448G	1,26	1,05
448	V448H	1,37	1,03
448	V448I	1,44	0,97
448	V448K	1,20	1,07
448	V448L	1,04	1,08
448	V448M	1,13	0,97
448	V448N	1,24	0,70
448	V448P	0,84	1,19
448	V448Q	1,18	1,16
448	V448R	0,05	0,05
448	V448S	1,20	1,10
448	V448T	0,05	0,05
448	V448W	1,08	0,89
448	V448Y	1,33	1,27
450	Y450A	0,95	0,94
450	Y450C	1,22	0,84
450	Y450D	1,19	0,95
450	Y450E	1,01	0,92
450	Y450G	1,02	0,93
450	Y450H	1,23	0,90
450	Y450K	1,18	0,94
450	Y450L	0,93	0,69

450	Y450M	1,29	0,89
450	Y450N	1,23	0,96
450	Y450P	0,75	0,30
450	Y450Q	1,00	0,95
450	Y450R	1,22	1,02
450	Y450S	1,22	1,01
450	Y450T	1,32	0,96
450	Y450V	0,05	0,05
450	Y450W	1,21	0,95
452	L452A	1,08	1,06
452	L452C	1,00	1,01
452	L452D	0,98	1,08
452	L452E	0,75	0,55
452	L452F	0,79	0,93
452	L452G	1,07	1,00
452	L452H	1,05	0,99
452	L452K	1,11	1,08
452	L452M	1,13	1,09
452	L452N	1,06	1,28
452	L452P	1,02	0,78
452	L452Q	0,92	1,22
452	L452R	0,93	1,26
452	L452S	0,86	1,21
452	L452T	1,02	1,18
452	L452V	1,14	1,14
452	L452Y	1,17	1,07
455	N455A	1,07	1,04
455	N455C	0,85	0,89
455	N455D	1,07	0,97
455	N455E	1,14	0,94
455	N455G	1,23	1,00
455	N455H	1,05	1,01
455	N455I	1,23	0,95
455	N455K	1,10	1,08
455	N455L	1,06	0,97
455	N455M	0,95	0,96
455	N455P	1,36	0,93

455	N455Q	0,96	0,91
455	N455R	1,13	1,02
455	N455S	1,04	0,91
455	N455T	1,16	0,90
455	N455V	1,26	0,89
455	N455W	1,12	0,76
455	N455Y	1,08	0,15
463	N463A	1,25	1,06
463	N463D	0,97	1,02
463	N463F	1,04	0,87
463	N463G	1,04	1,00
463	N463H	1,12	0,99
463	N463I	0,05	0,05
463	N463K	1,07	1,00
463	N463L	1,16	1,01
463	N463M	1,24	1,08
463	N463P	0,93	1,05
463	N463Q	0,98	1,04
463	N463R	0,95	0,93
463	N463S	1,27	0,96
463	N463T	1,38	0,91
463	N463V	1,32	0,86
463	N463W	1,45	0,74
463	N463Y	1,20	0,90
465	D465A	0,76	1,06
465	D465C	0,84	0,74
465	D465E	0,95	0,93
465	D465F	0,78	0,89
465	D465G	1,35	0,92
465	D465H	1,06	0,92
465	D465I	1,37	0,85
465	D465K	1,53	0,88
465	D465L	1,14	0,95
465	D465M	1,06	0,98
465	D465N	1,32	0,93
465	D465P	1,13	0,71
465	D465Q	0,86	0,94

465	D465R	1,18	0,90
465	D465S	0,87	0,98
465	D465T	1,42	0,92
465	D465V	1,24	0,93
465	D465W	1,00	0,83
465	D465Y	1,06	0,93
469	E469A	1,16	1,01
469	E469C	1,03	0,86
469	E469D	1,22	1,02
469	E469F	1,11	1,00
469	E469G	1,19	1,00
469	E469H	1,04	0,96
469	E469K	1,16	0,96
469	E469L	1,10	0,98
469	E469M	0,05	0,05
469	E469N	1,19	0,47
469	E469P	0,85	1,05
469	E469Q	1,03	1,04
469	E469R	1,01	0,75
469	E469S	0,91	1,08
469	E469T	1,15	1,06
469	E469V	1,15	1,08
469	E469W	1,24	0,97
469	E469Y	1,35	1,09
471	K471A	1,09	1,09
471	K471C	1,04	0,91
471	K471D	1,01	1,06
471	K471F	1,10	1,05
471	K471G	1,13	1,12
471	K471H	1,00	1,10
471	K471I	1,22	1,02
471	K471L	0,99	1,07
471	K471M	0,95	1,14
471	K471N	1,04	1,12
471	K471P	0,84	0,98
471	K471Q	0,90	1,08
471	K471R	0,77	1,33

471	K471S	0,97	1,01
471	K471T	1,11	1,09
471	K471V	1,28	1,11
471	K471Y	1,15	1,36
473	N473A	1,03	0,99
473	N473C	1,15	0,74
473	N473D	1,14	0,98
473	N473E	1,20	0,99
473	N473F	1,10	0,83
473	N473G	1,35	0,99
473	N473H	1,02	0,91
473	N473I	0,66	0,45
473	N473K	1,02	1,02
473	N473L	0,05	0,97
473	N473M	1,11	1,00
473	N473P	1,01	0,95
473	N473Q	1,13	0,99
473	N473R	1,08	1,05
473	N473S	1,15	0,98
473	N473T	1,04	1,04
473	N473V	0,05	0,05
473	N473W	0,85	0,64
473	N473Y	1,23	0,86
476	S476A	1,51	1,02
476	S476C	0,91	0,89
476	S476D	0,98	0,91
476	S476E	1,08	0,91
476	S476F	1,09	0,87
476	S476G	1,22	0,97
476	S476H	1,07	0,96
476	S476I	1,03	0,78
476	S476K	1,01	0,97
476	S476L	1,46	0,93
476	S476M	1,58	1,08
476	S476N	1,61	0,98
476	S476P	1,02	0,62
476	S476Q	1,13	1,03

476	S476R	1,01	1,08
476	S476T	1,78	1,01
476	S476V	1,21	0,89
476	S476W	1,43	0,78
476	S476Y	1,79	0,94

Exemplo 27. Posições restritivas vs. não restritivas

Com base nos dados de desempenho e de estabilidade relativos para as posições de AmyS descritas no Exemplo 26, as posições de AmyS foram classificadas como "restritivas" versus "não restritivas" como se segue: as posições não restritivas têm $\geq 20\%$ de mutações neutras para pelo menos uma propriedade; e as posições restritivas têm $< 20\%$ de mutações neutras para atividade e estabilidade. As posições não restritivas são boas candidatas para mutação no desenho de α -amilases tendo função melhorada porque um grande número de mutações são toleradas (para se manter próximo ao desempenho da selvagem) ou melhoram o desempenho. As posições restritivas não são boas candidatas para mutação porque mutações não são geralmente toleradas. As propriedades de qualquer amilase podem ser melhoradas pela combinação de mutações em posições não restritivas. A Tabela 27-1 mostra duas posições restritivas identificadas em AmyS (% = percentual de variantes avaliadas que encontra definição de mutação neutra). A Tabela 27-2 mostra 150 posições não restritivas identificadas em AmyS (% = percentual de variantes avaliadas que encontra definição de mutação neutra; $\geq 20\%$ de mutações neutras para pelo menos uma propriedade). Espera-se que posições restritivas e não restritivas sejam conservadas entre α -amilases diferentes.

TABELA 27-1. Posições restritivas em AmyS			
Posição	Aminoácido selvagem	% PI Estabilidade $>0,5$	% PI Atividade $>0,5$
106	H	18%	0%
199	L	13%	0%

TABELA 27-2. Posições Não-restritivas em Amys

Posição	Aminoácido selvagem	% PI Estabilidade >0,5	% PI Atividade >0,5
5	N	100%	6%
6	G	100%	100%
13	E	11%	89%
14	W	100%	84%
15	Y	100%	100%
16	L	94%	100%
18	D	100%	100%
20	G	95%	16%
25	K	100%	100%
27	A	100%	89%
29	E	100%	53%
36	L	100%	74%
39	T	100%	80%
50	T	95%	74%
52	R	94%	94%
53	S	100%	100%
54	D	11%	79%
67	E	94%	81%
71	K	95%	100%
73	T	83%	100%
75	R	100%	100%
77	K	24%	94%
80	T	100%	100%
81	K	100%	94%
83	Q	100%	94%
85	L	100%	100%
90	A	100%	95%
92	H	94%	56%
107	K	21%	95%
111	D	74%	95%
113	T	100%	100%
114	E	50%	94%
120	E	17%	100%

121	V	6%	94%
126	R	6%	88%
128	Q	29%	88%
131	S	13%	94%
133	T	53%	100%
137	Q	94%	94%
138	A	39%	72%
139	W	100%	88%
141	K	100%	100%
143	D	93%	80%
147	R	95%	0%
149	N	100%	93%
150	T	100%	88%
151	Y	100%	100%
152	S	94%	47%
155	K	100%	100%
160	H	89%	78%
165	D	47%	11%
168	E	89%	84%
172	L	94%	100%
173	S	100%	67%
177	K	6%	100%
188	E	6%	100%
191	T	24%	100%
192	E	6%	88%
193	N	53%	100%
196	Y	18%	100%

Exemplo 28. Redução de viscosidade por variantes de AmyS

- A redução de viscosidade de lotes diferentes de farinha de milho (saco A, C, E, G) por variantes de AmyS foi monitorada como descrito no Exemplo 6 e foi comparada à redução de viscosidade por Spezyme® Xtra (Genencor). Os resultados são mostrados na figura 32A e na Tabela 28-1.
- 5 Variantes de AmyS melhoradas no ensaio de viscosímetro podem ser identificadas por diversos critérios: viscosidade de pico reduzida, viscosidade final reduzida, ou uma dose de enzima decrescente necessária para produzir viscosidades de pico ou final similares em relação à dose necessária para a

enzima selvagem. Na Tabela 28-1, propriedades melhoradas de variantes de AmyS são mostradas em negrito.

TABELA 28-1: Redução de Viscosidade da Farinha de Milho por AmyS Variantes em comparação a Xtra				
		dose (ug)	pico de viscosidade	viscosidade final
Farinha de Milho saco A	Xtra (UFC)	30,0	20610	4850
	I181A	27,5	16930	13140
	I181P	27,5	17320	13910
		dose (ug)	pico de viscosidade	viscosidade final
Farinha de Milho saco C	Xtra	30,0	10870	3033
	I181C	30,0	11810	1280
	I181E	30,0	10800	1200
	I181Y	30,0	8990	2495
	S242A	30,0	10770	740
	S242Q	30,0	8220	440
		dose (ug)	pico de viscosidade	viscosidade final
Farinha de Milho saco E	Xtra	15,0	18890	2830
	S242A	15,0	17300	1165
	S242E	15,0	18640	1345
	S242Q	15,0	20490	1800
		dose (ug)	pico de viscosidade	viscosidade final
Farinha de Milho saco G	Xtra	20,0	26300	13100
	S242Q	20,0	20433	3660
	G132A	20,0	18400	10800
	N193Y	20,0	28900	11500
	E188P	20,0	24000	6950

Exemplo 29. Redução de viscosidade por variantes de AmyS na presença de fitase

5 A redução de viscosidade da farinha de milho por AmyS N193Y foi monitorada com e sem adição de Fitase BP111 como descrito no Exemplo 6 com as seguintes modificações. O efeito da redução de viscosidade foi medido em pH 5,2, pH 5,5 e 5,8. Os resultados são mostrados na figura 32B e C. A adição de Fitase (BP111) a AmyS N193Y traz melhoras significantes à capacidade da variante de reduzir viscosidade no Viscômetro.

10 Todas publicações e patentes acima mencionadas são neste pedido incorporadas por referência. Várias modificações e variações dos métodos e sistema descritos da invenção serão evidentes para os versados na técnica sem se afastar do escopo e do espírito da invenção. Embora a invenção tenha sido descrita em conexão com modalidades preferenciais específicas, deve ser entendido que a invenção como reivindicada não deve
15 ser indevidamente limitada a tais modalidades específicas. De fato, várias modificações dos modos descritos para realização da invenção que são óbvias para aqueles versados na técnica são destinadas a estar dentro do escopo das seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÃO

1. Polipeptídeo variante tendo atividade de α -amilase e pelo menos uma característica alterada que melhora o desempenho enzimático, caracterizado pelo fato de que compreende uma sequência de aminoácidos tendo pelo menos 99% idêntica ao polipeptídeo α -amilase parental de SEQ ID NO: 2, e possui uma substituição E188P que introduz um resíduo de prolina na posição correspondendo à posição 188 de SEQ ID NO: 1, em que o referido polipeptídeo variante apresenta redução de viscosidade aumentada em um ensaio de liquefação de amido em comparação com o polipeptídeo α -amilase parental de SEQ ID NO: 2, e em que o referido polipeptídeo variante não possui a sequência de aminoácidos dos aminoácidos 487-515 de SEQ ID NO:1.

	1	50
SEQID No 1	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG
SEQID No 2	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG
SEQID No 3	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG
SEQID No 4	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG
SEQID No 5	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG
SEQID No 6	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLKSKGITAVWIIPPAWK
SEQID No 7	(1)	--ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWKRLQNDASAYLAEHGITAVWIIPPAWK
SEQID No 8	(1)	--ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWKRLQNDASAYLAEHGITAVWIIPPAWK
SEQID No 9	(1)	----VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWKRLQNDAEHLSDIGITAVWIIPPAWK
SEQID No 10	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLKSKGITAVWIIPPAWK
SEQID No 11	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLKSKGITAVWIIPPAWK
SEQID No 12	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLKSKGITAVWIIPPAWK
SEQID No 13	(1)	--DGLNGTMMQYFEWYHLENDGQHWKRLHDDAAALSDAGITAIWIIPPAWK
SEQID No 14	(1)	--DGLNGTMMQYFEWYHLENDGQHWKRLHDDAEALSNAGITAIWIIPPAWK
SEQID No 15	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG
Consenso	(1)	A NGTMMQYFEWYLPNDGQHW RL NDA NLSS GITALWIIPPAWK
	51	100
SEQID No 1	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 2	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 3	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 4	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 5	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 6	(51)	ASQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 7	(49)	TSQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 8	(49)	TSQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 9	(47)	LSQSDNGYGPYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 10	(51)	ASQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 11	(51)	TSQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 12	(51)	TSQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 13	(49)	NSQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 14	(49)	NSQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
SEQID No 15	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY
Consenso	(51)	TSQSDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYL AI ALHA GIQVY
	101	150
SEQID No 1	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 2	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 3	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 4	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 5	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 6	(101)	GDVVMNHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 7	(99)	GDVVMNHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 8	(99)	GDVVMNHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 9	(97)	GDVVMNHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 10	(101)	GDVVMNHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 11	(101)	GDVVMNHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 12	(101)	GDVVMNHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 13	(99)	GDVVMNHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 14	(99)	GDVVMNHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
SEQID No 15	(100)	ADVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN
Consenso	(101)	GDVVMNHKGGADGTE V AVEVNPSDRNQEISG Y I AWTKFDFPGRGN

Fig 1

		151	200
SEQID No 1	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY	
SEQID No 2	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY	
SEQID No 3	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY	
SEQID No 4	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY	
SEQID No 5	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY	
SEQID No 6	(151)	THSSFKWRWYHFDGVDWDQSRRLNNRIYKFRGHGKAWDWEVDTENGNYDY	
SEQID No 7	(149)	TYSDFKWHWYHFDGTDWDESRKLN-RIYKFQG--KAWDWEVSNENGNYDY	
SEQID No 8	(149)	TYSDFKWHWYHFDGTDWDESRKLN-RIYKFQG--KAWDWEVSNENGNYDY	
SEQID No 9	(147)	TYSDFKWHWYHFDGADWDESRKIS-RIFKFRGEGKAWDWEVSSENGNYDY	
SEQID No 10	(151)	THSNFKWRWYHFDGVDWDQSRKLNRIYKFRGDGKAWDWEVDTENGNYDY	
SEQID No 11	(151)	TYSDFKWRWYHFDGVDWDQSRQFQNRRIYKFRGDGKAWDWEVDSENGNYDY	
SEQID No 12	(151)	THSNFKWRWYHFDGTDWDQSRQLQNKIYKFRGTGKAWDWEVDIENGNYDY	
SEQID No 13	(149)	AYSDFKWRWFHFNQVDWDQRYQEN-HIFRFAN--TNWNWRVDEENGNYDY	
SEQID No 14	(149)	AYSDFKWRWFHFNQVDWDQRYQEN-HLFRFAN--TNWNWRVDEENGNYDY	
SEQID No 15	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRG--KAWDWEVDTFENGNYDY	
Consenso	(151)	TYS FKWRWYHFDGVDWDESRKLN RIYKFRG GKAWDWEVDTENGNYDY	
		201	250
SEQID No 1	(199)	LMYADLMDHPEVVTELKNWGKQYVNTTNIDGFRDLAVKHIFKFSFPDWL	
SEQID No 2	(199)	LMYADLMDHPEVVTELKNWGKQYVNTTNIDGFRDLAVKHIFKFSFPDWL	
SEQID No 3	(199)	LMYADLMDHPEVVTELKNWGKQYVNTTNIDGFRDLAVKHIFKFAFPDWL	
SEQID No 4	(199)	LMYADLMDHPEVVTELKNWGKQYVNTTNIDGFRDLAVKHIFKQFPDWL	
SEQID No 5	(199)	LMYADLMDHPEVVTELKNWGKQYVNTTNIDGFRDLAVKHIFKFEFPDWL	
SEQID No 6	(201)	LMYADIDMDHPEVVNELRNWGVYNTNLGLDGFRLDAVKHIKYSFTRDWI	
SEQID No 7	(196)	LMYADIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWV	
SEQID No 8	(196)	LMYADIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWV	
SEQID No 9	(196)	LMYADVDYDHPDVAAETKKWGIWYANELSLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWV	
SEQID No 10	(201)	LMYADIDMDHPEVVNELRNWGVYNTNLGLDGFRLDAVKHIKYSFTRDWI	
SEQID No 11	(201)	LMYADVMDHPEVVNELRRWGEWYNTNLNLDGFRLDAVKHIKYSFTRDWL	
SEQID No 12	(201)	LMYADIDMDHPEVINELRNWGVYNTNLNLDGFRLDAVKHIKYSFTRDWL	
SEQID No 13	(196)	LLGSNIDFSHPEVQDELKDWSWFTDELDLDGYRLDAIKHIPFWYTSWV	
SEQID No 14	(196)	LLGSNIDFSHPEVQDELKDWSWFTDELDLDGYRLDAIKHIPFWYTSWV	
SEQID No 15	(197)	LMYADLMDHPEVVTELKNWGKQYVNTTNIDGFRDLAVKHIFKFSFPDWL	
Consenso	(201)	LMYADIDMDHPEVV ELKNWG WY NTLNLDGFRLDAVKHIKFSF DWL	
		251	300
SEQID No 1	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA	
SEQID No 2	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA	
SEQID No 3	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA	
SEQID No 4	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA	
SEQID No 5	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA	
SEQID No 6	(251)	NHVRSATGKNMFVAEAFWKNDLGAENYLQKTNNHNSVFDVPLHYNLYNA	
SEQID No 7	(246)	NHVREKTGKEMFTVAEYQNDLGALENYLKNTNFNHSVFDVPLHYQFHAA	
SEQID No 8	(246)	NHVREKTGKEMFTVAEYQNDLGALENYLKNTNFNHSVFDVPLHYQFHAA	
SEQID No 9	(246)	QAVRQATGKEMFTVAEYQNNAGKLENYLKNTSFNQSVFDVPLHFNQAA	
SEQID No 10	(251)	NHVRSATGKNMFVAEAFWKNDLGAENYLKNTNNHNSVFDVPLHYNLYNA	
SEQID No 11	(251)	THVRNATGKNMFVAEAFWKNDLGALENYLKNTNNHNSVFDVPLHYNLYNA	
SEQID No 12	(251)	THVRNTTGKPMFAEAFWKNDLAAIENYLKNTSWNHSVFDVPLHYNLYNA	
SEQID No 13	(246)	RHQRNEADQDLFVVGGEYWKDDVGALEFYLDENWEMSLFDVPLNIFYRA	
SEQID No 14	(246)	RHQRSEADQDLFVVGGEYWKDDVGALEFYLDENWEMSLFDVPLNIFYRA	
SEQID No 15	(247)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA	
Consenso	(251)	SHVRS TKG LFTVGEYW DIGALENYL KTNW MSLFDVPLHYNFY A	

Fig 1 (cont.)

		301	350
SEQID No 1	(299)	SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP	
SEQID No 2	(299)	SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP	
SEQID No 3	(299)	SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP	
SEQID No 4	(299)	SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP	
SEQID No 5	(299)	SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP	
SEQID No 6	(301)	SKSGGNYDMRNIFNGTVVQRHPSHAVTFVDNHDSPPEEALESFVEEWFKP	
SEQID No 7	(296)	STQGGGYDMRKLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTPQGQSLESTVQTWFKP	
SEQID No 8	(296)	STQGGGYDMRKLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTPQGQSLESTVQTWFKP	
SEQID No 9	(296)	SSQGGGYDMRRLDGTVVSRHPEKAVTFVENHDTQPGQSLESTVQTWFKP	
SEQID No 10	(301)	SKSGGNYDMRQIFNGTVVQRHPMAVTFVDNHDSPPEEALESFVEEWFKP	
SEQID No 11	(301)	SNSGGNYDMAKLLNGTVVQKHPMAVTFVDNHDSPGESLESFVQEWFKP	
SEQID No 12	(301)	SNSGGYFDMRNILNGSVVQKHPMAVTFVDNHDSPGEALESFVQSWFKP	
SEQID No 13	(296)	SQQGGSYDMRNILRGSLSVEAHPMAVTFVDNHDTPGESLESVADWFKP	
SEQID No 14	(296)	SKQGGSYDMRNILRGSLSVEAHPMAVTFVDNHDTPGESLESVADWFKP	
SEQID No 15	(297)	SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP	
Consenso	(301)	SKSGGAYDMR LL GTLV HP AVTFVDNHDTPGQALESWVD WFKP	
		351	400
SEQID No 1	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
SEQID No 2	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
SEQID No 3	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
SEQID No 4	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
SEQID No 5	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
SEQID No 6	(351)	LAYALTTLTREQGYPSVFYGDYYGIPTHG---VPAMRSKIDPILEARQKYA	
SEQID No 7	(346)	LAYAFILTRESGYPQVFYGDYMGTKGDSQREIPALKHKIEPILKARKQYA	
SEQID No 8	(346)	LAYAFILTRESGYPQVFYGDYMGTKGDSQREIPALKHKIEPILKARKQYA	
SEQID No 9	(346)	LAYAFILTRESGYPQVFYGDYMGTKGTSPKEIPSLKDNIEPILKARKEYA	
SEQID No 10	(351)	LAYALTTLTREQGYPSVFYGDYYGIPTHG---VPAMRSKIDPILEARQKYA	
SEQID No 11	(351)	LAYALILTREQGYPSVFYGDYYGIPTHS---VPAMKAKIDPILEARQNYA	
SEQID No 12	(351)	LAYALILTREQGYPSVFYGDYYGIPTHG---VPSMKSIDPLLQARQTYA	
SEQID No 13	(346)	LAYATILTREGGYPNVFYGDYYGIPNDN---ISAKKDMIDELLDARQNYA	
SEQID No 14	(346)	LAYATILTREGGYPNVFYGDYYGIPNDN---ISAKKDMIDELLDARQNYA	
SEQID No 15	(347)	LAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYN---IPSLKSKIDPLLIARRDYA	
Consenso	(351)	LAYAFILTRE GYP VFYGDYYGIPQYN IPSLKSKIDPLL ARR YA	
		401	450
SEQID No 1	(396)	YGTQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHA	
SEQID No 2	(396)	YGTQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHA	
SEQID No 3	(396)	YGTQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHA	
SEQID No 4	(396)	YGTQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHA	
SEQID No 5	(396)	YGTQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHA	
SEQID No 6	(398)	YKGQNDYLDHSDIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGAGGSKWMFVGRNKA	
SEQID No 7	(396)	YGAQHDFDHHDIVGWTRREGDSSVANSGLAALITDGPGGAKRMYVGRQNA	
SEQID No 8	(396)	YGAQHDFDHHDIVGWTRREGDSSVANSGLAALITDGPGGAKRMYVGRQNA	
SEQID No 9	(396)	YGPQHDYIDHPDVIGWTREGDSSAAKSGLAALITDGPGGSKRMYAGLKNA	
SEQID No 10	(398)	YGRQNDYLDHSDIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGAGGNKWMFVGRNKA	
SEQID No 11	(398)	YGTQHDYFDHSDIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGPGGKWMYVGRQNA	
SEQID No 12	(398)	YGTQHDYFDHSDIIGWTREGDSSHPNSGLATIMSDGPGGNKWMYVGRQNA	
SEQID No 13	(393)	YGTQHDYFDHSDIIGWTREGSSSRPNSGLATIMSDGPGGSKWMYVGRQNA	
SEQID No 14	(393)	YGTQHDYFDHSDIIGWTREGTSSSRPNSGLATIMSDGPGGSKWMYVGRQNA	
SEQID No 15	(394)	YGTQHDYLDHSDIIGWTREGGTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHA	
Consenso	(401)	YGTQHDYLDH DIIGWTREG TSKPNSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQ A	

Fig 1 (cont.)

		451	500
SEQID No 1	(446)	GKVFYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVWVPRKTTVSTIARPIT	
SEQID No 2	(446)	GKVFYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVWVPRKTT-----	
SEQID No 3	(446)	GKVFYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVWVPRKTTVSTIARPIT	
SEQID No 4	(446)	GKVFYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVWVPRKTTVSTIARPIT	
SEQID No 5	(446)	GKVFYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVWVPRKTTVSTIARPIT	
SEQID No 6	(448)	GQVWSDITGNRTGTVTINADGWGNFSVNGGSVSIWVNK-----	
SEQID No 7	(446)	GETWHDITGNRSEPVTINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR-----	
SEQID No 8	(446)	GETWHDITGNRSEPVTINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR-----	
SEQID No 9	(446)	GETWYDITGNRSDTVKIGSDGWGEFHVNDGSVSIYVQK-----	
SEQID No 10	(448)	GQVWTDITGNRAGTVTINADGWGNFSVNGGSVSIWVNK-----	
SEQID No 11	(448)	GQVWHDITGNKPGTVTINADGWANFSVNGGSVSIWVKR-----	
SEQID No 12	(448)	GQVWRDITGNRSGTVTINADGWGNFTVNGGAVSVVVKQ-----	
SEQID No 13	(443)	GQTWTDLTGNNGASVTINGDGWGEFFTNNGGSVSVYVNO-----	
SEQID No 14	(443)	GQTWTDLTGNHAASVTINGDGWGEFFTNNGGSVSVYVNO-----	
SEQID No 15	(444)	GKVFYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVWVPRKTTVS-----	
Consenso	(451)	G VVYDLTGNRSDTVTINSDGWGEF VNGGSVSVVW R	
		501	520
SEQID No 1	(496)	TRPWTGEFVRWTEPRLVAVP	
SEQID No 2	(487)	-----	
SEQID No 3	(496)	TRPWTGEFVRWTEPRLVAVP	
SEQID No 4	(496)	TRPWTGEFVRWTEPRLVAVP	
SEQID No 5	(496)	TRPWTGEFVRWTEPRLVAVP	
SEQID No 6	(486)	-----	
SEQID No 7	(484)	-----	
SEQID No 8	(484)	-----	
SEQID No 9	(484)	-----	
SEQID No 10	(486)	-----	
SEQID No 11	(486)	-----	
SEQID No 12	(486)	-----	
SEQID No 13	(481)	-----	
SEQID No 14	(481)	-----	
SEQID No 15	(487)	-----	
Consenso	(501)		

Fig 1 (cont.)

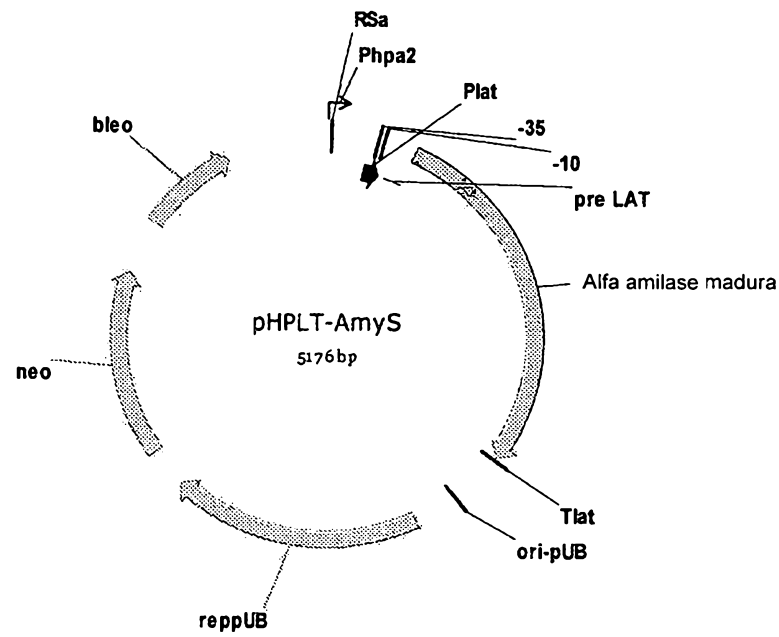


Fig 2

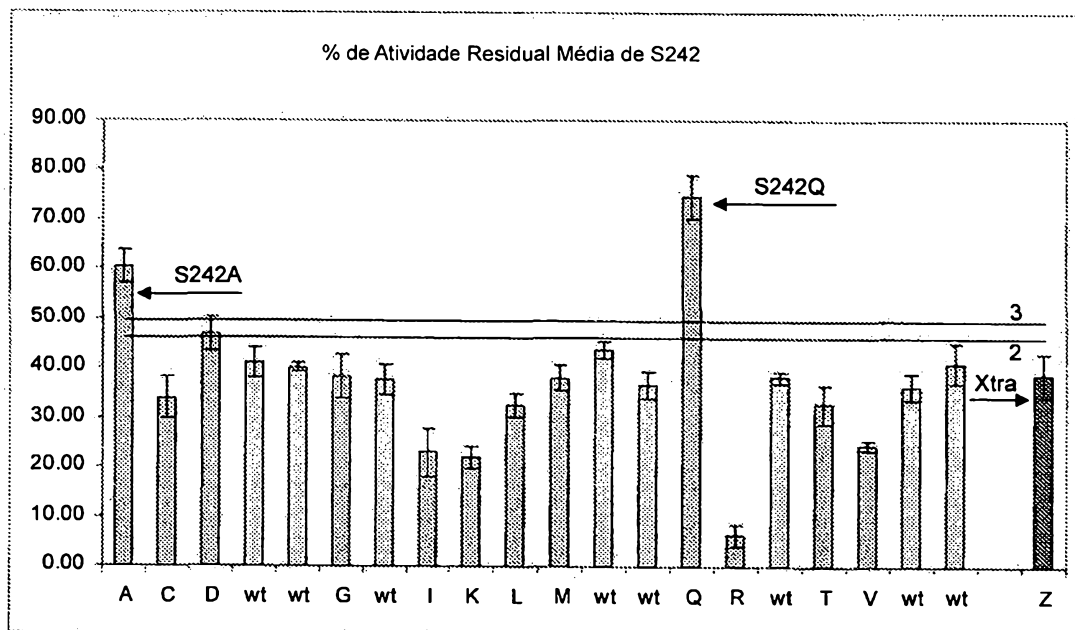


Fig 3

		1	50
SEQID No 1	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG	
SEQID No 6	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLNSDASNLSKSGITAVWIPPAWKG	
Consenso	(1)	NGTMMQYFEWYLP DG W KL DA NL S GITALWIPPAWKG	
		51	100
SEQID No 1	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY	
SEQID No 6	(51)	ASQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRSGLQAAVTSKNGIQVY	
Consenso	(51)	S DVGYG YDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQ AI A GIQVY	
		101	150
SEQID No 1	(100)	ADVVDHKGADGTEWVDAVEVNPSPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
SEQID No 6	(101)	GDVVMNHKGADATEMVRRAVEVNPNNRNQEVTEGYTIEAWTRFDPPGRGN	
Consenso	(101)	ADVV HKGGADATE V AVEVNP RNQEISG Y I AWTKFDFPGRGN	
		151	200
SEQID No 1	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY	
SEQID No 6	(151)	THSSFKWRWYHFDGVDWDQSRRLNNRIYKFRGHGKAWDWEVDTENGNYDY	
Consenso	(151)	THSSFKWRWYHFDGVDWD SRKL RIYKFRG GKAWDWEVDTENGNYDY	
		201	250
SEQID No 1	(199)	LMYADLMDHPEVVTTELKNWGKYYVNTTNIDGFRDLAVKHIFSFDPDWL	
SEQID No 6	(201)	LMYADIDMDHPEVNVNLRNKGWYVNTNLGLDGFRIIDAVKHIFSFTRDWI	
Consenso	(201)	LMYADIDMDHPEVV ELKNWG WY NT IDGFRIDAVKHIFSF DWI	
		251	300
SEQID No 1	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA	
SEQID No 6	(251)	NHVRSATGKNMFAVAEFWKNDLGAENYLGKTNWNHVSFVPLHYNLYNA	
Consenso	(251)	HVRS TGK LF VAEFW DI I NYI KTN SLFD PLH Y A	
		301	350
SEQID No 1	(299)	SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP	
SEQID No 6	(301)	SKSGGNYDMRNIFNGTVVQRHPSHAVTFVDNHDSPQEEALESFVEEWFKP	
Consenso	(301)	SKSGG FDMR I TLM PS AVTFVDNHD S P AL SFVD WFKP	
		351	400
SEQID No 1	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPLSKSKIDPLLIARRDYAYGT	
SEQID No 6	(351)	LAYALTTLTREQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPAMRSKIDPILEARQKYAYGK	
Consenso	(351)	LAYA LTR GYP VFYGDYYGIP H IPALKSKIDPIL AR YAYG	
		401	450
SEQID No 1	(399)	QHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKQHAGKV	
SEQID No 6	(401)	QNDYLDHNNIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGAGGSKWYVVGKQAGQV	
Consenso	(401)	Q DYLDH IIGWTREG T P SGLA IISDG GGSKWYVVGK AG V	
		451	500
SEQID No 1	(449)	FYDLTGNRSDTVTINSBGWGEFKVNGGSSVSVVPRKTTVSTIARPIITRP	
SEQID No 6	(451)	WSDITGNRTGTVTINADGWGNFSVNGGSSVSIWVK-----	
Consenso	(451)	F DITGNRS TVTINADGWG F VNGGSSVSIWV K	
		501	517
SEQID No 1	(499)	WTGEFVRWTEPRLVAWP	
SEQID No 6	(486)	-----	
Consenso	(501)		

Fig 4A

		1	50
SEQID No 1	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT	
SEQID No 8	(1)	-ANLNGTLMQYFEWYMPNDGQHWRRRLQND SAYLA EHGITAVWIPPAYKGT	
Consenso	(1)	A NGTLMQYFEWYLP DG W KL NDA LA GITALWIPPAYKGT	
		51	100
SEQID No 1	(51)	SRSDVG YGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGT KAQYLQAIQAAHAAGMQVYA	
SEQID No 8	(50)	SQADVGYGAYDLYDLGEFHQKGTVRTKYGT KGELQSAIKSLHSRDINVYG	
Consenso	(51)	S ADVGYG YDLYDLGEF QKGTVRTKYGT KA AI A HA INVYA	
		101	150
SEQID No 1	(101)	DVVFHDKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQA WTKFDFPGRGNT	
SEQID No 8	(100)	DVVINHKG GADATEDVTAVEVDPADRNRVISGEHLIKAWTHFHPGRGST	
Consenso	(101)	DVV HKGGADATE V AVEV PADRN ISG H I AWT F FPGRG T	
		151	200
SEQID No 1	(151)	YSSF KWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDYLM	
SEQID No 8	(150)	YSDFKWHWYHFDGTDWDESRKLNRIYKFQ--GKAWDWEVSNENGNYDYLM	
Consenso	(151)	YS FKW WYHFDG DWDESRKL RIYKF GKAWDWEV ENGNYDYLM	
		201	250
SEQID No 1	(201)	YADLMDHP EVVTELKNWGK WYVNTTNIDGFR L DAVKHIKFSFFPDWLSY	
SEQID No 8	(198)	YADIDYDHPDVAAEIKRWGTWYANELQLDGFRLDAVKHIKFSFLRDWVNH	
Consenso	(201)	YADID DHPDV EIK WG WY N NIDGFR L DAVKHIKFSF DWL H	
		251	300
SEQID No 1	(251)	VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFTASK	
SEQID No 8	(248)	VREKTGKEMFTVAEYWQNDLGALENYLNKTNFNH SVFDVPLHYQFHAAS T	
Consenso	(251)	VR TGK LFTVAEYW DI L NYI KTN SLFD PLH FH AS	
		301	350
SEQID No 1	(301)	SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLA	
SEQID No 8	(298)	QGGGYDMRKLLNGTVVSKHPLKSVTFVDNHDTPGQGSLESTVQTFWKPLA	
Consenso	(301)	GGAFDMR LL TLM P AVTFVDNHD T PGQAL S V WFKPLA	
		351	400
SEQID No 1	(351)	YAFILTRQEGYPCVFYGDY YGIP---QYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYG	
SEQID No 8	(348)	YAFILTRESGYPQVFYGD MYGTGKDSQREIPALKHKIEPILKARKQYAYG	
Consenso	(351)	YAFILTR GYP VFYGD YG Q IPALK KIDPIL ARK YAYG	
		401	450
SEQID No 1	(398)	TQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGP GSKWMYVGKQHAGK	
SEQID No 8	(398)	AQHDYFDHHDIVGWTREGDSSVANSGLAALITDGP GAKRMYVGRQNAGE	
Consenso	(401)	QHDY DH DIIGWTREG S SGLAALITDGP GAK MYVGKQ AG	
		451	500
SEQID No 1	(448)	VFYDLTG NRSDTVTINS DGWGEFKNVNGGSVSVWVPRKTTVSTIARPITR	
SEQID No 8	(448)	TWHDITGNRSEPVVINSEGWGEFHVNGGSVSIYVQR-----	
Consenso	(451)	FHDITGNRSD V INSDGWGEF VNGGSVSIWV R	
		501	518
SEQID No 1	(498)	PWTGEFVRWTEPRLV AWP	
SEQID No 8	(484)	-----	
Consenso	(501)		

Fig 4B

		1	50
SEQID No 1	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT	
SEQID No 9	(1)	---VNGTLMQYFEWYTPNDGQHWKRLQNDAEHLSDIGITAVWIPPAYKGL	
Consenso	(1)	NGTLMQYFEWY P DG W KL NDA LS IGITALWIPPAYKG	
		51	100
SEQID No 1	(51)	SRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKAYLQAIQAAHAAGMQVYA	
SEQID No 9	(48)	SQSDNGYGPYDLYDLGEFQQKGTVRTKYGTSELQDAIGSLHSRNVQVYG	
Consenso	(51)	S SD GYG YDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTKA AI A HA MQVYA	
		101	150
SEQID No 1	(101)	DVVFDPKGGADGTEWDAVEVNPSDRNQEISGTYQIAWTKFDFPGRGNT	
SEQID No 9	(98)	DVVLNHKAGADATEDVTAVEVNPANRNQETSEYQIKAWTDFRFPGRGNT	
Consenso	(101)	DVV HKAGADATE V AVEVNPA RNQE S YQI AWT F FPGRGNT	
		151	200
SEQID No 1	(151)	YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDILM	
SEQID No 9	(148)	YSDFKWHWYHFDGADWDESRKISRIFKFRGEGKAWDWEVSSENGNYDILM	
Consenso	(151)	YS FKW WYHFDG DWDESRKISRIFKFRG GKAWDWEV SENGNYDILM	
		201	250
SEQID No 1	(201)	YADLDMDHPEVVTELKNWGKYYVNTTNDIGFRIDAVKHIFKSFPPDWLSY	
SEQID No 9	(198)	YADVVDYDHPDVVAETKKWGIWYANELSLDGFRIDAAKHIFKSFRLRWVQA	
Consenso	(201)	YADLD DHPDVV E K WG WY N IDGFRIDA KHIFKSF DWL	
		251	300
SEQID No 1	(251)	VRSGTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFFYTASK	
SEQID No 9	(248)	VRQATGKEMFTVAEYQWNNAGKLENYLNKTSFNPQSVFVPLHFNLAASS	
Consenso	(251)	VR TGK LFTVAEYW KL NYI KT SLFD PLH AS	
		301	350
SEQID No 1	(301)	SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLA	
SEQID No 9	(298)	QGGGYDMRRLLDGTVVSRHPEKAVTFVENHDTQPGQSLESTVQTFWKPLA	
Consenso	(301)	GGAFDMR LL TLM P AVTFVDNHDTE PGQAL S V WFKPLA	
		351	400
SEQID No 1	(351)	YAFILTRQEGYPCVFYGDYYPQYN--IPSLKSKIDPLLIARRDYAYG	
SEQID No 9	(348)	YAFILTRESGYPCVFYGDYGTGKTSPEIPSLKDNIEPILKARKEYAYG	
Consenso	(351)	YAFILTR GYP VFYGD YG IPSLK IDPIL ARKDYAYG	
		401	450
SEQID No 1	(398)	TQHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKHAGK	
SEQID No 9	(398)	PQHDYIDHPDVIGWTREGDSSAAKSGLAALITDGPGGSKRMYAGLKNAGE	
Consenso	(401)	QHDYIDH DIIGWTREG S SGLAALITDGPGGSK MY G AG	
		451	500
SEQID No 1	(448)	VFYDLTGNRSDTVTINSDBGWGEFVNGGSVSVVWVPRKTTVSTIARPIITR	
SEQID No 9	(448)	TWYDITGNRSDTVKIGSDGWGEFHVNDGSVSIYVQK-----	
Consenso	(451)	FYDITGNRSDTV I SDGWGEF VN GSVSIWV K	
		501	518
SEQID No 1	(498)	PWTGEFVRWTEPRLVAWP	
SEQID No 9	(484)	-----	
Consenso	(501)		

Fig 4C

		1	50
SEQID No 1	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG	
SEQID No 10	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWYLPNDGNHWNRLRSDASNLKDKGISAVWIPPAWKG	
Consenso	(1)	NGTMMQYFEWYLP DG W KL DA NL GISALWIPPAWKG	
		51	100
SEQID No 1	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKAYLQAIQAAHAAGMQVY	
SEQID No 10	(51)	ASQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTIRTXYGTRNQLQAAVNALKSNGIQVY	
Consenso	(51)	S DVGYG YDLYDLGEFNQKGTIRTXYGTK Q AINA A GIQVY	
		101	150
SEQID No 1	(100)	ADVVDHKGADGTEWVDAVEVNPSPDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
SEQID No 10	(101)	GDVVMNHKGGADATEMVRAVEVNPNNRNQEVSGEYITIEAWTKFDFPGRGN	
Consenso	(101)	ADV V HKGGADATE V AVEVNP RNQEISG Y I AWTKFDFPGRGN	
		151	200
SEQID No 1	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESRLKS-RIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDY	
SEQID No 10	(151)	THSNFKWRWYHFDGVDWDQSRKLNRIYKFRGDGKAWDWEVDTEGNYDY	
Consenso	(151)	THS FKWRWYHFDGVDWD SRKL RIYKFRG GKAWDWEVDTEGNYDY	
		201	250
SEQID No 1	(199)	LMYADLMDHPEVVTELKNWGKVVNTTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWL	
SEQID No 10	(201)	LMYADIDMDHPEVVNELRNWGVWYNTLGLDGFRIDAVKHKYSFTRDWI	
Consenso	(201)	LMYADIDMDHPEVV ELKNWG WY NT IDGFRIDAVKHKFSF DWI	
		251	300
SEQID No 1	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA	
SEQID No 10	(251)	NHVRSATGKNMFAVAEFWKNDLGAENYLNKTNWNHVSFVDVPLHYNLYNA	
Consenso	(251)	HVRS TGK LF VAEFW DI I NYI KTN SLFD PLH Y A	
		301	350
SEQID No 1	(299)	SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP	
SEQID No 10	(301)	SKSGGNYDMRQIFNGTVVQRHPMAVTFVDNHDSPPEEALESFVEEWFKP	
Consenso	(301)	SKSGG FDMR I TLM P AVTFVDNHDS P AL SFVD WFKP	
		351	400
SEQID No 1	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGT	
SEQID No 10	(351)	LAYALTLTREQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPAKSKIDPILEARQKYAYGR	
Consenso	(351)	LAYA LTR GYP VFYGDYYGIP H IPALKSKIDPIL AR YAYG	
		401	450
SEQID No 1	(399)	QHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHAGKV	
SEQID No 10	(401)	QNDYLDHNNIIGWTREGNTAHPNSGLATIMSDGAGGNKWMFVGRNKAGQV	
Consenso	(401)	Q DYLDH IIGWTREG T P SGLA IISDG GG KWMFVGKN AG V	
		451	500
SEQID No 1	(449)	FYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGVSWSVWVPRKTTVSTIARPIITRP	
SEQID No 10	(451)	WTDITGNRAGTVTINADGWGNFSVNGGVSWSIWNK-----	
Consenso	(451)	F DITGNRA TVTINADGWG F VNGGVSWSIWN K	
		501	517
SEQID No 1	(499)	WTGEFVRWTEPRLVAVP	
SEQID No 10	(486)	-----	
Consenso	(501)		

Fig 4D

	1	50
SEQID No 1	(1) -AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG	
SEQID No 11	(1) HHNGTNGTMMQYFEWHLPNDBGNHWNRLRDDASNLRNRGITAIWIIPPAWKG	
Consenso	(1) NGTMMQYFEWHL P DG W KL DA NL GITAIWIIPPAWKG	
	51	100
SEQID No 1	(50) TSRSVDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVY	
SEQID No 11	(51) TSQNDVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTRSQLESIAHALKNNGVQVY	
Consenso	(51) TS DVGYG YDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQ AI A GMQVY	
	101	150
SEQID No 1	(100) ADVVFDHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
SEQID No 11	(101) GDVVMNHKGGADATENVLAVEVNPNNRNQEISGDYIEAWTKFDFPGRGN	
Consenso	(101) ADVV HKGGADATE V AVEVNP RNQEISG Y I AWTKFDFPGRGN	
	151	200
SEQID No 1	(150) TYSSFKWRWYHFDGVDWDESR-KLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY	
SEQID No 11	(151) TYSDFKWRWYHFDGVDWDQSRQFQNRITYKFRGDGKAWDWEVDSENGNYDY	
Consenso	(151) TYS FKWRWYHFDGVDWD SR RIYKFRG KAWDWEVDSENGNYDY	
	201	250
SEQID No 1	(199) LMYADLMDHPEVVTELKNWGKQVYVNTTNIDGFRDLAVKHKIFSFPPDWL	
SEQID No 11	(201) LMYADVMDHPEVVNELRRWGEWYTNLTNLNLDGFRIDAVKHKIKYSFTRDWL	
Consenso	(201) LMYADLMDHPEVV ELK WG WY NT NIDGFRIDAVKHKIFSF DWL	
	251	300
SEQID No 1	(249) SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA	
SEQID No 11	(251) THVRNATGKEMFAVAEFWKNDLGALENYLNKTNWNHVSFVDVPLHYNLYNA	
Consenso	(251) SHVR TGK LF VAEFW DI L NYI KTN SLFD PLH Y A	
	301	350
SEQID No 1	(299) SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP	
SEQID No 11	(301) SNSGGNYDMAKLLNGTVVQKHPMAVTFVDNHDSDPGESLESFVQEWFKP	
Consenso	(301) S SGG FDM LL TLM P AVTFVDNHDSD PG AL SFV WFKP	
	351	400
SEQID No 1	(349) LAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGT	
SEQID No 11	(351) LAYALILTREQGYPSVFYGDYYGIPTHSVPAKAKIDPILEARQNFAYGT	
Consenso	(351) LAYA ILTR GYP VFYGDYYGIP H IPALKAKIDPIL AR FAYGT	
	401	450
SEQID No 1	(399) QHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHAGKV	
SEQID No 11	(401) QHDYFDHNNIIGWTREGNTTHPNISGLATIMSDGPGGEKWMYVGQNKAGQV	
Consenso	(401) QHDY DH IIGWTREG T P SGLA IISDGP GG KWMYVG N AG V	
	451	500
SEQID No 1	(449) FYDLTGNRSDTVTINS DGWGEFKVNGGSSVSVVPRKTTVSTIARPIITRP	
SEQID No 11	(451) WHDITGNKPGTVTINADGWANFSVNGGSSVSIWVKR-----	
Consenso	(451) FHDITGNK TVTINADGWA F VNGGSSVSIWV R	
	501	517
SEQID No 1	(499) WTGEFVRWTEPRLVAVP	
SEQID No 11	(486) -----	
Consenso	(501)	

Fig 4E

		1	50
SEQID No 1	(1)	-AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKG	
SEQID No 12	(1)	HHNGTNGTMMQYFEWHLPNDGNHWNRLRDDAANLKSKGITAVWIPPAWKG	
Consenso	(1)	NGTMMQYFEWHLP DG W KL DA NL S GITALWIPPAWKG	
		51	100
SEQID No 1	(50)	TSRSDVGYGVYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKYQLQAIQAAHAAGMQVY	
SEQID No 12	(51)	TSQNDVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTRSQLQGAVTSLKNNGIQVY	
Consenso	(51)	TS DVGYG YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKQ AI A GIQVY	
		101	150
SEQID No 1	(100)	ADVVDHKGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGN	
SEQID No 12	(101)	GDVVMNHKGADGTEWVNAVEVNRSNRNQEISGEYTIEAWTKFDFPGRGN	
Consenso	(101)	ADV V HKGGADGTE V AVEVN S RNQEISG Y I AWTKFDFPGRGN	
		151	200
SEQID No 1	(150)	TYSSFKWRWYHFDGVDWDESR-KLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDY	
SEQID No 12	(151)	THSNFKWRWYHFDGTDWQSRQLQNKIYKFRGTGKAWDWEVDIENGNYDY	
Consenso	(151)	THS FKWRWYHFDG DWD SR KIYKFRG GKAWDWEVD ENGNYDY	
		201	250
SEQID No 1	(199)	LMYADLMDHPEVVTTELKNWGKQVNTNIDGFRLDAVKHIKFSFFPDWL	
SEQID No 12	(201)	LMYADIDMDHPEVINELRNWGVWYNTNLDGFRIDAVKHIKYSYTRDWL	
Consenso	(201)	LMYADIDMDHPEVI ELKNWG WY NT NIDGFRIDAVKHIKFSF DWL	
		251	300
SEQID No 1	(249)	SYVRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTA	
SEQID No 12	(251)	THVRNTTGKPMFAVAEFWKNDLAAIENYLNKTSWNHVSFVDPVPLHYNLYNA	
Consenso	(251)	SHVR TGKPLF VAEFW DI I NYI KT SLFD PLH Y A	
		301	350
SEQID No 1	(299)	SKSGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKP	
SEQID No 12	(301)	SNSGGYFDMRNILNGSVVQKHPHIAVTFVDNHDSPGEALESFVQSWFKP	
Consenso	(301)	S SGG FDMR IL SLM P AVTFVDNHD S PG AL SFV WFKP	
		351	400
SEQID No 1	(349)	LAYAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGT	
SEQID No 12	(351)	LAYALILTREQGYPSVFYGDYYGIPTHGVPSMKSKIDPLLQARQTYAYGT	
Consenso	(351)	LAYA ILTR GYP VFYGDYYGIP H IPSLKSKIDPLL AR YAYGT	
		401	450
SEQID No 1	(399)	QHDYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGP GSKWMYVVGKHAGKV	
SEQID No 12	(401)	QHDYFDHSDIIGWTREGDSSHPNSGLATIMSDGPGGNKWMYVVGKHAGQV	
Consenso	(401)	QHDY DH DIIGWTREG S P SGLA IISDGP G K WMYVGK AG V	
		451	500
SEQID No 1	(449)	FYDLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVWPRKTTVSTIARPITTRP	
SEQID No 12	(451)	WRDITGNRSGTVTINADGWGNFTVNGGAVSVVWKQ-----	
Consenso	(451)	F DITGNRS TVTINADGWG F VNGGAVSVVW	
		501	517
SEQID No 1	(499)	WTGEFVRWTEPRLVAWP	
SEQID No 12	(486)	-----	
Consenso	(501)		

Fig 4F

	1	50
SEQID No 1	(1) AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT	
SEQID No 13	(1) -DGLNGTMMQYFEWHLNDGQHWNRHLHDDAAALSDAGITAIWIPPAYKGN	
Consenso	(1) NGTMMQYFEWHL DG W KL DA LS GITAIWIPPAYKG	
	51	100
SEQID No 1	(51) SRSDVGYGVDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVYA	
SEQID No 13	(50) SQADVGYGAYDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKQLERAIGSLKSNIDINVYG	
Consenso	(51) S ADVGYG YDLYDLGFEFNQKGTVRTKYGTAKQ AI A A INVYA	
	101	150
SEQID No 1	(101) DVVFDHKGAGDTEWVDAVEVNPSPDRNQEISGTQIQAWTKFDFPGRGNT	
SEQID No 13	(100) DVVMNHKMGADFTEAVQAVQVNPNTNRWQDISGAYTIDAWTGDFDSGRNNA	
Consenso	(101) DVV HK GAD TE V AV VNPS R QDISG Y I AWT FDF GR N	
	151	200
SEQID No 1	(151) YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTEGNYDYLM	
SEQID No 13	(150) YSDFKWRWFHFNQVDWDQRYQENHIFRFANTN--WNWRVDEENGNYDYLL	
Consenso	(151) YS FKWRWFH FVDWD IFKF W W VD ENGNYDYLL	
	201	250
SEQID No 1	(201) YADLDMDHPEVVTTELKNWGKQVNTTNIDGFRDLAVKHIFSFPPDWLSY	
SEQID No 13	(198) GSNIDFSHPEVQDELKDWGSWFTDELDDGYRLDAIKHIPFWYTSWVRH	
Consenso	(201) A ID HPEV ELK WG WF IDGFRDLAIKHI F F DWL H	
	251	300
SEQID No 1	(251) VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTASK	
SEQID No 13	(248) QRNEADQDLFVVGEYWKDDVGALEFYLDENWEMSLFDVPLNYNFYRASQ	
Consenso	(251) R LF VGEYW DI L YI N MSLFD PL FY AS	
	301	350
SEQID No 1	(301) SGGAFDMRTLMTNTILMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLA	
SEQID No 13	(298) QGGSYDMRNILRGSGLVEAHPMAVTFVDNHDTPGESLESWVADWFKPLA	
Consenso	(301) GGAFDMR IL SLM P AVTFVDNHDTPG AL SWV WFKPLA	
	351	400
SEQID No 1	(351) YAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQH	
SEQID No 13	(348) YATILTRREGGYPNVFYGDYYGIPNDNISAKKDMIDELLDARQNYAYGTQH	
Consenso	(351) YA ILTR GYP VFYGDYYGIPN NI A K ID LL AR YAYGTQH	
	401	450
SEQID No 1	(401) DYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHAGKVFY	
SEQID No 13	(398) DYFDHWDVVGWTRREGSSSRPNGLATIMSNPGGSKWMYVGRQNAQTWT	
Consenso	(401) DY DH DIIGWTREG S KP SGLA IIS GPGGSKWMYVGKQ AG F	
	451	500
SEQID No 1	(451) DLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVWVPRKTTVSTIARPIITRPWT	
SEQID No 13	(448) DLTGNNGASVTINGDGWGEFFTNNGGSVSVYVQNQ-----	
Consenso	(451) DLTGN SVTIN DGWGEF NGGSVSVWV	
	501	515
SEQID No 1	(501) GEFVRWTEPRLVAVP	
SEQID No 13	(481) -----	
Consenso	(501)	

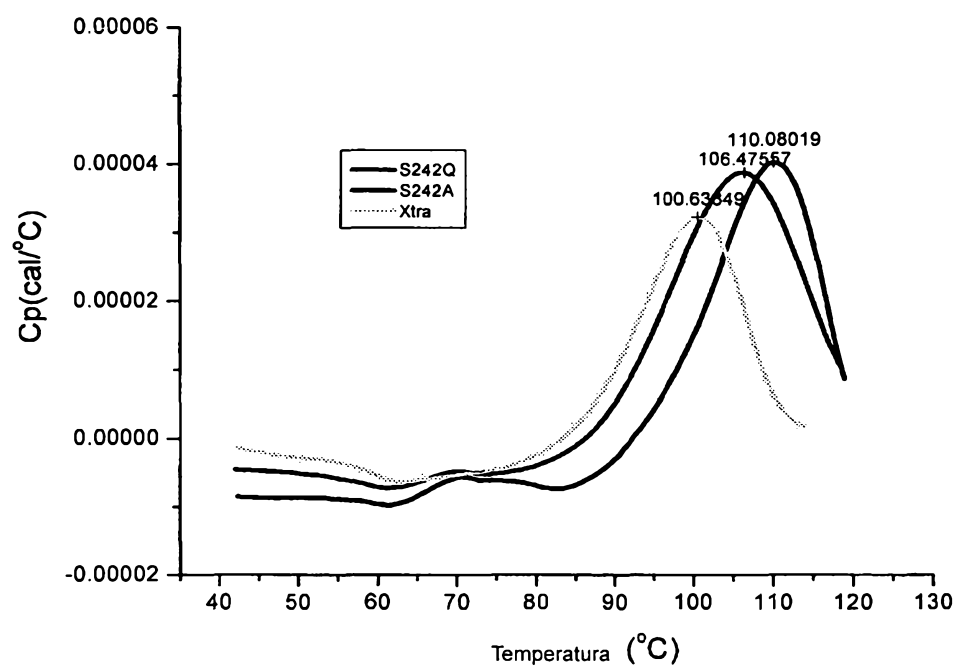
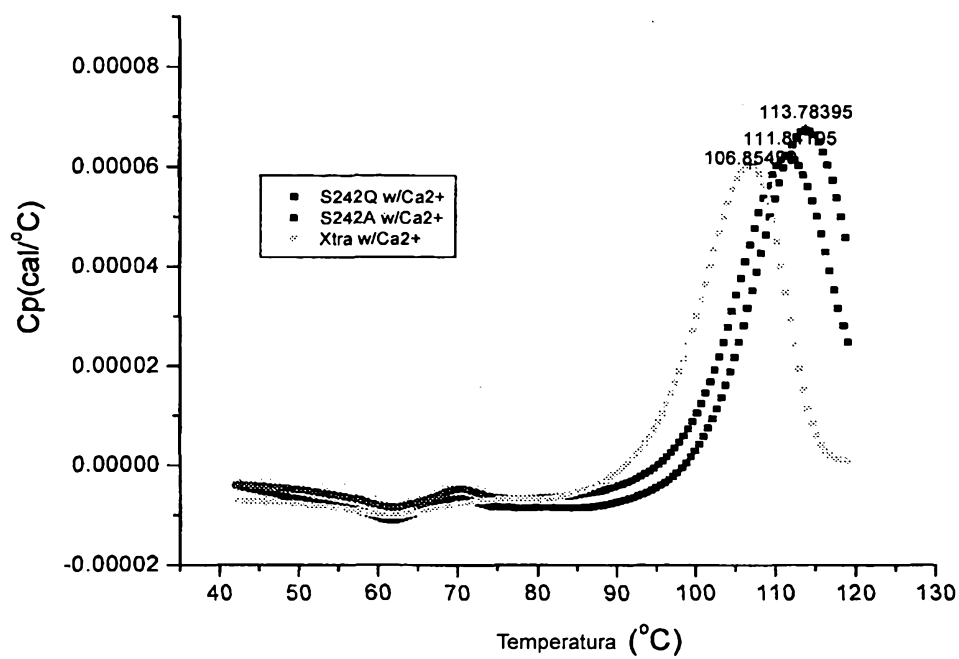
Fig 4G

		1	50
SEQID No 1	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT	
SEQID No 14	(1)	-DGLNGTMMQYFEWHLNDGQHWNRHLHDDAEALSNA GITAIWIPPAYKGN	
Consenso	(1)	NGTMMQYFEWHL DG W KL DA LS GITAIWIPPAYKG	
		51	100
SEQID No 1	(51)	SRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVYA	
SEQID No 14	(50)	SQADVGYGAYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQLERAIGSLKSNNDINVYG	
Consenso	(51)	S ADVGYG YDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQ AI A A INVYA	
		101	150
SEQID No 1	(101)	DVVFDPHKGGADGTEWVDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT	
SEQID No 14	(100)	DVVMNHKL GADFT EAVQAVQVNPSNRWQDISGVYTIDAWTGDFDFGRNNA	
Consenso	(101)	DVV HK GAD TE V AV VNPS R QDISG Y I AWT FDFPGR N	
		151	200
SEQID No 1	(151)	YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDYLM	
SEQID No 14	(150)	YSDFKWRWFHFNQVVDWQRYQENHLFRFANTN--WNWRVDEENGNYDYLL	
Consenso	(151)	YS FKWRWFH F GVDWD IFKF W W VD ENGN DYLL	
		201	250
SEQID No 1	(201)	YADLMDHPEVVTTELKNWGKYYVNTNIDGFRDLDAVKHIKFSFFPDWLSY	
SEQID No 14	(198)	GSNIDFSHPEVQEELKDWGSWFTDELDDLGYRLDAIKHIPFWYTSDWVRH	
Consenso	(201)	A ID HPEV ELK WG WF IDGFRDLDAIKHI F F DWL H	
		251	300
SEQID No 1	(251)	VRSQTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTASK	
SEQID No 14	(248)	QRSEADQDLFVVGEYWKDDVGALEFYLDENWEMSLFDVPLNPNFYRASK	
Consenso	(251)	RS LF VGEYW DI L YI N MSLFD PL FY ASK	
		301	350
SEQID No 1	(301)	SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWVDPWFKPLA	
SEQID No 14	(298)	QGGSYDMRNILRGLSLVEAHPHIAVTFVDNHDTPGESLESWVADWFKPLA	
Consenso	(301)	GGAFDMR IL SLM P AVTFVDNHD T PG AL SWV WFKPLA	
		351	400
SEQID No 1	(351)	YAFILTRQEGYPCVFYGDYYGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQH	
SEQID No 14	(348)	YATILTRREGGYPNVFYGDYYGIPNDNISAKKDMIDELLDARQNYAYGTQH	
Consenso	(351)	YA ILTR GYP VFYGDYYGIPN NI A K ID LL AR YAYGTQH	
		401	450
SEQID No 1	(401)	DYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWMYVGKQHAGKVFY	
SEQID No 14	(398)	DYFDHWDIVGWTRREGTSSRPNSGLATIMSNPGGGSKWMYVGQQHAGQWT	
Consenso	(401)	DY DH DIIGWTREG S KP SGLA IIS GPGGSKWMYVG QHAG F	
		451	500
SEQID No 1	(451)	DLTGNRSDTIVTINSDGWGEFKVNGGSSVSVWVPRKTTVSTIARPIITRPWT	
SEQID No 14	(448)	DLTGNHAASVTINGDGWGEFFTNNGGSSVSVYVYVQ-----	
Consenso	(451)	DLTGN A SVTIN DGWGEF NGGSSVSVWV	
		501	515
SEQID No 1	(501)	GEFVRWTEPRLVAWP	
SEQID No 14	(481)	-----	
Consenso	(501)		

Fig 4H

		1	50
SEQID No 1	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT	
SEQID No 15	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT	
Consenso	(1)	AAPFNGTMMQYFEWYLPDDGTLWTKVANEANNLSSLGITALWLPPAYKGT	
		51	100
SEQID No 1	(51)	SRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVYA	
SEQID No 15	(51)	SRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVYA	
Consenso	(51)	SRSDVGYGVYDLYDLGEFNQKGTVRTKYGTAKQYLQAIQAAHAAGMQVYA	
		101	150
SEQID No 1	(101)	DVVFDPHKGADGTEWDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT	
SEQID No 15	(101)	DVVFDPHKGADGTEWDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT	
Consenso	(101)	DVVFDPHKGADGTEWDAVEVNPSDRNQEISGTYQIQAWTKFDFPGRGNT	
		151	200
SEQID No 1	(151)	YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFRGIGKAWDWEVDTENGNYDYL	
SEQID No 15	(151)	YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFR--GKAWDWEVDTEFGNYDYL	
Consenso	(151)	YSSFKWRWYHFDGVDWDESRKLSRIYKFR GKAWDWEVDTE GNYDYL	
		201	250
SEQID No 1	(201)	YADLMDHPEVVTELKNWGKQVNTTNIDGFRDLAVKHIFKSFPPDWLSY	
SEQID No 15	(199)	YADLMDHPEVVTELKNWGKQVNTTNIDGFRDLAVKHIFKSFPPDWLSY	
Consenso	(201)	YADLMDHPEVVTELKNWGKQVNTTNIDGFRDLAVKHIFKSFPPDWLSY	
		251	300
SEQID No 1	(251)	VRSGTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTASK	
SEQID No 15	(249)	VRSGTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTASK	
Consenso	(251)	VRSGTGKPLFTVGEYWSYDINKLHNYITKTNGTMSLFDAPLHNKFYTASK	
		301	350
SEQID No 1	(301)	SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWDPWFKPLA	
SEQID No 15	(299)	SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWDPWFKPLA	
Consenso	(301)	SGGAFDMRTLMTNTLMKDQPTLAVTFVDNHDTEPGQALQSWDPWFKPLA	
		351	400
SEQID No 1	(351)	YAFILTRQEGYPCVFYGDYIGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQH	
SEQID No 15	(349)	YAFILTRQEGYPCVFYGDYIGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQH	
Consenso	(351)	YAFILTRQEGYPCVFYGDYIGIPQYNIPSLKSKIDPLLIARRDYAYGTQH	
		401	450
SEQID No 1	(401)	DYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKQHAGKVYF	
SEQID No 15	(399)	DYLDHSDIIGWTREGVTEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKQHAGKVYF	
Consenso	(401)	DYLDHSDIIGWTREG TEKPGSGLAALITDGPGGSKWYVVGKQHAGKVYF	
		451	500
SEQID No 1	(451)	DLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVPRKTTVSTIARPIITRPWT	
SEQID No 15	(449)	DLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVPRKTTVS-----	
Consenso	(451)	DLTGNRSDTVTINSDGWGEFKVNGGSVSVVPRKTTVS	
		501	515
SEQID No 1	(501)	GEFVRWTEPRLVAP	
SEQID No 15	(487)	-----	
Consenso	(501)		

Fig 41

**Fig 5****Fig 6**

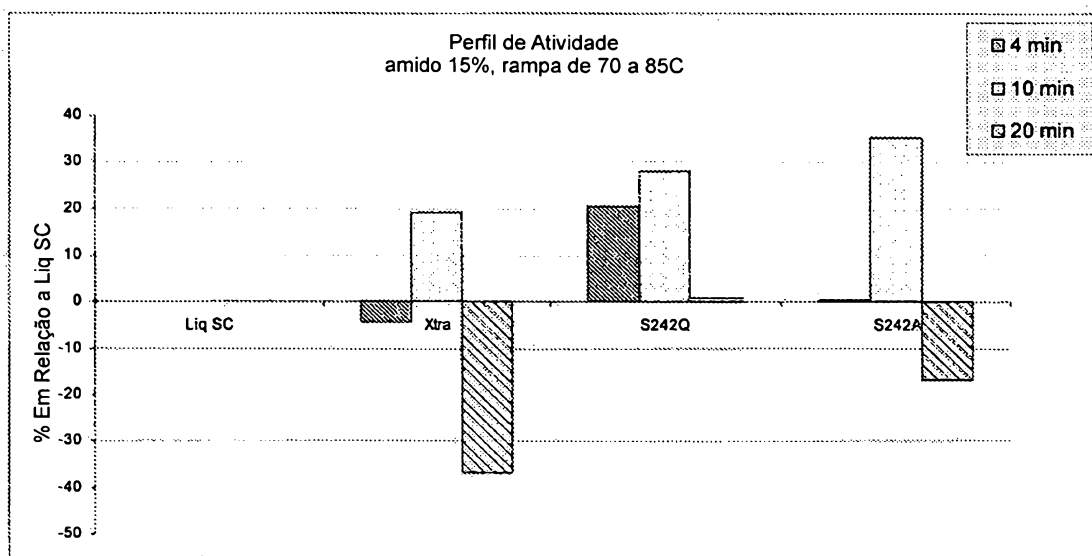


Fig 7

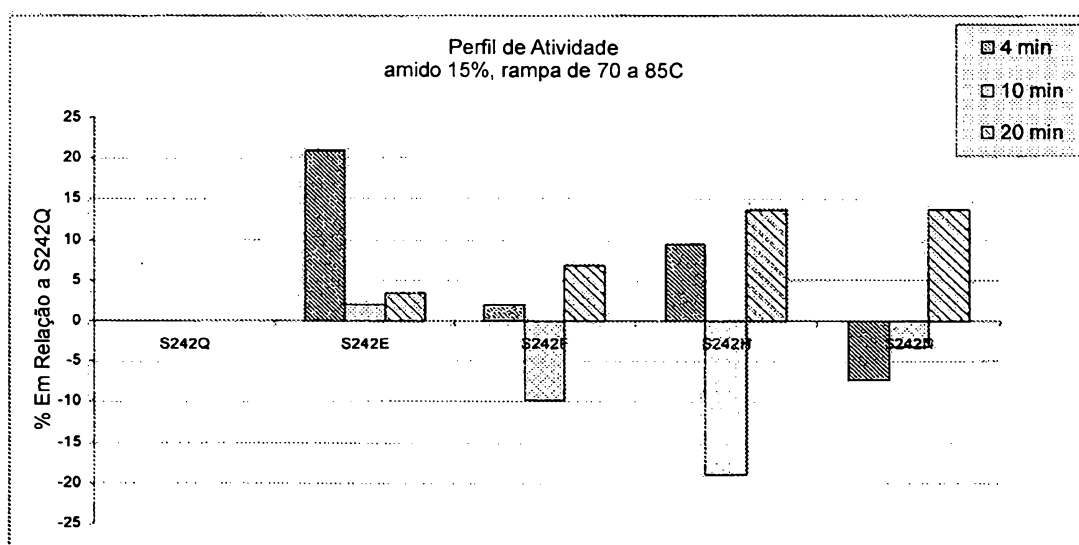


Fig 8

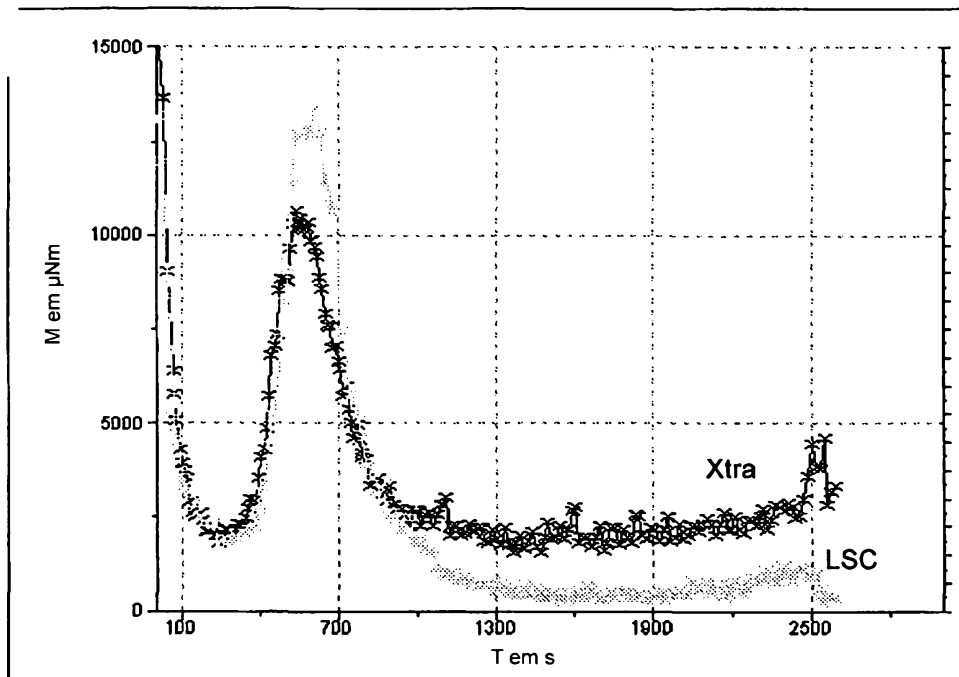


Fig 9

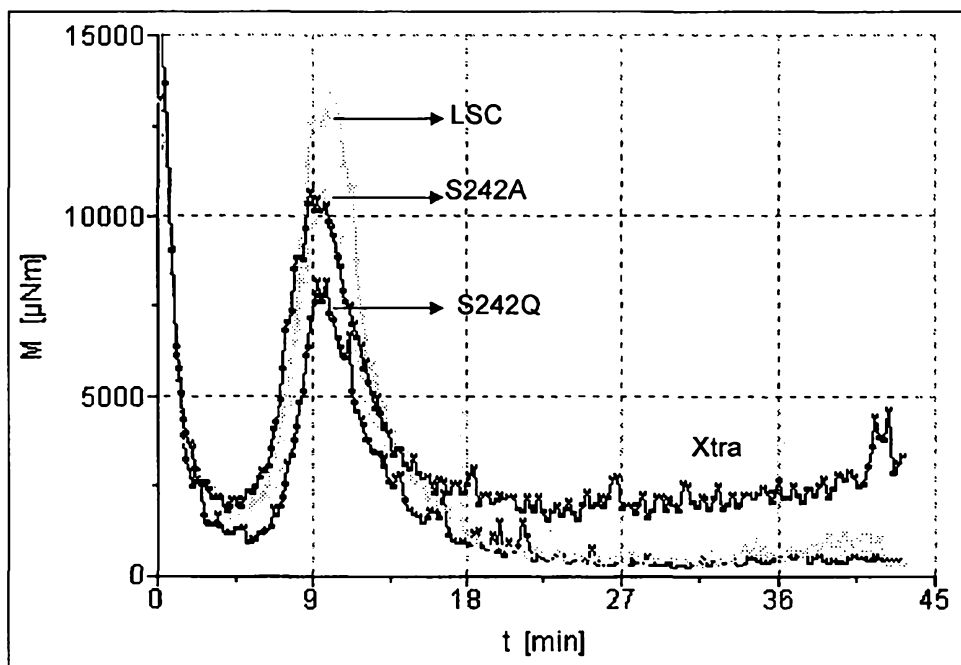


Fig 10

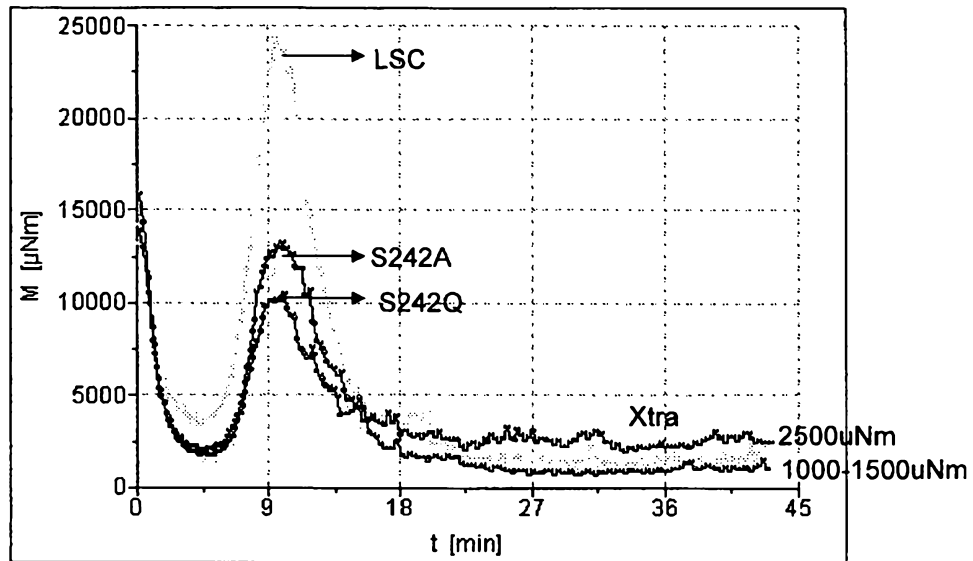


Fig 11

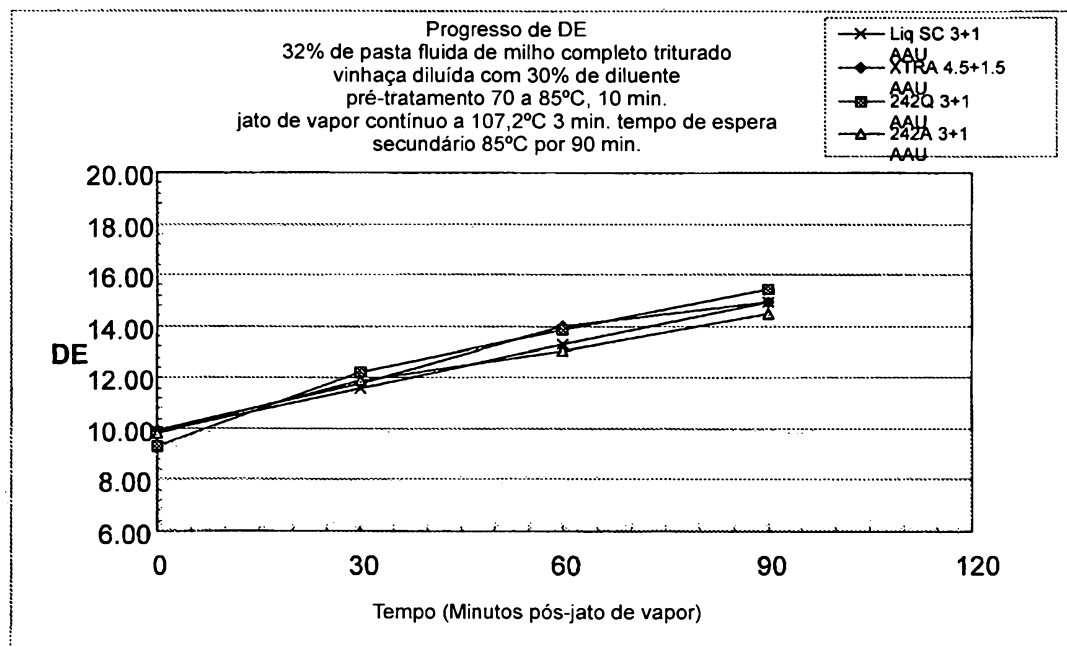


Fig 12

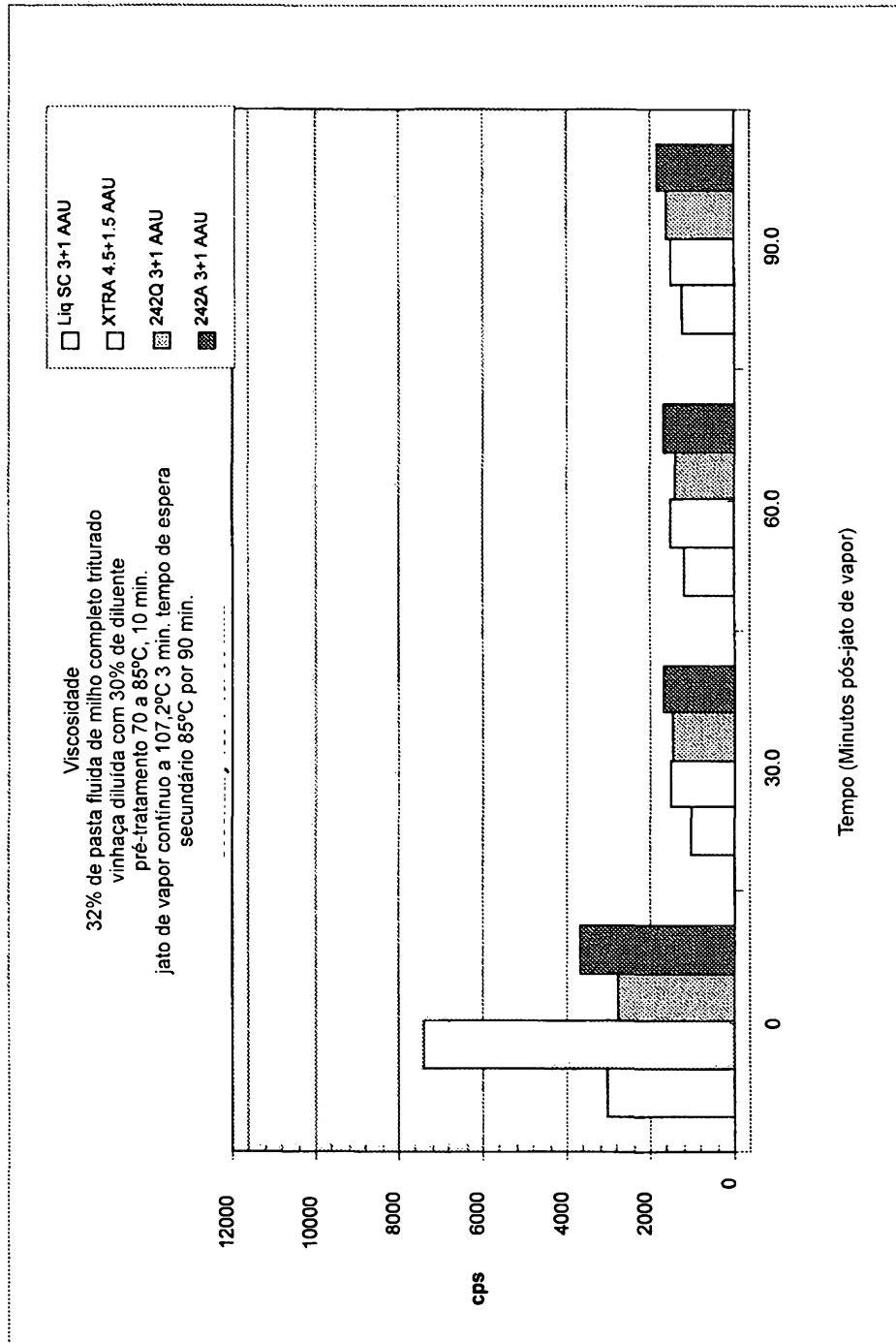
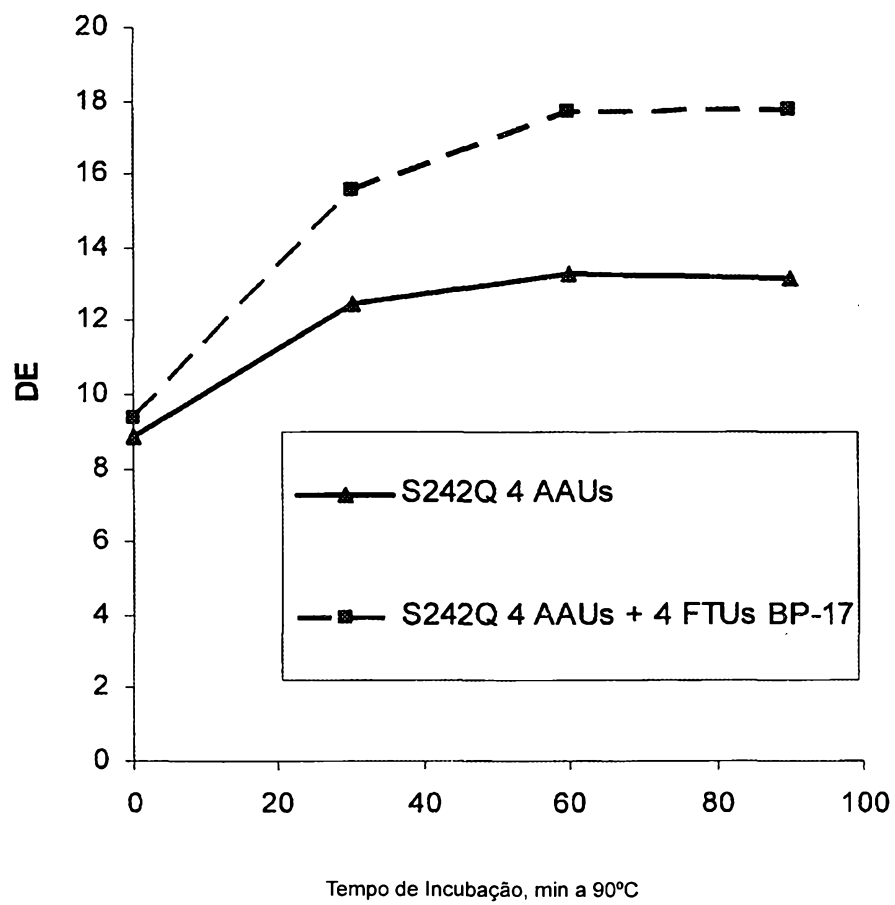
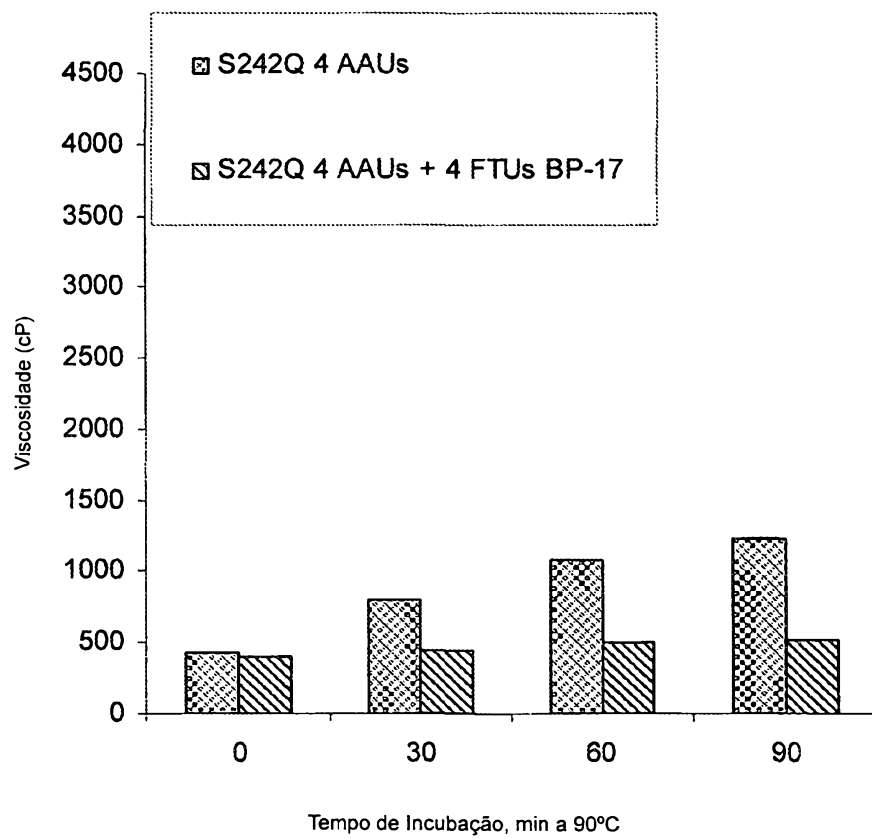


Fig 13

**Fig 14**

**Fig 15**

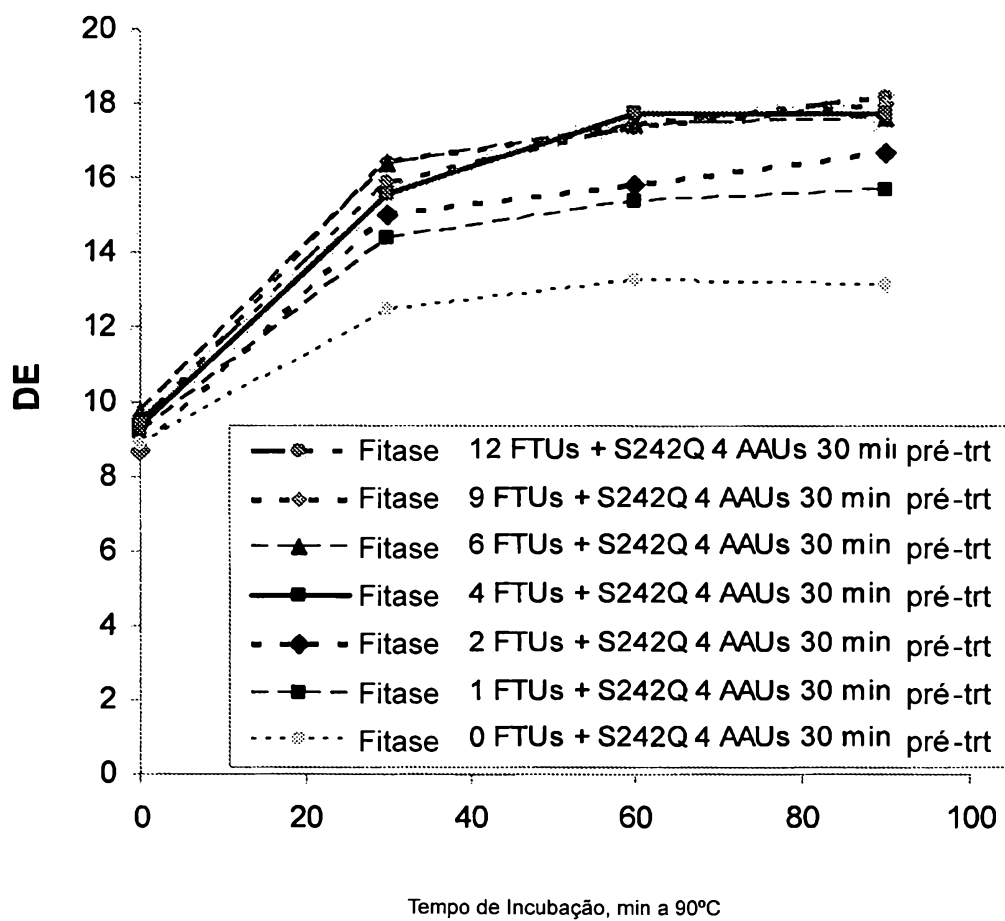


Fig 16

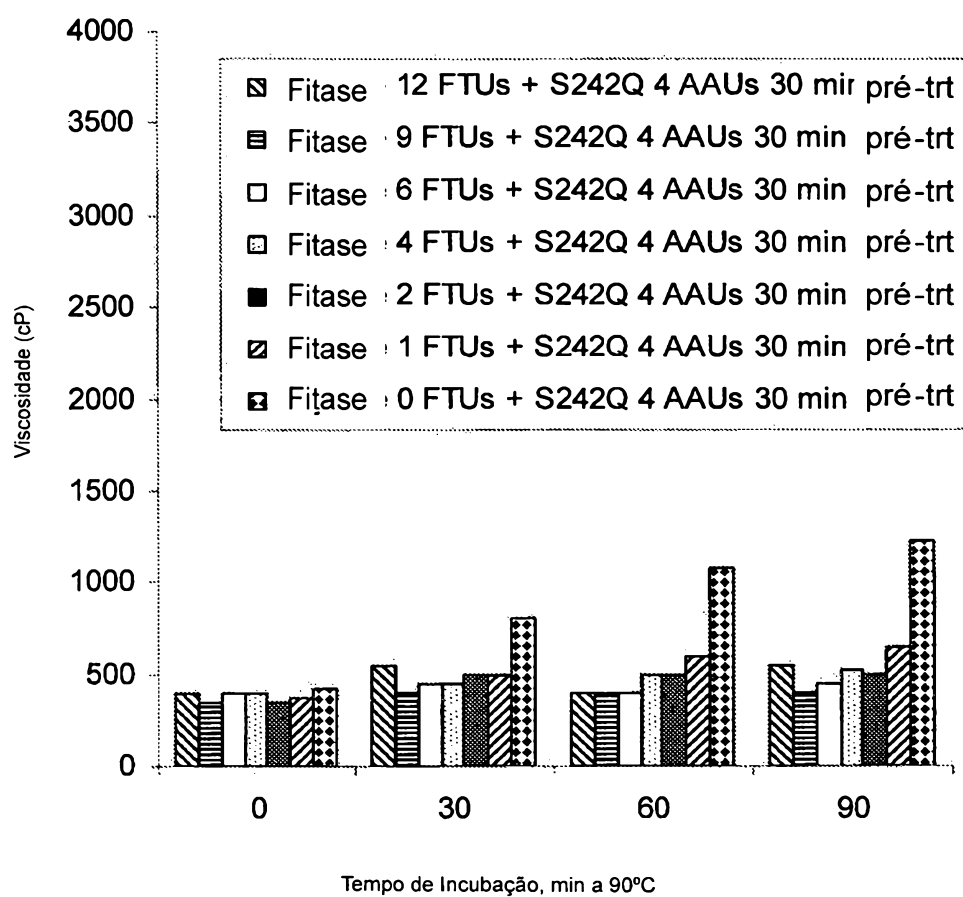
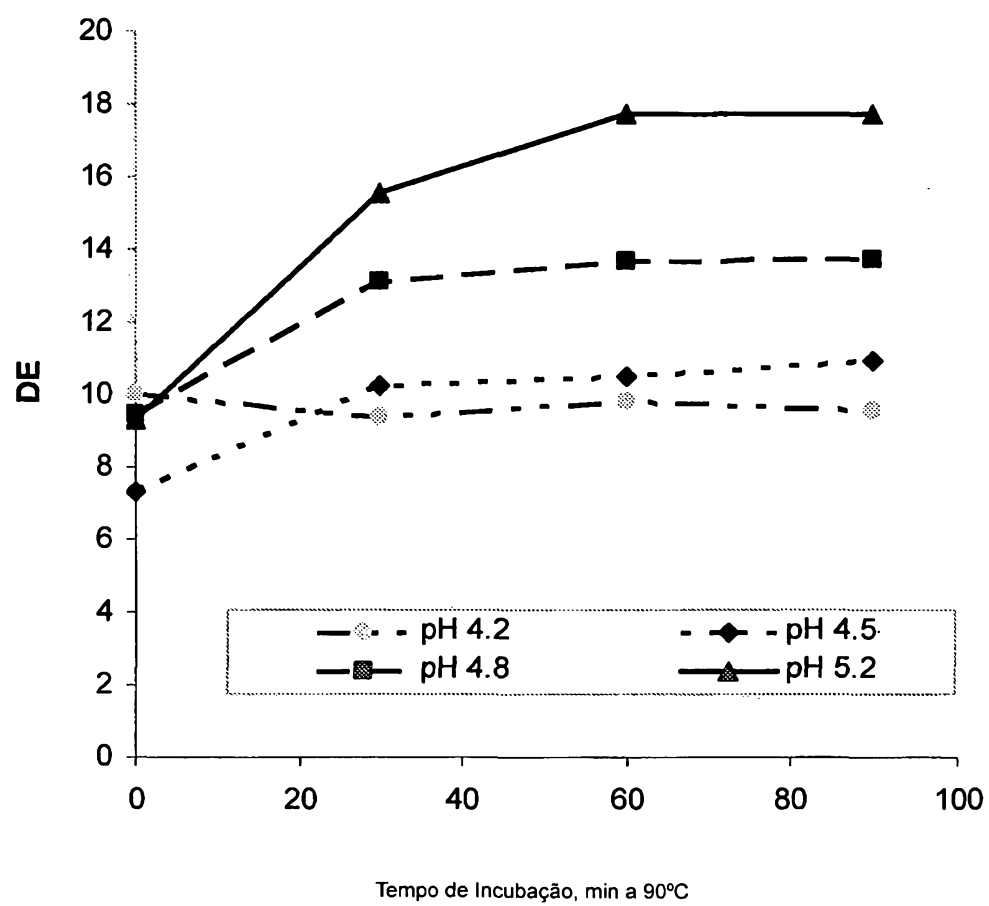
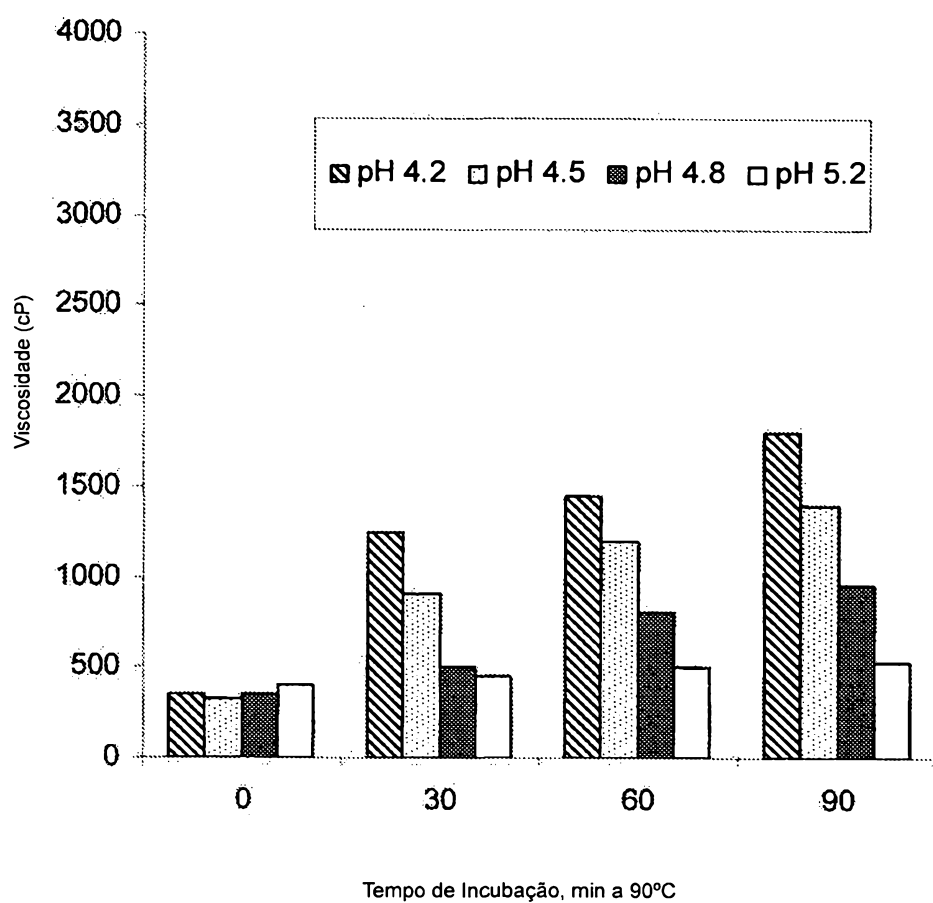


Fig 17

**Fig 18**

**Fig 19**

Condições de liquefação	Rendimento alcoólico Galão/Bushel	DDGS,% ds				
		Amido	Ácido fítico	% IP 6	Fosfato Livre	Sulfato
Processo Convencional-pH 5,8 (Liquefato A)	2.70	7.25	0.6	100	1.20	1.92 mg/gds
Processo sem ajuste de pH, pH 5,2 3+1 AAU (Dose dividida), 4 FTU BP-17, com cozimento por jato de vapor, 225°F (Liquefato B)	2.69	9.28	0.2	0	1.33	0.23mg/gds

Fig 20

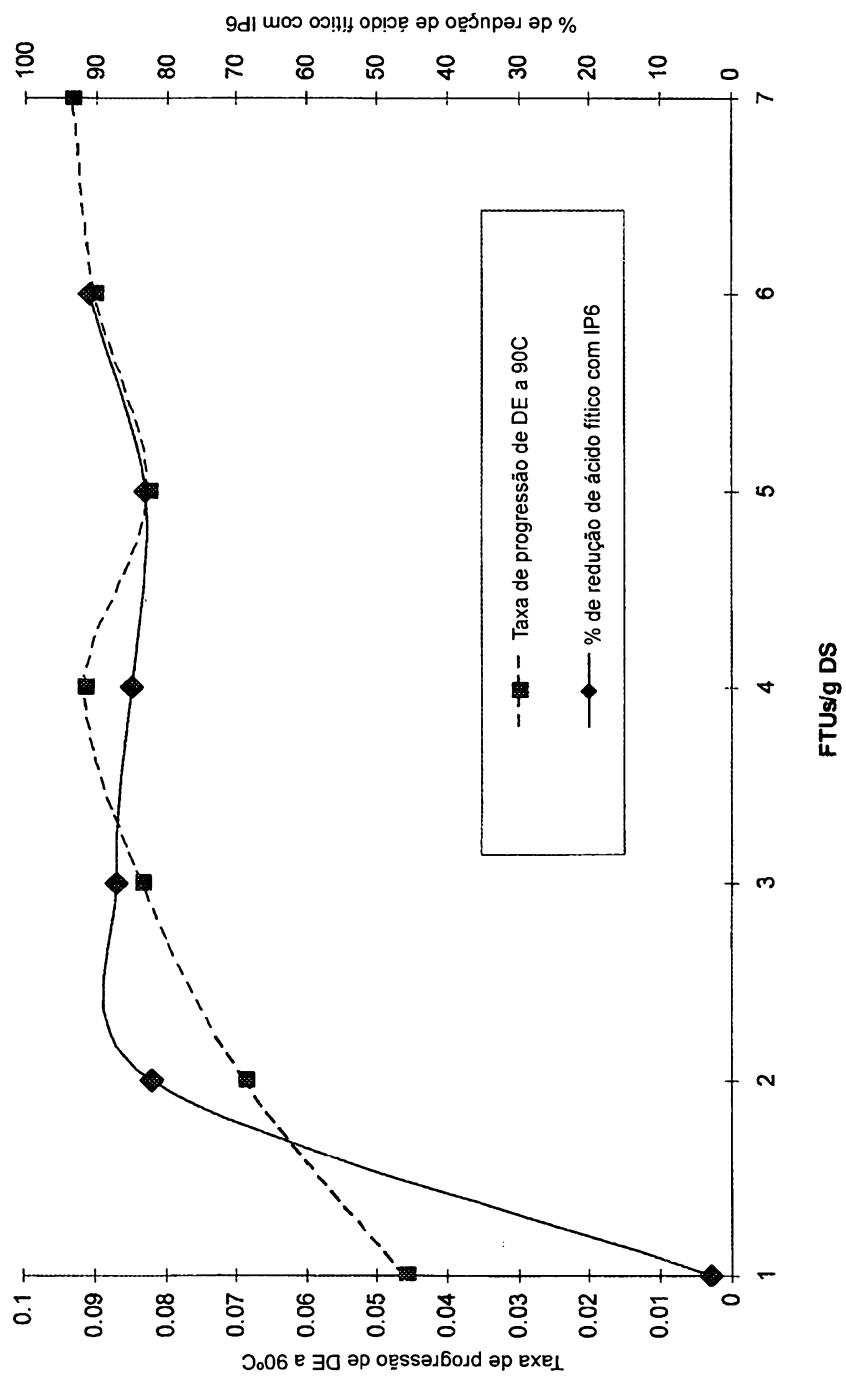
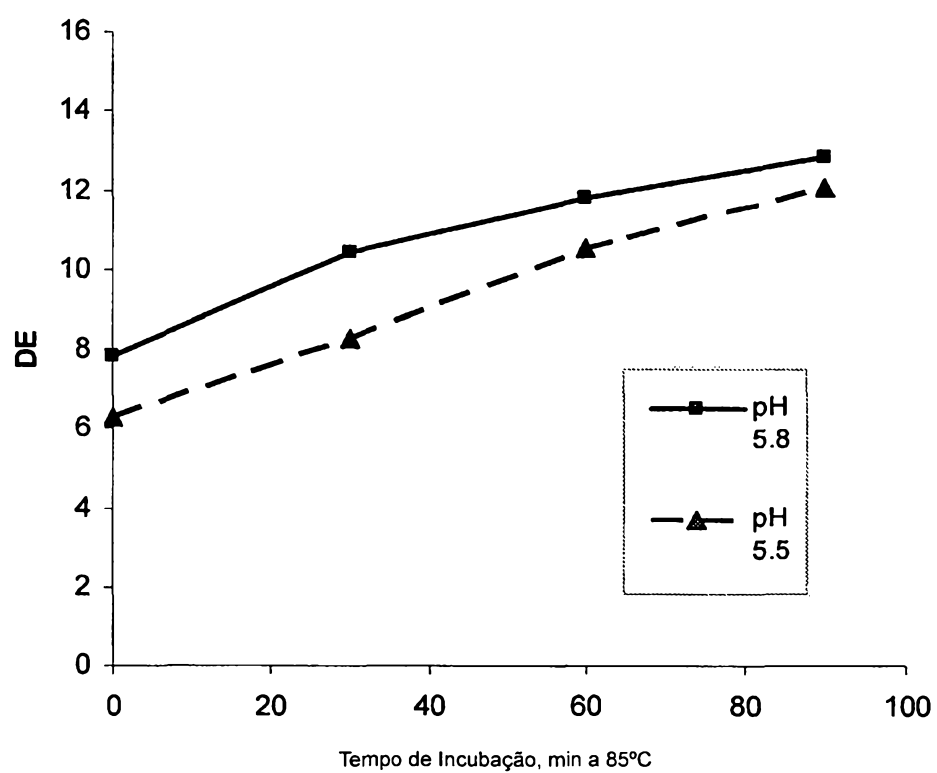
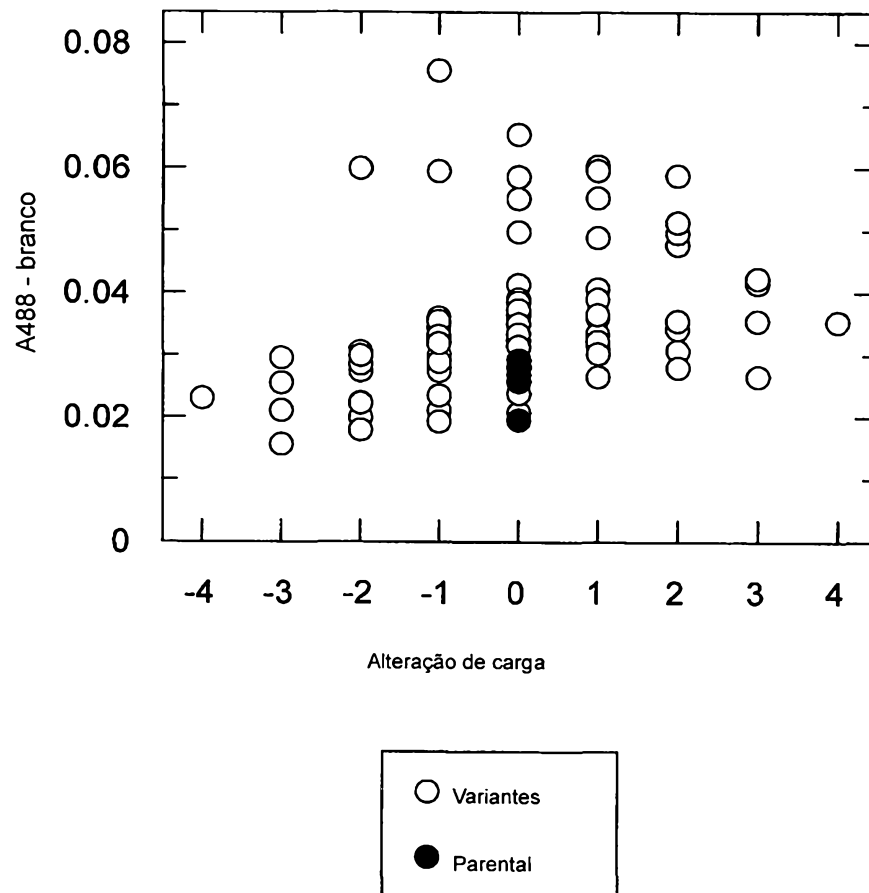
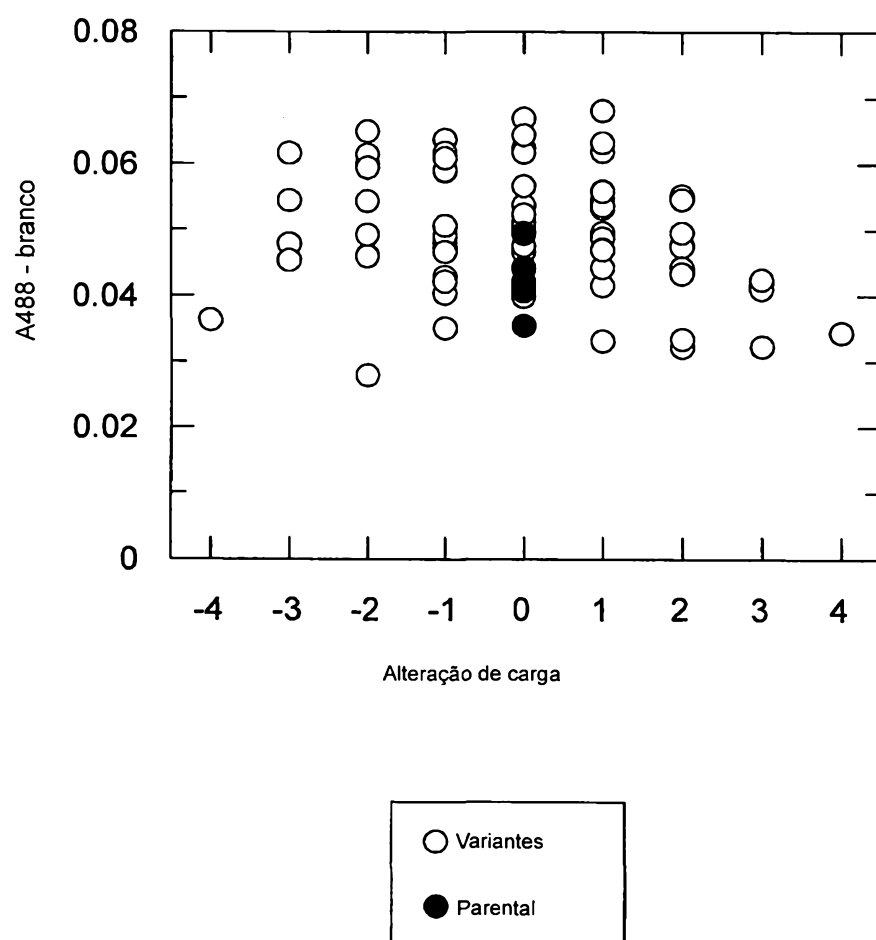
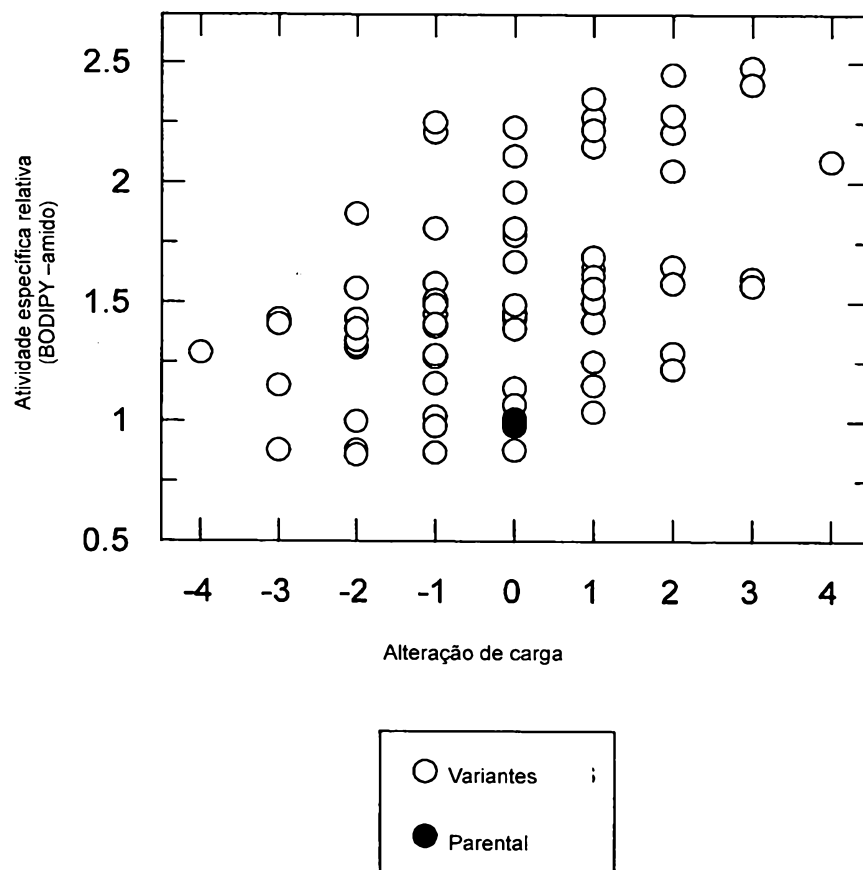


Fig 21

**Fig 22**

**Fig 23**

**Fig 24**

**Fig 25**

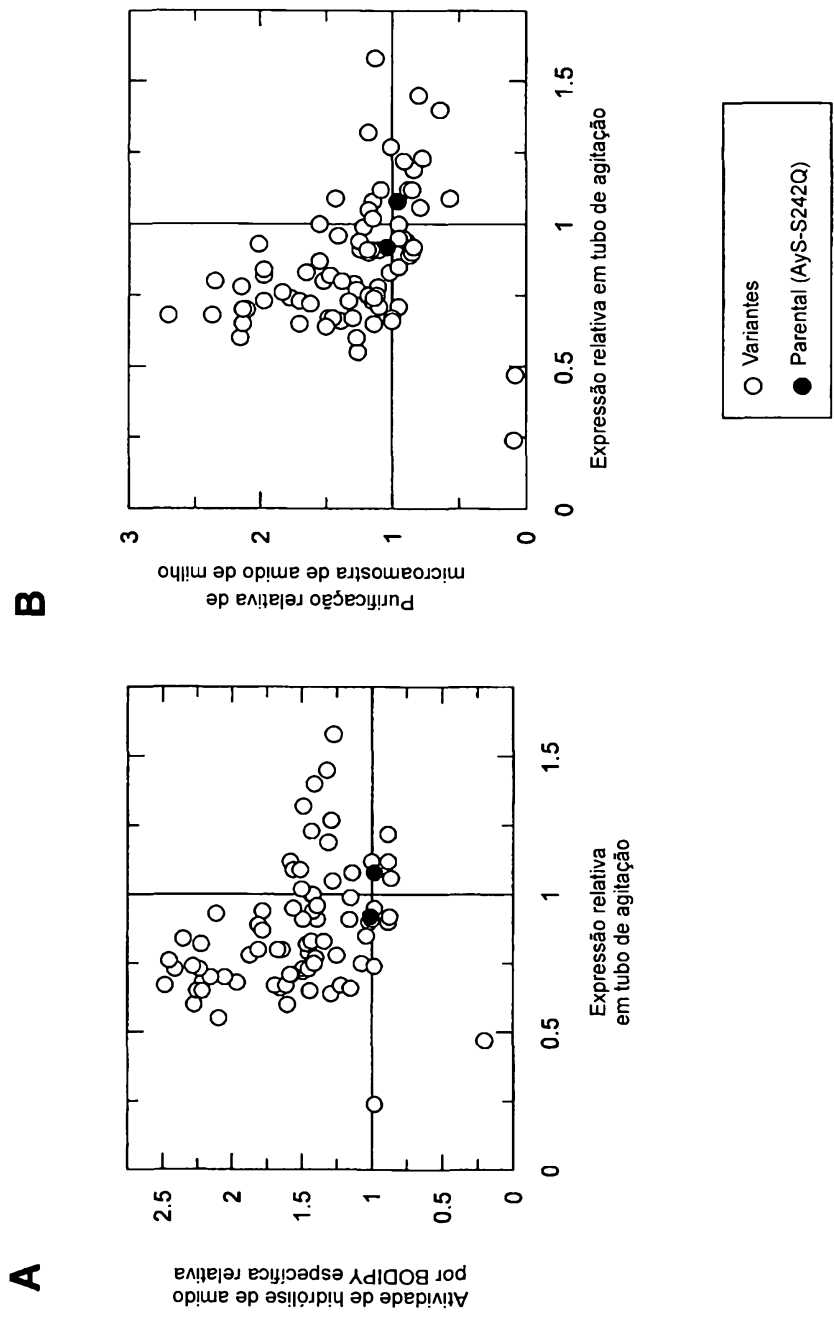


Fig 26

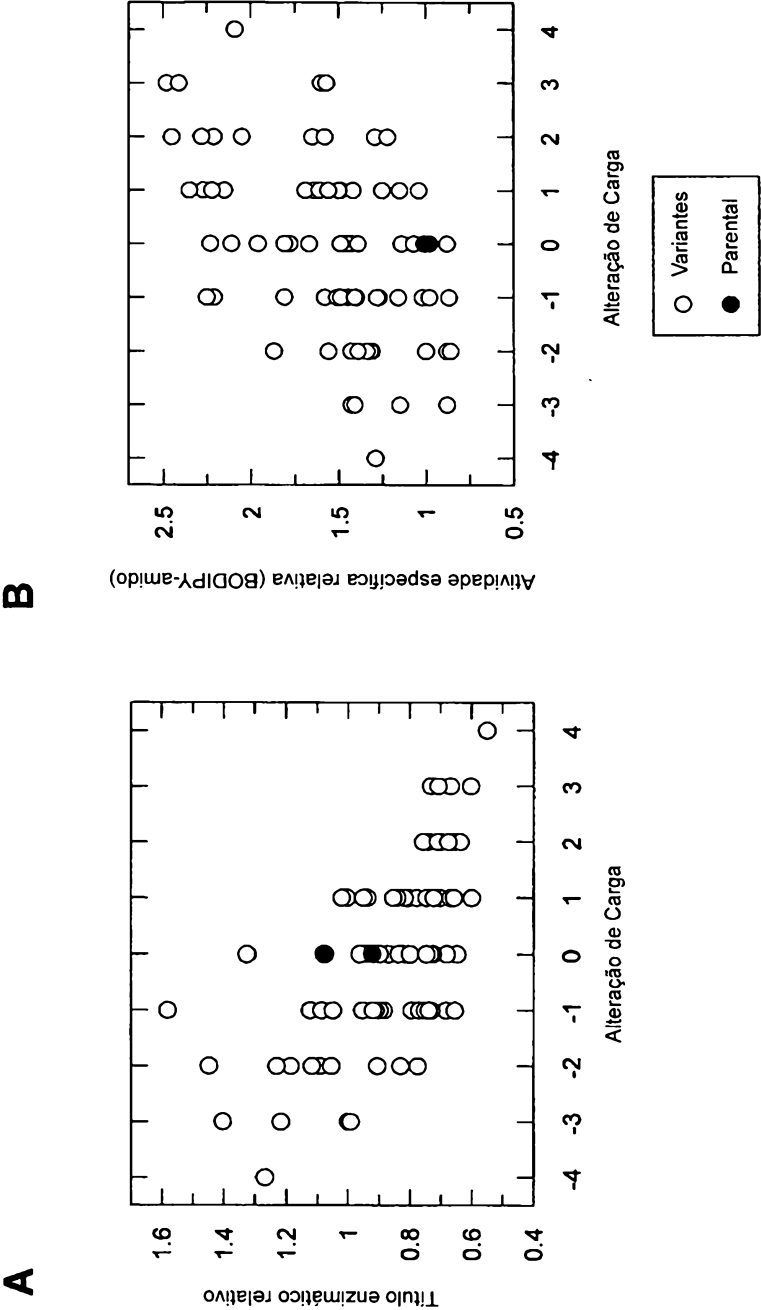


Fig 27

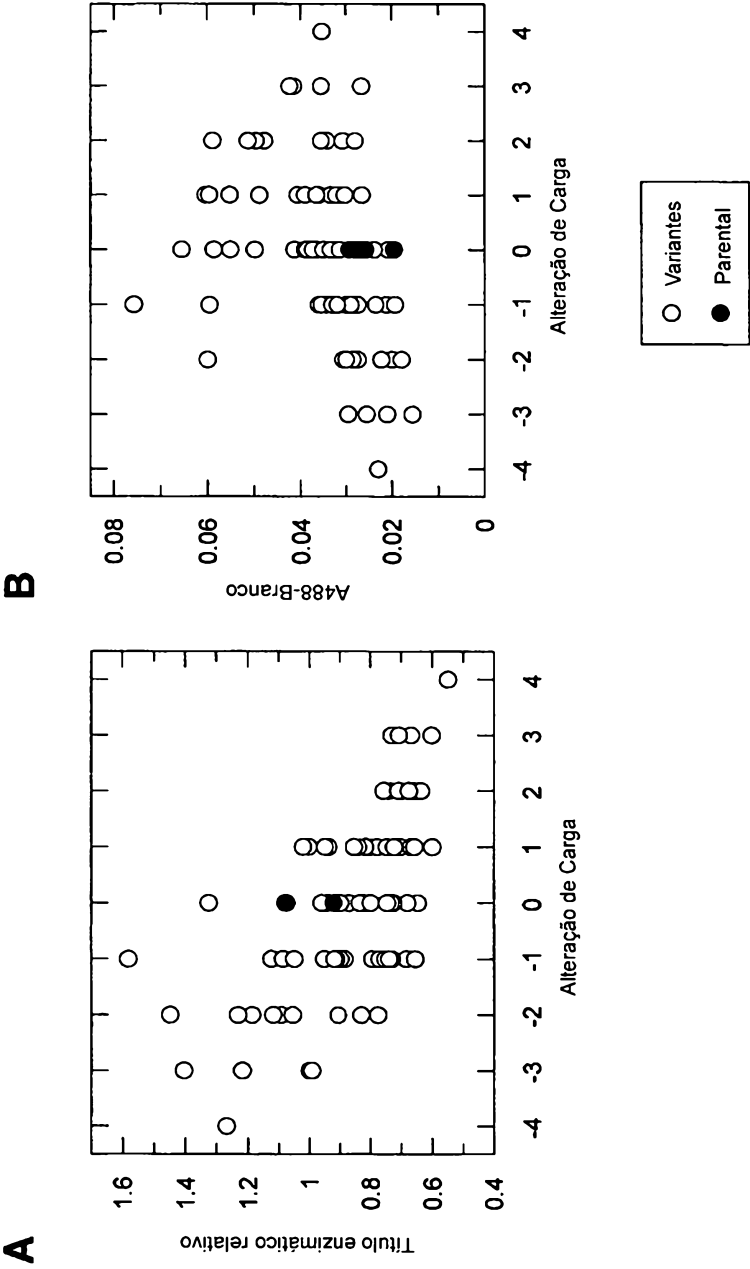
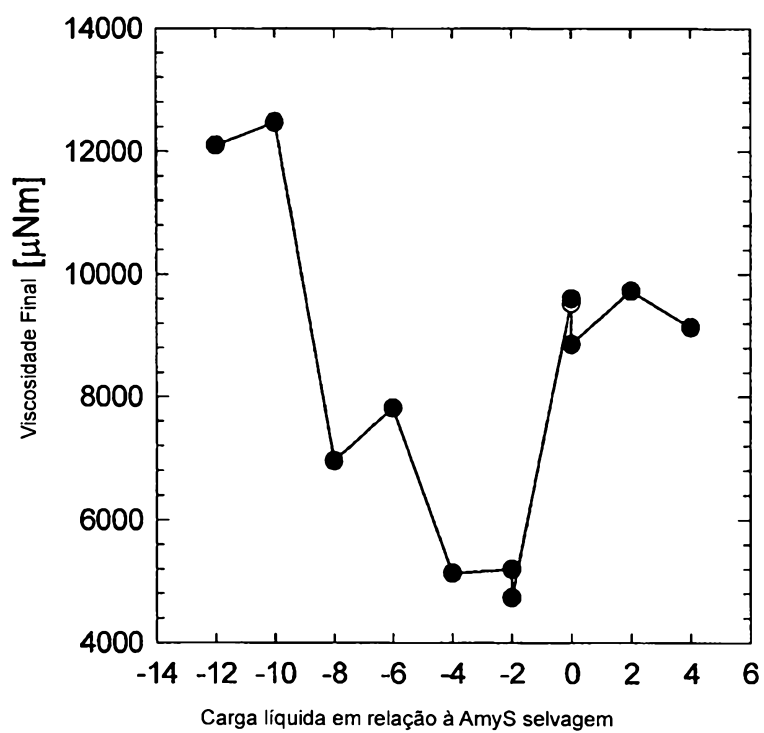
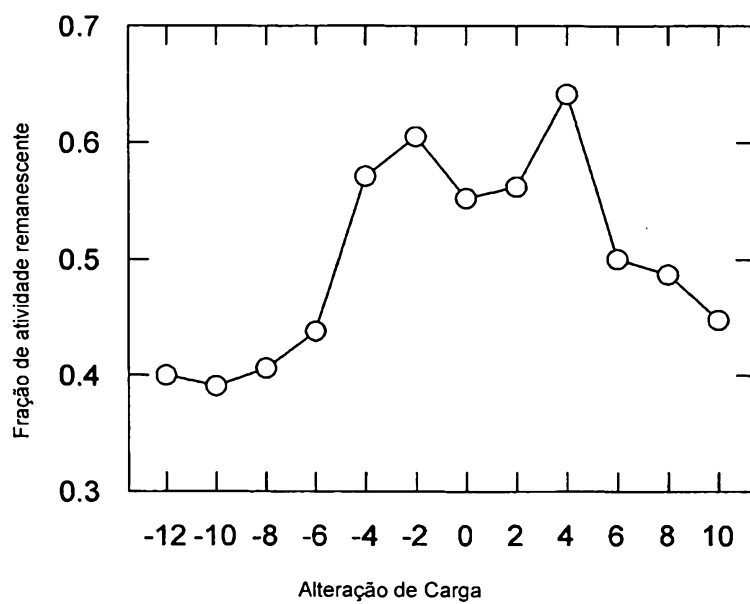
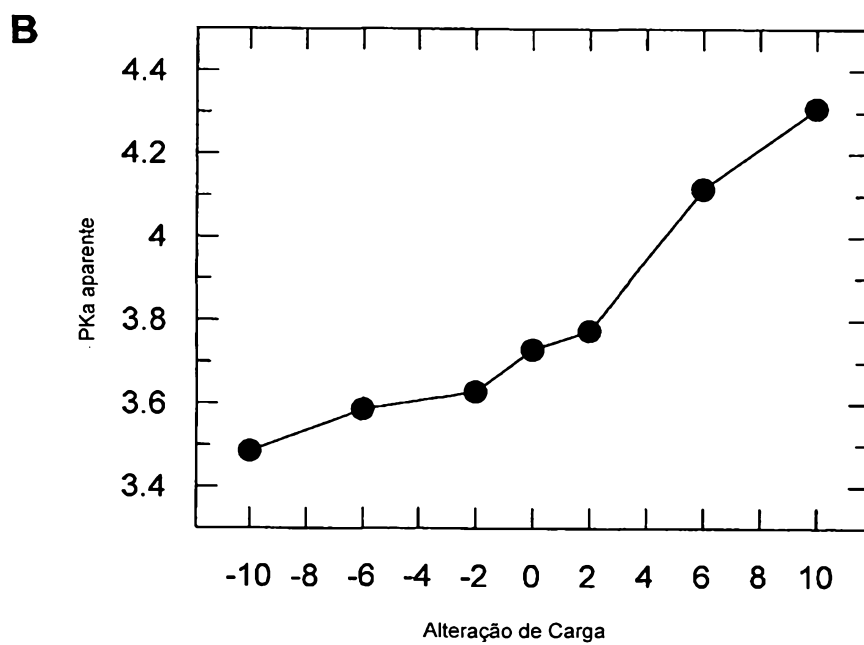
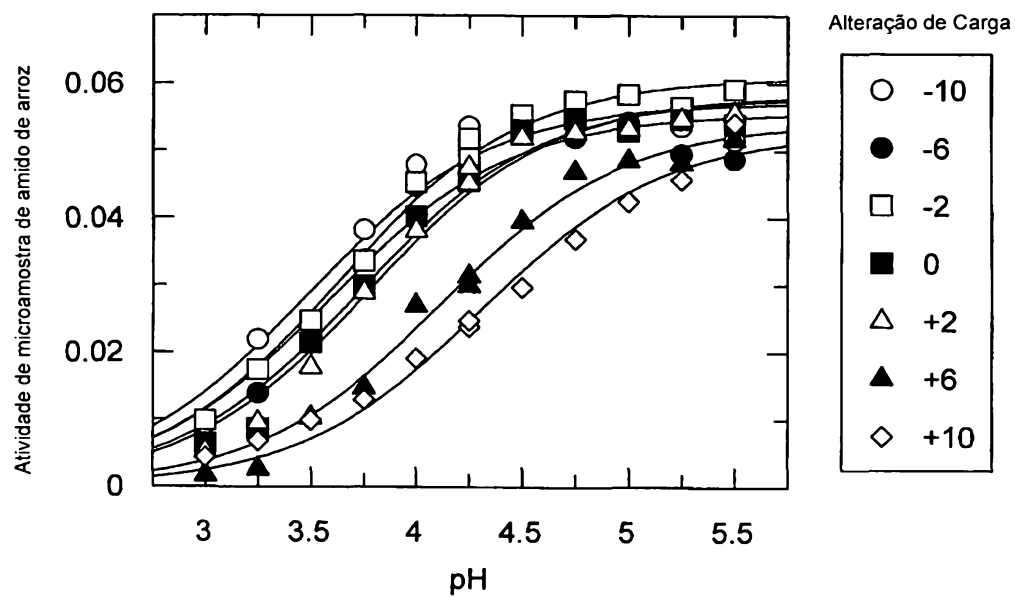
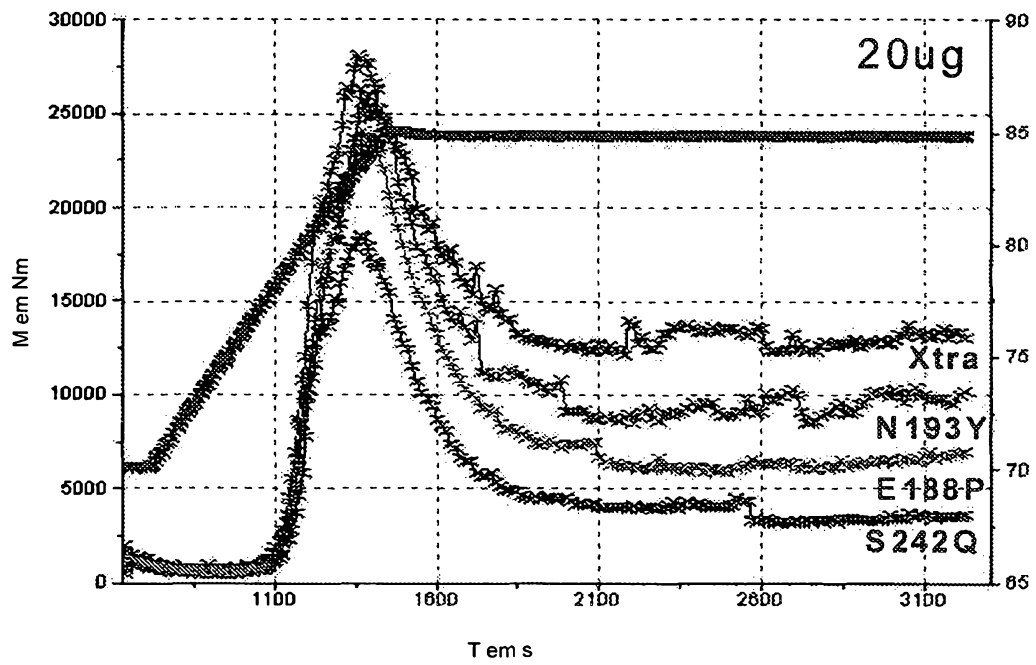
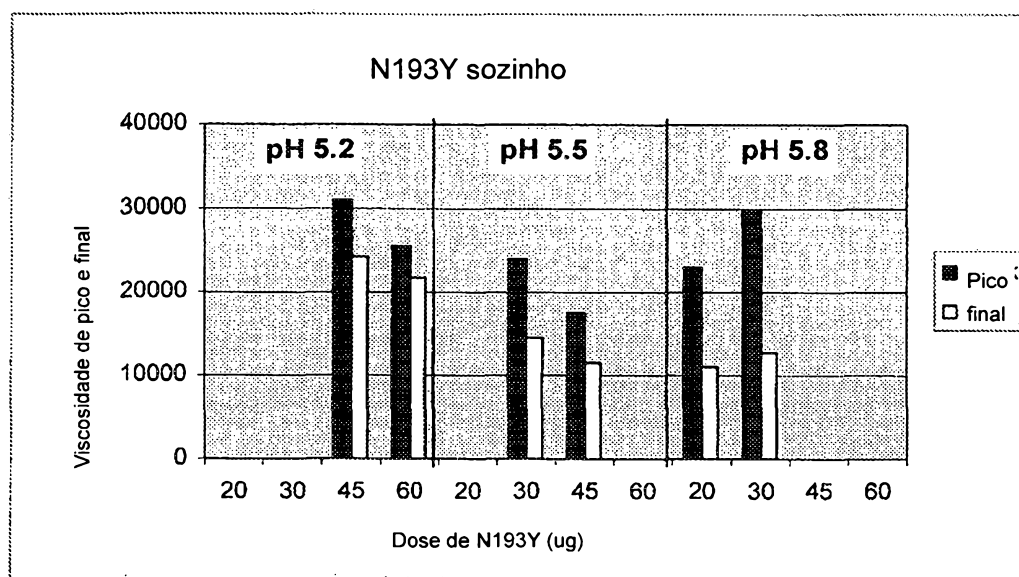


Fig 28

**Fig 29****Fig 30**

**Fig 31**

A**Fig 32**



C

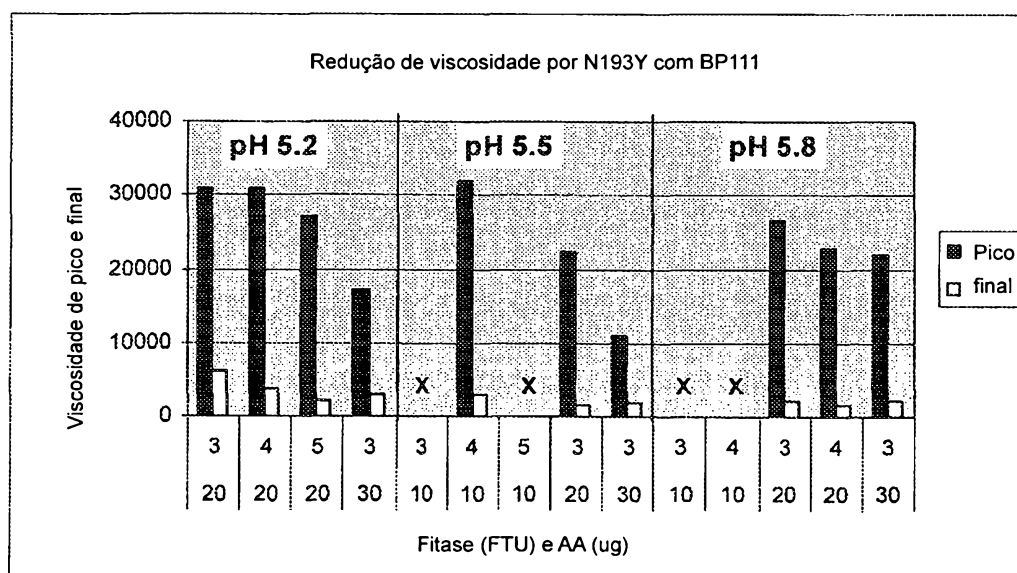


Fig 32 (cont.)